

5. Vladimirov N.I. Innovatsionnye priemy povysheniya myasnoy produktivnosti molodnyaka ovets / N.I. Vladimirov, N.Yu. Vladimirova, P.I. Baryshnikov, O.A. Kuzmin // Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2016. – No. 2 (136). – S. 92-95.

6. Afanaseva A.I. Gormonalnyy status i morfolobiohimicheskie pokazateli krovi yagnyat zapadno-sibirskoy myasnoy porody pri tekhnologicheskom stresse / A.I. Afanaseva, N.Yu. Buts //

Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2012. – No. 8 (94). – S. 84-89.

7. Albegonova R.D. Myasnaya produktivnost grubosherstnykh ovets pri pastbishchnom soderzhanii / R.D. Albegonova, V.I. Ugorets // Izvestiya Gorskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2014. – T. 51. – No. 4. – S. 81-84.

8. Erokhin A.I. O vozraste ovets pri uboe / A.I. Erokhin, E.A. Karasev, S.A. Erokhin // Ovtsy, kozy, sherstyanoe delo. – 2016. – No. 3. – S. 40-43.



УДК 636.084:636.087.9

И.А. Функ, А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова, Д.Е. Дудник
I.A. Funk, A.N. Irkitova, A.V. Grebenschikova, D.Ye. Dudnik

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *BACILLUS PUMILUS*, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В СОСТАВ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF STRAINS OF *BACILLUS PUMILUS* BEING PROMISING FOR INCLUSION IN A PROBIOTIC PRODUCT FOR ANIMALS

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, антагонистическая активность, антагонизм, метод блоков, метод лунок, пробиотики, ветеринария.

Пробиотиками являются живые микроорганизмы, которые улучшают микробный баланс в кишечнике хозяина. Бациллы набирают все большую популярность в производстве пробиотиков для свиней, домашних птиц, телят и других животных. В состав известных на мировой арене пробиотических продуктов для животноводства «Bio Plus2B» и «Microguard» входят виды *Bacillus subtilis* и *B. licheniformis*. В последние годы была также установлена эффективность пробиотиков, содержащих *B. pumilus*, для сельскохозяйственных животных. Так, пробиотик на основе *B. pumilus* T03 подавляет илеит у свиней, вызываемый *Lawsonia intracellularis*, а прием штамма *Bacillus pumilus* 8G-134 коровами способствует снижению частоты субклинического кетоза. На первоначальных этапах отбора штаммов *B. pumilus* для включения в состав пробиотиков для животных важную роль играют исследования *in vitro*. Наши исследования были нацелены на изучение антагонистической активности природного штамма *B. pumilus* B-13250 и коллекционных штаммов *B. pumilus* из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) против *Escherichia coli*. Антимикробное действие бацилл уста-

навливали диффузионными методами определения антагонистической активности – блоков и лунок. Согласно полученным результатам, антагонистическая активность природного штамма *B. pumilus* B-13250 была установлена обоими диффузионными методами, а референтные штаммы *B. pumilus* B-7886 и B-7917 не проявили угнетающего действия на рост *E. coli*. Природный штамм *B. pumilus* B-13250 обладает более выраженным антагонизмом по отношению к *E. coli*, чем коллекционные штаммы. Радиусы зон угнетения роста условно-патогенного микроорганизма при использовании методов блоков и лунок составили $7,3 \pm 1,5$ и $5,3 \pm 0,6$ мм соответственно. Природный штамм *B. pumilus* B-13250 может быть рекомендован для включения в состав пробиотического препарата для животных как антагонист к *E. coli*.

Keywords: *Bacillus pumilus*, antagonistic activity, antagonism, agar blocks method, agar wells method, probiotics, veterinary medicine.

Probiotics are live microorganisms that improve the microbial balance in the host intestines. The use of bacilli in the production of probiotics for pigs, poultry, calves and other animals is gaining popularity. *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* are part of known on the world market of pro-

biotics for animals "Bio Plus2B" and "Microguard". The effectiveness of probiotics containing *B. pumilus* for farm animals has also been revealed in the recent years. The probiotic containing *B. pumilus* T03 strain inhibits pig ileitis caused by *Lawsonia intracellularis*; the decrease in the frequency of subclinical ketosis was observed in cows receiving the *B. pumilus* 8G-134 strain. In vitro researches play an important role in the initial stages of *B. pumilus* strains selection for inclusion in probiotics for animals. Our research was aimed at studying of the antagonistic activity of natural *B. pumilus* B-13250 strain and collection *B. pumilus* strains from Russian National Collection of Industrial Microorganisms against *Escherichia coli*. The antimicrobial effect of the bacilli was established by diffusion methods for determining of antagonistic activity – by the

method of agar blocks and by the method of agar wells. According to the results, the antagonistic activity of the natural *B. pumilus* B-13250 strain was revealed by both diffusion methods; the reference *B. pumilus* B-7886 and B-7917 strains did not show an inhibitory effect on the growth of *E. coli*. The natural *B. pumilus* B-13250 strain has a more pronounced antagonism against *E. coli* than the collection strains. The radii of the growth inhibition zones of a conditionally pathogenic microorganism revealed by the methods of agar blocks and agar wells were 7.3 ± 1.5 mm and 5.3 ± 0.6 mm, respectively. The natural *B. pumilus* B-13250 strain may be recommended for inclusion in the composition of the probiotic products for animals as an antagonist to *E. coli*.

Функ Ирина Андреевна, аспирант, Алтайский государственный аграрный университет; м.н.с., отдел СибНИИС, Федеральный Алтайский научный центр агротехнологий, г. Барнаул. E-mail: funk.irishka@mail.ru.

Ирkitova Алена Николаевна, к.б.н., доцент каф. экологии, биохимии и биотехнологии, Алтайский государственный университет. E-mail: Elen171987@mail.ru.

Гребенщикова Ангелина Владимировна, магистрант, Алтайский государственный университет. E-mail: gelishka96@mail.ru.

Дудник Дина Евгеньевна, магистрант, Алтайский государственный университет. E-mail: dudnik-dina@mail.ru.

Funk Irina Andreyevna, post-graduate student, Altai State Agricultural University; Junior Staff Scientist, Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul. E-mail: funk.irishka@mail.ru.

Irkitova Alena Nikolayevna, Cand. Bio. Sci., Assoc. Prof., Chair of Ecology, Biochemistry and Biotechnology, Altai State University. E-mail: Elen171987@mail.ru.

Grebenshchikova Angelina Vladimirovna, master's degree student, Altai State University. E-mail: gelishka96@mail.ru.

Dudnik Dina Yevgenyevna, master's degree student, Altai State University. E-mail: dudnik-dina@mail.ru.

Введение

Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые улучшают микробный баланс в кишечнике хозяина [1]. В качестве пробиотических культур в ветеринарии чаще всего используют грамположительные бактерии родов *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* и *Streptococcus*. Бациллы набирают все большую популярность в производстве пробиотиков для свиней, домашних птиц, телят и других животных. В состав известных на мировой арене пробиотических продуктов для животноводства «Bio Plus2B» и «Microguard» входят виды *B. subtilis* и *B. licheniformis* [2].

Не менее перспективным микроорганизмом для создания биопрепаратов является *B. Pumilus*, известный за счет продукции антибиотика амикумацина А [3]. Зарубежные авторы установили эффективность пробиотиков, содержащих *B. pumilus*, для сельскохозяйственных животных. Так, пробиотик на основе *B. pumilus* T03 подавлял илеит у свиней, вызываемый *Lawsonia*

intracellularis [4], а прием штамма *B. pumilus* 8G-134 коровами способствовал снижению частоты субклинического кетоза [5].

На первоначальных этапах отбора штаммов *B. pumilus* для включения в состав пробиотиков для животных важную роль играют исследования *in vitro*. Именно в ходе экспериментов вне живых организмов первоначально было установлено, что бактерии вида *B. pumilus* антагонистически активны по отношению к *Staphylococcus aureus*, а также против сальмонелл и *Escherichia coli*, выделенных из продуктов жизнедеятельности кур и свиней [6].

Цель исследования – изучить антагонистическую активность природного и коллекционных штаммов *B. pumilus* по отношению к *E. coli*.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования в данной работе были использованы природный штамм *B. pumilus* B-13250, выделенный из ризосферы цикория [7], а также коллекционные штаммы

B. pumilus: В-7886, В-7917, В-7919 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Тестовой культурой выступал штамм *E. coli* из коллекции микроорганизмов ИЦ «Промбиотех».

Антимикробное действие бацилл устанавливали диффузионными методами определения антагонистической активности – блоков и лунок. О степени антагонистической активности штаммов *B. pumilus* судили по величине радиуса зоны ингибирования роста тест-штамма вокруг агаровых блоков и лунок. Для культур определили среднее арифметическое радиусов зон угнетения роста *E. coli* (М) и среднеквадратичное отклонение (m) [8].

Результаты и их обсуждение

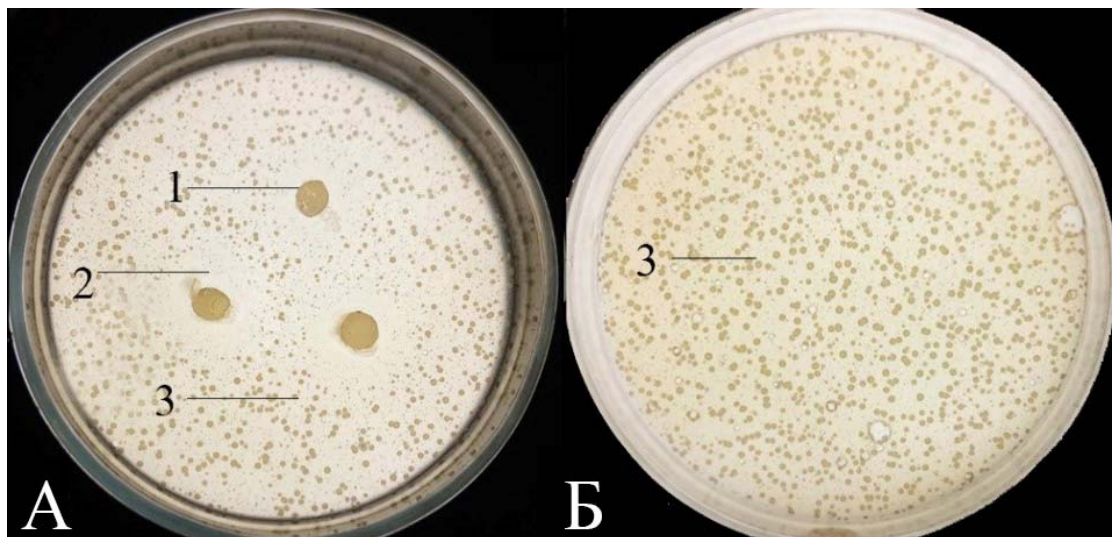
Согласно полученным результатам, антагонистическая активность природного штамма *B. pumilus* В-13250 была установлена обоими диффузионными методами, а референтные штаммы *B. pumilus* В-7886 и В-7917 не проявили угнетающего действия на рост *E. coli* (табл.). Это может быть обусловлено тем, что в пуле штаммов В-7886 и В-7917 может просто отсутствовать антибиотик, эффективный по отношению к *E. coli*.

Штамм *B. pumilus* В-7919 также проявил себя в обоих методах определения отсроченного антагонизма, как и новый штамм, однако зоны блокирования роста *E. coli* штаммом *B. pumilus* В-13250 оказались максимальными (рис.).

Таблица

Радиусы зон угнетения (мм (M±m)) роста *E. coli* штаммами *B. Pumilus*

Методы	Штаммы			
	<i>B. pumilus</i> В-13250	<i>B. pumilus</i> В-7886	<i>B. pumilus</i> В-7917	<i>B. pumilus</i> В-7919
Блоков	7,3±1,5	0	0	1,1±0,1
Лунок	5,3±0,6	0	0	2,7±0,6



**Рис. Антагонистическая активность *B. pumilus* В-13250 в отношении *E. coli*:
А – метод блоков, Б – контроль; 1 – штамм-антагонист,
2 – зона ингибирования, 3 – тест-культура**

То, что ризосферный штамм *B. pumilus* B-13250 характеризуется более высокой антагонистической активностью по сравнению с коллекционными штаммами, может быть связано с тем, что данный штамм является природным и, следовательно, более стабильным. Это обусловлено тем, что в условиях высокой плотности микроорганизмов на поверхности корней происходит постоянная борьба за существование, что ведет к развитию различных механизмов подавления конкурентов. Также, в отличие от типовых штаммов, штамм *B. pumilus* B-13250 был выделен недавно и еще не утратил эффективность в лабораторных условиях.

На основании вышеизложенных данных природный штамм *B. pumilus* B-13250 может быть рекомендован для включения в состав пробиотического препарата для животных как антагонист к *E. coli*.

Выводы

Природный штамм *B. pumilus* B-13250 обладает более выраженным антагонизмом по отношению к *E. coli*, чем коллекционные штаммы. Радиусы зон угнетения роста условно-патогенного микроорганизма при использовании методов блоков и лунок составили $7,3 \pm 1,5$ и $5,3 \pm 0,6$ мм соответственно.

Библиографический список

1. Yirga, H. (2015). The Use of Probiotics in Animal Nutrition. *Journal of Probiotics & Health*. 3 (2): 1000132.
2. Markowiak, P., Slizewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*. 10:21.
3. Ефременкова, О. В. Антимикробные свойства амикуматина А / О. В. Ефременкова, Н. И. Габриэлян, И. А. Маланичева [и др.]. – Текст: непосредственный // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – № 62 (1). – С. 16-19.
4. Opriessnig, T., Karuppanan, A.K., Beckler, D., Ait-Ali, T., Cubas-Atienzar, A.I., Halbur, P.G. (2019). *Bacillus pumilus* probiotic feed supplementation mitigates *Lawsonia intracellularis*

shedding and lesions. *Veterinary Research*. 50 (1): 85.

5. Luan, S., Duersteler, M., Galbraith, E.A., Cardoso, F.C. (2015). Effects of direct-fed *Bacillus pumilus* 8G-134 on feed intake, milk yield, milk composition, feed conversion, and health condition of pre- and postpartum Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 98 (9): 6423-6432.

6. Chu, J., Wang, Y., Zhao, B., Zhang, X.M., Liu, K., Mao, L., Kalamiyets, E. (2019). Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103 (20): 8375-8381.

7. Патент России № 2694522. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* ВКПМВ-13250, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis* / Иркитова А. Н., Гребенщикова А. В. – 2019. – Бюл. 20. – Текст: непосредственный.

8. Irkitova, A.N., Grebenshchikova, A.V. (2018). Antimicrobial action of a bacterial consortium containing strains of the genus *Bacillus*. *Ukrainian Journal of Ecology*. 8 (4), 444-449.

References

1. Yirga, H. (2015). The Use of Probiotics in Animal Nutrition. *Journal of Probiotics & Health*. 3 (2): 1000132.
2. Markowiak, P., Slizewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*. 10:21.
3. Efremenkova, O.V. Antimikrobnye svoystva amikumatsina A / O.V. Efremenkova, N.I. Gabrielyan, I.A. Malanicheva, T.A. Efimenko, I.G. Sumarukova, A.A. Glukhova, Yu.V. Boykova, E.A. Rogozhin, A.M. Korolev, V.A. Korshun, I.V. Drabkina // *Antibiotiki i khimioterapiya*. – 2017. – No. 62 (1). – S. 16-19.
4. Opriessnig, T., Karuppanan, A.K., Beckler, D., Ait-Ali, T., Cubas-Atienzar, A.I., Halbur, P.G. (2019). *Bacillus pumilus* probiotic feed supplementation mitigates *Lawsonia intracellularis* shedding and lesions. *Veterinary Research*. 50 (1): 85.

5. Luan, S., Duersteler, M., Galbraith, E.A., Cardoso, F.C. (2015). Effects of direct-fed *Bacillus pumilus* 8G-134 on feed intake, milk yield, milk composition, feed conversion, and health condition of pre- and postpartum Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 98 (9): 6423-6432.

6. Chu, J., Wang, Y., Zhao, B., Zhang, X.M., Liu, K., Mao, L., Kalamiyets, E. (2019). Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103 (20): 8375-8381.

7. Irkitova, A.N., Grebenshchikova, A.V. Shtamm bakteriy *Bacillus pumilus* VKPMV-13250, obladayushchiy vyrazhennym antagonizmom po odnosheniyu k mikroorganizmam *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis* // Patent Rossii No. 2694522. 2019. Byul. 20.

8. Irkitova, A.N., Grebenshchikova, A.V. (2018). Antimicrobial action of a bacterial consortium containing strains of the genus *Bacillus*. *Ukrainian Journal of Ecology*. 8 (4), 444-449.

