

УДК 579.264

**ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ШТАММОВ *BACILLUS* SPP.
И *LACTOBACILLUS* SPP.**

Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, Е.Н. Кожевникова
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

В статье представлены результаты исследования биосовместимости штаммов молочнокислых и споровых бактерий, перспективных для включения в состав биологических препаратов для сельского хозяйства. Биологические препараты являются альтернативным способом борьбы с патогенной микрофлорой в условиях животноводческих предприятий. Большую эффективность демонстрируют препараты, состоящие из 2 и более штаммов микроорганизмов. При разработке таких препаратов важно учитывать биосовместимость микробных культур.

Ключевые слова: биосовместимость, *Bacillus*, *Lactobacillus*, биопрепараты

**ASSESSMENT OF BIOCOMPATIBILITY OF *BACILLUS* SPP.
AND *LACTOBACILLUS* SPP. STRAINS.**

E.D. Dudnik, A.N. Irkitova, A.V. Malkova, E.N. Kozhevnikova
Altai State University, Barnaul, Russia

The article presents the results of a study of the biocompatibility of strains of lactic acid and spore bacteria that are promising for inclusion in biological preparations for agriculture. Biological preparations are an alternative way to combat pathogenic microflora in livestock enterprises. Preparations consisting of 2 or more strains of microorganisms demonstrate great effectiveness. When developing such preparations, it is important to take into account the biocompatibility of microbial cultures.

Keywords: biocompatibility, *Bacillus*, *Lactobacillus*, biological preparations.

Введение

Распространение устойчивости к антибиотикам и средствам химической дезинфекции в микробной популяции вынуждает искать альтернативные способы для борьбы с патогенной микрофлорой в условиях животноводческих предприятий. Наиболее перспективным в этом отношении является биологический контроль болезнетворных микроорганизмов посредством внедрения практики использования препаратов на основе непатогенных бактерий, грибов и дрожжей, а также их метаболитов. Микробные препараты, применяемые в животноводстве, уже доказали свою эффективность в качестве пробиотиков и средств для обработки помещений и подстилки. Установлено их благоприятное действие на макроорганизмы, микроклимат и санитарный фон животноводческих помещений [4, 5, 13].

В качестве перспективных микроорганизмов для разработки биологических препаратов сельскохозяйственного назначения рассматриваются молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* и споровые бактерии рода *Bacillus*. Штаммы этих микроорганизмов обладают антагонистической активностью в отношении инфекционных агентов за счет продукции органических кислот, ферментов, бактериоцинов, липопептидов и др. [6, 9, 14]. Виды *Lactobacillus* и *Bacillus* признаны безопасными (QPS) для человека и животных и разрешены для использования в пище и кормах [11].

Микробные биопрепараты для животноводства могут иметь в своем составе один или несколько штаммов микроорганизмов. Мультиштабные препараты обладают преимуществами, выражающимися в синергии действия составляющих их штаммов, более эффективной колонизации среды и увеличении жизнеспособности штаммов при действии стрессовых факторов. Синергия антагонистической активности штаммов препарата обуславливается продукцией различных антимикробных метаболитов каждым штаммом препарата [6, 10]. Помимо этого, микроорганизмы консорциума способны к взаимной индукции синтеза бактерицидных или фунгицидных соединений, не свойственных для монокультуры. Секретция новых метаболитов регулируется Quorum sensing [7].

Микроорганизмы из многоштабных препаратов обладают разными свойствами и соответственно имеют большие шансы на выживание и колонизацию целевой ниши [10, 13]. При совместном применении некоторые культуры могут оказывать защитное действие на другие путем образования биопленок. Так, виды *Bacillus* способны формировать совместную с видами *Lactobacillus* биопленку, чем повышают сохранность лактобактерий при действии неблагоприятных факторов среды [7].

Мультиштабные биопрепараты показывают большую эффективность по сравнению с моноштабными в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В лабораторных исследованиях для комплекса штаммов споровых и молочнокислых бактерий было установлено бактерицидное действие в отношении *Escherichia coli*, превышающее действие каждого штамма по отдельности [15]. Применение многовидовых пробиотиков, включающих виды *Bacillus* и *Lactobacillus*, благоприятно сказалось на биохимических показателях крови и увеличило среднесуточный привес телят на 15-50% по сравнению с препаратами из одного штамма бактерий [5]. Таким образом, мультиштабные препараты, содержащие разные бактерии, воздействуют на разные участки организма и проявляют более выраженный эффект на патогены.

Цель исследования: оценка биосовместимости штаммов *Bacillus* spp. и *Lactobacillus* spp. для разработки многоштабного биологического препарата.

Материалы и методы.

В качестве объекта исследования использовали штаммы *B. atrophaeus* 7, *B. licheniformis* 6, *B. subtilis* 1/8, *Lactobacillus* sp.8Б, *L. pentosus* М, *L. pentosus* ЛВ из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ. Все штаммы обладают антагонистической активностью в отношении бактериальных и грибных патогенных микроорганизмов.

Штаммы бацилл культивировали в течение 24 ч на L бульоне в шейкере-инкубаторе при 37°C и 220 об/мин. Штаммы *Lactobacillus* spp. выращивали в термостате на MRS бульоне при 30°C в течение 24 ч.

Определение биосовместимости проводили на питательном агаре. Штаммы культивировали 24 ч при температуре оптимальной для роста штамма, используемого в качестве тест-культуры.

Биосовместимость штаммов *Lactobacillus* spp. изучали методом лунок [2]. Для этого исследуемый штамм засеивали поверхностно (штаммы *Bacillus* spp.) или глубинно (штаммы *Lactobacillus* spp.) «газоном». Затем в нем пробочным сверлом прорезали лунки, не доходя до дна чашки. В полученные лунки вносили по 30 мкл культуральной жидкости тест-культуры. Штаммы считали биосовместимыми при отсутствии зон угнетения роста вокруг лунок.

Определение биосовместимости бацилл проводили методом перпендикулярных штрихов [1]. Исследуемый штамм высевали прямым штрихом по диаметру чашки и культивировали 24 ч при температуре 37°C. По окончании инкубации к штриху подсеивали перпендикулярно штаммы, используемые в качестве тест-культур. Культивировали чашки в течение 24 ч при 37°C. Биосовместимыми считали штаммы, имеющие нормальный рост, без зон подавления, на границе контакта их штрихов.

Эксперименты проводили в 3 повторностях. Все полученные данные статистически обработаны и представлены в виде “среднее значение ± стандартное отклонение”.

Результаты и обсуждение

Биосовместимость является важным критерием отбора штаммов при разработке многоштабных биологических препаратов. Штаммы не должны проявлять антагонистическую активность в отношении друг друга, так как это существенно снизит эффективность готового препарата.

По результатам исследования, все проверенные штаммы *Lactobacillus* spp. оказались биосовместимыми. Они не проявляли антагонистической активности в отношении друг друга и характер роста не менялся при совместном культивировании на агаризованной среде (табл. 1).

Таблица 1

Биосовместимость штаммов *Bacillus* spp. и *Lactobacillus* spp.

Исследуемый штамм	Тест-культура					
	<i>L. pentosus</i> ЛВ	<i>L. pentosus</i> М	<i>Lactobacillus</i> sp.8Б	<i>B. atrophaeus</i> 7	<i>B. licheniformis</i> 6	<i>B. subtilis</i> 1/8
	Размер зон подавления роста, мм					
<i>L. pentosus</i> ЛВ	-	-	-	-	-	-
<i>L. pentosus</i> М	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.8Б	-	-	-	-	-	-
<i>B. atrophaeus</i> 7	-	-	-	-	4,7±0,3	-
<i>B. licheniformis</i> 6	22,5±0,5	25,7±0,3	18,5±0,6	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 1/8	-	-	-	-	3,7±0,3	-

Примечание: «-» - антагонизма нет

Для штаммов *Bacillus* spp., напротив, было установлено угнетение роста одного из штаммов другими. Подавление роста штамма *B. licheniformis* 6 отмечено при его культивировании в качестве тест-культуры со штаммами *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8. Антагонизм в отношении этого штамма может быть опосредован низкомолекулярными метаболитами, выделенными в среду штаммом, засеянным основным штрихом. Угнетение роста близких видов или штаммов связывают с продукцией антимикробных пептидов – бактериоцинов [8, 9].

Антагонистическая активность штаммов *Lactobacillus* spp. в отношении *B. licheniformis* 6 также может быть опосредована продукцией ими антимикробных метаболитов. Виды *Lactobacillus* могут подавлять рост грамположительных микроорганизмов за счет синтеза ферментов и бактериоцинов [12].

Помимо этого, подавление роста *B. licheniformis* 6 штаммами *Lactobacillus* spp. может быть следствием закисления среды, вызванного синтезом микроорганизмами молочной кислоты. Образование молочной кислоты может варьировать и в зависимости от питательной среды и штамма и достигать 40-50 г/л. При этом pH среды снижается до 3,5-4,5. [3, 12] Угнетение штамма *B. licheniformis* 6 в этом случае определяется его слабой кислотоустойчивостью.

Заключение.

Установлена биосовместимость штаммов *B. atrophaeus* 7, *B. subtilis* 1/8, *Lactobacillus* sp.8Б, *L. pentosus* М и *L. pentosus* ЛВ. Данные штаммы могут использоваться для разработки мультиштабного препарата для животноводства.

Библиографический список

1. Байгазанов А. Н., Финогенов А. Ю., Нуркенова М. К., Икимбаева Н. А., Зайнеттинова Д. Б. Антагонистические свойства бациллярных пробиотических штаммов // Авиценна. 2017. № 10. С. 7–10.

2. Проскурнина И. А. Исследование пробиотических свойств штаммов *Bacillus velezensis* БИМ в-497 д и *Bacillus velezensis* БИМ в-1312 д - основы кормовой добавки // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Сборник научных трудов. Минск: Республиканское унитарное предприятие Издательский дом «Белорусская наука», 2020. С. 206–216.
3. Саламатзадех А. А., Ганбаров Х. Г., Кафшдарджалал А. М. Влияние условий культивирования на продуцирование молочной кислоты у бактерий рода *Lactobacillus* // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2011. № 2. С. 73–77.
4. Сверчкова, Н. В. Пробиотические препараты на основе бактерий рода *Bacillus* для животноводства, птицеводства и промышленного рыбоводства // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Сборник научных трудов. Минск: Республиканское унитарное предприятие Издательский дом «Белорусская наука», 2020. С. 252–264.
5. Ayyat M. S., El-Nagar H. A., Wafa W. M., Abd El-Latif K. M., Mahgoub S., Al-Sagheer A. A. Comparable Evaluation of Nutritional Benefits of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus toyonensis* Probiotic Supplementation on Growth, Feed Utilization, Health, and Fecal Microbiota in Pre-Weaning Male Calves // *Animals* (Basel). 2023. V 13. doi: 10.3390/ani13213422.
6. Hirozawa M. T., Ono M. A., Suguiura I. M. S., Bordini J. G., Ono E. Y. S. Lactic acid bacteria and *Bacillus* spp. as fungal biological control agents // *J Appl Microbiol*. 2023. V. 134. doi: 10.1093/jambio/txac083.
7. Kimelman H., Shemesh M. Probiotic Bifunctionality of *Bacillus subtilis* - Rescuing Lactic Acid Bacteria from Desiccation and Antagonizing Pathogenic *Staphylococcus aureus* // *Microorganisms*. 2019. V. 7. doi: 10.3390/microorganisms7100407.
8. Kwoji I. D., Aiyegoro O. A., Okpeku M., Adeleke M. A. Multi-Strain Probiotics: Synergy among Isolates Enhances Biological Activities // *Biology* (Basel). 2021. V. 10. doi: 10.3390/biology10040322.
9. McFarland L. V. Efficacy of Single-Strain Probiotics Versus Multi-Strain Mixtures: Systematic Review of Strain and Disease Specificity // *Dig Dis Sci*. 2021.V. 66. doi: 10.1007/s10620-020-06244-z.
10. Puvanasundram P., Chong C. M., Sabri S., Yusoff M. S. M., Lim K. C., Karim M. Efficacy of Single and Multi-Strain Probiotics on In Vitro Strain Compatibility, Pathogen Inhibition, Biofilm Formation Capability, and Stress Tolerance // *Biology* (Basel). 2022. V. 11. doi: 10.3390/biology11111644.
11. Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M. et. al. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA // *EFSA Journal*. 2017. V. 15. P. 4664 [1-177].
12. Soria M. C., Audisio M. C. Inhibition of *Bacillus cereus* Strains by Antimicrobial Metabolites from *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 and *Enterococcus faecium* SM21 // *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2014.V. 6. P. 208–216. doi: 10.1007/s12602-014-9169-z.
13. Timmerman H. M., Koning C. J., Mulder L., Rombouts F. M., Beynen A. C. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics-A comparison of functionality and efficacy // *Int J Food Microbiol*. 2004. V. 96. P. 219–233. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012.
14. Tran C., Cock I. E., Chen X., Feng Y. Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and Their Mode of Action // *Antibiotics* (Basel). 2022. V. 11. doi: 10.3390/antibiotics11010088.
15. Yang J. J., Niu C. C., Guo X. H. Mixed culture models for predicting intestinal microbial interactions between *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in the presence of probiotic *Bacillus subtilis* // *Benef Microbes*. 2015. V. 6. P. 871-877. doi: 10.3920/BM2015.0033.