

УДК 579.66/579.62

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММОВ *BACILLUS TOYONENSIS* B-13249 И *B. PUMILUS* B-13250, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ОСНОВЕ ПРОБИОТИКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ

И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

При промышленном разведении аквакультур предприятия сталкиваются с различными инфекциями, что часто приводит к массовой гибели поголовья водных животных. В последние годы всё большую популярность набирают пробиотики, которые эффективны в профилактике и предотвращении развития инфекций. Оздоравливающие свойства пробиотиков заключаются в проявлении антагонизма к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, в создании благоприятных условий для представителей нормальной микрофлоры и снабжении организма-хозяина биологически активными веществами. В данном исследовании выявлено, что и *Bacillus toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 проявляют высокий антагонистический эффект к представителям патогенной и условно-патогенной микрофлоры: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Salmonella abony*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*. Штаммы *Bacillus pumilus* B-13250 и *Bacillus toyonensis* B-13249 оказались высокочувствительны к широкоприменяемым в животноводстве и птицеводстве антибиотикам: олеандомицин, энрофлоксацин, мономицин, цефалексин, бензилпенициллин и, практически, не чувствительны к оксациллину.

Ключевые слова: пробиотики, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus pumilus*, аквакультура.

Разведение различных водных животных широко распространено в прибрежных странах, таких как Индия, Таиланд, Мексика и др. В России эта отрасль также динамично развивается. Успешное разведение аквакультуры для получения продуктов питания водного происхождения может стать ключевым фактором в решении продовольственной проблемы [1, 2]. При этом промышленное разведение аквакультур имеет ряд особенностей. Многие производимые объекты на ранних стадиях развития нуждаются в подвижности корма. Так, активное питание, следовательно, и интенсивный рост организма, происходит при самостоятельном передвижении кормовых единиц. В связи с указанной особенностью, в качестве оптимального стартового корма стали повсеместно использовать планктонных галофильных раков рода *Artemia*, распространенных в соленых озерах Западной Сибири [3].

При разведении аквакультур производственные предприятия сталкиваются с различными инфекциями на производстве, что часто приводит к массовой гибели поголовья водных животных. К патогенным бактериям, распространенным в водной среде, относятся представители pp. *Vibrio* [4], *Salmonella*, *Escherichia* [5] и многие др. Для предотвращения крупных потерь водных животных и восстановления санитарного фона предприятий при производстве промысловых объектов, долгие годы применялись антибиотики. Антибиотикотерапия со временем привела к развитию генов резистентности к ним у большинства патогенных микроорганизмов, что требовало повышение доз антибиотических веществ, либо смену антибиотика. Чтобы устойчивость бактерий к антибиотикам не привела к экологической катастрофе, в последние годы большую популярность набирают пробиотики как безопасный способ профилактики микробных инфекций [6].

Оздоравливающие свойства пробиотиков заключаются в проявлении антагонизма к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, в создании благоприятных условий

для представителей нормальной микрофлоры и снабжении организма-хозяина биологически активными веществами. Являясь транзиторными микроорганизмами, представители рода *Bacillus*, даже при приобретении резистентности к антибиотикам, не успевают передать данные гены представителям патогенной микрофлоры. Вследствие чего, биологические риски при использовании пробиотиков на основе бацилл минимальны. Кроме того, из-за образования эндоспор, бациллы являются удобным биотехнологическим объектом, так как устойчивы к различным факторам среды, легко переносят сушку, долго сохраняются, легко транспортируются и пр.

Цель нашего исследования – оценить биотехнологический потенциал штаммов *B. toyonensis* B-13249, *B. pumilus* B-13250 для использования в качестве основы пробиотика для аквакультур.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали 2 штамма споровых бактерий из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ (табл. 1).

Таблица 1

Штаммы бацилл, использованные для проведения исследования

Штамм	Источник выделения	Регистрационный номер (ВКПМ)	Морфология
<i>B. toyonensis</i>	Ризосфера р. <i>Helianthus</i>	B-13249	Палочки (около 1 мкм), чаще расположенные парами или цепочками. Колонии на L-среде грязно-белого цвета, 1,0–1,2 см, блестящие, приподнятые, с неровным краем.
<i>B. pumilus</i>	Ризосфера р. <i>Cichorium</i>	B-13250	Палочки (около 0,7 мкм), чаще расположенные одиночно или парами. Колонии на L-среде белого цвета, с максимальным диаметром 0,5–0,8 см, матовые, приподнятые, ровной округлой формы, со складчатой каймой.

Микробиологические методы исследования. Посев на твердые питательные среды проводили чашечным методом Коха с применением десятикратных разведений. Для восстановления культур, посева на твердый субстрат, контроля численности и чистоты использовали физиологический раствор, L(Лурия)-среду, среду Левина.

Антагонистическую активность исследуемых культур определяли диффузионным методом перпендикулярных штрихов при совместном высеве с патогенными тест-культурой на агаризованные среды. В качестве штаммов-антагонистов использовали *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250, в качестве тест-культур патогенные и условно-патогенные штаммы (10 тест-культур).

Антибиотикорезистентность исследуемых штаммов определяли диско-диффузионным методом на твердой L-среде. Для этого на поверхность агара сплошным газоном рассевали культуру бацилл. На среду помещали диски с различными антибиотиками. Учет проводили после культивирования по зонам отсутствия или подавления роста бактерий вокруг дисков с антибиотиками.

Для статистической обработки данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Достоверным считали различия при уровне значимости $p < 0.05$. Расчет результатов осуществляли с помощью пакетов прикладных программ MS Excel 2020. В таблицах приведены данные средних арифметических значений со стандартным отклонением.

Результаты и обсуждение

Антагонистическая активность. При подборе штаммов для включения в состав пробиотических препаратов, необходимо было учитывать их антагонистическую активность к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Чем шире спектр антагонистической активности отобранных штаммов, тем эффективнее будет действовать биологический препарат в условиях промышленного разведения аквакультур. В настоящем исследовании в качестве тест-культур использовали 10 микроорганизмов III и IV групп патогенности: *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei*; Представленные микроорганизмы широко распространены в природе и являются частыми возбудителями заболеваний у животных, в том числе у водных. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Характер воздействия исследуемых штаммов микроорганизмов на патогенные и условно-патогенные тест-культуры

Штамм	Патогенные тест штаммы / характер роста под воздействием метаболитов штамма бациллы* / зона угнетения роста, мм									
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. abony</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>B. pumilus</i> B-13250	1 мм лизис + 3 мм ОРНШ	б/изм	б/изм	35 мм лизис + ОРВШ	б/изм	б/изм	ОРНШ	10 мм лизис + 25 мм ОРНШ	ОРНШ	ОРНШ
<i>B. toyonensis</i> B-13249	2 мм лизис + 20 ОРНШ	5 мм ОРНШ	б/изм	40 мм лизис ОРВШ	б/изм	б/изм	15 мм ОРНШ	10 мм лизис + ОРВШ	ОРНШ	ОРНШ

*Обозначения:

ОРНШ – ослабление роста в начале штриха тест-штамма (началом штриха патогенного тест штамма считается место его контакта со штрихом штамма антагониста);

ОРН – ослабление роста штриха тест-штамма;

НОРНШ – незначительное ослабление роста штриха тест-штамма;

ОРВШ – ослабление роста всего штриха тест-штамма;

б/изм – без изменений (характер роста тест-штамма в опытном варианте не отличается от роста в контроле);

лизис – отсутствие визуально наблюдаемого роста штриха тест-штамма или следовый его рост.

По приведенным результатам исследования характер воздействия исследуемых бацилл на патогенную и условно-патогенную микрофлору можно охарактеризовать следующим образом:

1. Высокая литическая активность внеклеточных метаболитов обоих природных штаммов бацилл, использованных в опыте, относительно штамма дрожжеподобного гриба *C. albicans* 620 Y-583;

2. Грамположительные штаммы *St. aureus* 201108 B-1266 и *St. epidermidis* ATCC14990 B-1363 проявили высокую чувствительность к воздействию водорастворимых диффундирующих метаболитов штаммов обеих бацилл;

3. Грамотрицательные тест-штаммы *E. coli* 6645 ATCC 25922 B-655, *S. typhimurium* 2606 и *Sh. sonnei* 32 проявили низкую чувствительность к метаболитам исследуемых бацилл. К *E. coli* 6645 ATCC 25922 B-655 проявилось влияние метаболитов только *B. toyonensis* B-13249. Наблюдался небольшой лизис или угнетение роста *S. typhimurium* 2606 и *Sh. sonnei* 32 с обоими исследуемыми штаммами;

4. Грамотрицательный штамм *S. abony* 103/39 был чувствителен к воздействию культур бацилл *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249, заметно антибиотическое действие на данный штамм;

5. Воздействия на штаммы *Ps. aeruginosa* 6643 B-1295, *B. subtilis* 6644 ATCC 6633 B-654 и *B. cereus* 37 ATCC 10702 B-1367 обеих культур выражалось незначительно, что говорило о малой чувствительности к метаболитам исследуемых культур к тест-штаммам.

Таким образом, оба исследуемых штамма обладали высокой антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре и зарекомендовали себя как пробиотические.

Антибиотикорезистентность. Проблема антибиотикоустойчивости у бактерий в настоящее время является актуальной для всех воспроизводимых объектов сельского хозяйства, в том числе аквакультуры. Распространение резистентности бактерий к антибиотическим препаратам представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире [7]. Серьезность этой проблемы усугубляется возможностью бактерий горизонтально передавать детерминанты резистентности патогенам и комменсальной кишечной микробиоте человека. Некоторые пробиотические штаммы с внутренней устойчивостью к антибиотикам призваны быть полезными для восстановления микробиоты кишечника после лечения антибиотиками [8]. Оба исследованных штамма оказались чувствительны к основным группам антибиотиков (табл. 3).

Таблица 3

Чувствительность штаммов к антибиотикам

Антибиотик	<i>B. toyonensis</i> B-13249		<i>B. pumilus</i> B-13250	
	Задержка роста (мм)	Чувствительность	Задержка роста (мм)	Чувствительность
Цефалексин	13,6 ($\pm 1,1$)	Умеренная	37,9 ($\pm 0,7$)	Высокая
Олеандомицин	13,2 ($\pm 1,2$)	Умеренная	17,1 ($\pm 1,9$)	Умеренная
Энрофлоксацин	10,7 ($\pm 0,7$)	Умеренная	25,7 ($\pm 8,9$)	Высокая
Бензилпенициллин	2,8 ($\pm 0,2$)	Низкая	18,5 ($\pm 1,2$)	Умеренная
Оксациллин	0	Отсутствует	0	Отсутствует
Мономицин	10,1 ($\pm 0,3$)	Умеренная	16 ($\pm 0,6$)	Умеренная

Для обоих штаммов зафиксировали чувствительность к 5 из 6 тестируемых антибиотиков. Это открывает для них перспективу их применения в качестве пробиотических при разработке биопрепараторов для аквакультур, так как они не смогут передать патогенным бактериям гены антибиотикорезистентности. С другой стороны, полученные данные делают невозможным прием препарата, содержащего исследуемые штаммы микроорганизмов, во время антибиотикотерапии исследованными антибиотиками (5 из 6). При этом, оба штамма оказались устойчивы к оксациллину, это может быть связано с тем, что штаммы группы *B. cereus* обычно устойчивы к β -лактамным антибиотикам в результате продукции ферментов β -лактамаз, а также большое количество видов этой группы содержат гены устойчивости к антибиотикам [9]. *B. toyonensis* B-13249 относится к этой группе микроорганизмов, вследствие чего, высока вероятность, что данный штамм также располагает генами резистентности к β -лактамным антибиотикам, в том числе к оксациллину, это подтверждается и низкой чувствительностью к бензилпенициллину 2,8 ($\pm 0,2$) мм. Некоторые бактерии группы *B. subtilis*, к которым относится и *B. pumilus* B-13250, также обладают генами резистентности к оксациллину [10].

Таким образом, штаммы *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249 обладают высоким биотехнологическим потенциалом и могут успешно использоваться в составе пробиотика для аквакультуры.

Выводы

1. Штамм *B. pumilus* B-13250 проявил антагонизм к 6 из 10 исследуемых тест-культур, а штамм *B. toyonensis* B-13249 – к 7 из 10. При этом антагонизм по отношению к тест-культурам *Ps. aeruginosa* 6643 B-1295, *B. subtilis* 6644 ATCC 6633 B-654 и *B. cereus* 37 ATCC 10702 B-1367 у обеих бацилл выражен незначительно, а к *E. coli* 6645 ATCC 25922 B-655 антагонистический эффект проявил только *B. toyonensis* B-13249.

2. Штаммы *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249 чувствительны к 5 антибиотикам: олеандомицин, энрофлоксацин, мономицин, цефалексин, бензилпенициллин и не чувствительны к оксациллину.

Библиографический список

1. A Review on Shrimp Aquaculture in India: Historical Perspective, Constraints, Status and Future Implications for Impacts on Aquatic Ecosystem and Biodiversity / M. Salunke, A. Kalyankar, C.D. Khedkar [et al.] // Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. – 2020. – V. 28. – №. 3. – P. 283-302.
2. Aquaculture Production and Its Environmental Sustainability in Thailand: Challenges and Potential Solutions / T. Sampantamit, L. Ho, C. Lachat [et al.] // Sustainability. – 2020. – V. 12. – №. 5. – P. 2010.
3. Effect of a new probiotic on Artemia cysts determined by a convolutional neural network / I.Yu. Evdokimov, A.V. Malkova, A.N. Irkitova [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2024. – V. 12. – №. 1. – P. 91-100.
4. *Vibrio* spp. Control at Brine Shrimp, *Artemia*, Hatchingand Enrichment / J. Interaminense, N.F. Calazans, C.V. Bruna [et al.] // Journal of the World Aquaculture society. – 2014. – V. 45. – №. 1. – P. 65-74.
5. Faridullah M. Prevalence of *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination in shrimp (*Penaeus monodon*) farms, depots and processing plants in different areas of Bangladesh / M. Faridullah, V.C. Roy, U.J. Lithi // Asian Journal of Medical and Biological Research. – 2016. – V. 2. – №. 2. – P. 171-176.
6. Probiotics: Comprehensive Exploration of the Growth Promotion Mechanisms in Shrimps / Jo.X.H. Goh, L.T.-H. Tan, J.W.-F. Law [et al.] // Progress in Microbes and Molecular Biology. – 2023. – V. 6. – №. 1. – a0000324.
7. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health / T. Li, Zh. Wang, J. Guo [et al.] // Science of The Total Environment. – 2023. – V. 860. – e160461.
8. Изучение антибиотикочувствительности нового ризосферного штамма *Bacillus pumilus* B-13250 для возможности использования его в составе пробиотических препаратов для животноводства / Т.Н. Орлова, А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2020. – Т. 183. – №. 1. – С. 111-115.
9. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets / G. Fiedler, C. Schneider, E.O. Igbinosa [et al.] // BMC Microbiology. – 2019. – V. 19. – P. 250.
10. Antibiotic resistance pattern of the allochthonous bacteria isolated from commercially available spices / Év. György, Év. Laslo, M. Antal [et al.] // Food Science Nutrition. – 2021. – V. 9. – P. 4551-4561.