

Альбина Ивановна Решетникова

Якутский НИИ сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова – обособленное подразделение ФНЦ Якутский научный центр СО РАН, Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия
alli24.97@yandex.ru

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИКРОБИОТЫ ДИКИХ КОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ ЯКУТИИ

Цель исследования – изучение антагонистической активности шести коллекционных штаммов бактерий *B. subtilis* в отношении *S. aureus*, *E. coli* и *S. enteritidis* с целью отбора перспективных штаммов в качестве основы пробиотической кормовой добавки. Впервые изучена антагонистическая активность шести новых штаммов бактерий *B. subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных Якутии. Антагонистическую активность штаммов бактерий *B. subtilis* определяли методом отсроченного антагонизма с использованием перпендикулярных штрихов. В качестве тест-культур использовали два изолята *S. aureus* spp.: изолят *E. coli* spp. и *S. enteritidis* 13076. Исследования по отбору перспективных штаммов в качестве основы пробиотической кормовой добавки проведены в два этапа: 1-й этап – исследования антагонистической активности шести штаммов бактерий, из которых выбраны наиболее сильные антагонисты по отношению к условно-патогенным микроорганизмам; 2-й этап – посев на экспериментальную питательную среду и оценка влияния ее на антагонистическую активность отобранных штаммов бактерий *B. subtilis* в отношении двух изолятов *S. aureus*. Активность штаммов *B. subtilis* оценивалась по зоне угнетения роста условно-патогенных микроорганизмов. Исследуемые штаммы бактерий *B. subtilis* продемонстрировали выраженный антагонизм, варьирующий от 8 до 18 мм против изолятов *Staphylococcus aureus* spp., менее выраженный – от 2 до 7 мм против изолята *E. coli* spp. и отсутствие или проявление слабого антагонизма (от 0,5 до 1 мм) против *S. enteritidis* 13076. На основании полученных данных для разработки пробиотической добавки отобраны два перспективных штамма бактерий: *B. subtilis* 11-4/1к и *B. Subtilis* 27-7/1п. Штаммы бактерий *B. subtilis* 27-7/1п и *B. subtilis* 11-4/1к прошли международное патентное депонирование в Биоресурсном центре – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БЦР ВКПМ) национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Штаммам бактерий присвоены регистрационные номера: *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 (дата депонирования 06.09.2024), *B. subtilis* 11K VKPM B – 14816 (дата депонирования 06.09.2024).

Ключевые слова: антагонистическая активность штаммов бактерий, метод перпендикулярных штрихов, штаммы бактерий, *B. subtilis*, *S. aureus* spp., *E. coli* spp., *S. enteritidis*, пробиотические добавки

Для цитирования: Решетникова А.И. Антагонистическая активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных Якутии // Вестник КрасГАУ. 2025. № 4. С. 201–211. DOI: 10.36718/1819-4036-2025-4-201-211.

Благодарности: автор выражает искреннюю признательность своему научному руководителю Н.П. Тарабукиной и научному наставнику М.П. Неустроеву за ценные советы, конструктивную критику и профессиональное руководство в ходе исследования. Особая благодарность коллегам за их помощь и сотрудничество.

Albina Ivanovna Reshetnikova

Yakutsk Research Institute of Agriculture named after M.G. Safronov – a separate division of the FSC Yakutsk Scientific Center of the SB RAS, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia
alli24.97@yandex.ru

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM THE MICROBIOTA OF WILD UNGULATES OF YAKUTIA

The aim of the study is to investigate the antagonistic activity of six collection strains of B. subtilis bacteria against S. aureus, E. coli, and S. enteritidis in order to select promising strains as the basis for a probiotic feed additive. The antagonistic activity of six new strains of B. subtilis bacteria isolated from the microbiota of wild ungulates in Yakutia was studied for the first time. The antagonistic activity of B. subtilis bacterial strains was determined by the delayed antagonism method using perpendicular streaks. Two isolates of S. aureus spp. were used as test cultures: isolate of E. coli spp. and S. enteritidis 13076. The studies to select promising strains as the basis for a probiotic feed additive were carried out in two stages: Stage 1 – studies of the antagonistic activity of six bacterial strains, from which the most powerful antagonists against opportunistic microorganisms were selected; Stage 2 – sowing on an experimental nutrient medium and assessing its effect on the antagonistic activity of the selected strains of B. subtilis bacteria in relation to two isolates of S. aureus. The activity of B. subtilis strains was assessed by the zone of inhibition of growth of opportunistic microorganisms. The studied strains of B. subtilis bacteria demonstrated pronounced antagonism, varying from 8 to 18 mm against isolates of Staphylococcus aureus spp., less pronounced – from 2 to 7 mm against the isolate of E. coli spp. and the absence or manifestation of weak antagonism (from 0.5 to 1 mm) against S. enteritidis 13076. Based on the obtained data, two promising bacterial strains were selected for the development of a probiotic supplement: B. subtilis 11-4/1k and B. subtilis 27-7/1l. The bacterial strains B. subtilis 27-7/1l and B. subtilis 11-4/1k have undergone international patent deposition at the Bioresource Center – All-Russian Collection of Industrial Microorganisms (BCR VKPM) of the National Research Center Kurchatov Institute. The bacterial strains have been assigned registration numbers: B. subtilis 27L VKPM B-14800 (deposit date 09/06/2024), B. subtilis 11K VKPM B – 14816 (deposit date 09/06/2024).

Keywords: antagonistic activity of bacterial strains, perpendicular streak method, bacterial strains, *B. subtilis*, *S. aureus* spp., *E. coli* spp., *S. enteritidis*, probiotic supplements

For citation: Reshetnikova Al. Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* bacterial strains isolated from the microbiota of wild ungulates of Yakutia. *Bulletin of KSAU*. 2025;(4):201-211. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2025-4-201-211.

Acknowledgments: the author expresses his sincere gratitude to his scientific supervisor N.P. Tarabukina and scientific mentor M.P. Neustroev for valuable advice, constructive criticism and professional guidance during the research. Special thanks to colleagues for their assistance and cooperation.

Введение. В современном животноводстве одной из значимых проблем являются заболевания, связанные с нарушением микробиоценоза желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у молодняка и взрослого скота, вызванные условно-патогенными и патогенными бактериями. Для профилактики и лечения в рацион добавляют пробиотические добавки и пробиотики, содержащие полезные микроорганизмы, которые нормализуют микрофлору ЖКТ животных. Кормовые пробиотики также служат заменой антибиотикам-проторам роста, запрет на которые начал дей-

ствовать по всей территории Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и зафиксирован в Регламенте (ЕС) № 1831/2003 с 2006 г. В России использование антибиотиков для стимуляции роста животных также запрещено. Это установлено Федеральным законом от 30.12.2021 № 463-ФЗ «О внесении изменений в Закон Российской Федерации «О ветеринарии» и Федеральным законом «Об обращении лекарственных средств».

Антибиотические препараты в течение многих лет использовались у животных для профи-

лактики и лечения болезней и играли жизненно важную роль в качестве стимуляторов роста в животноводстве. Тем не менее чрезмерное и неправильное использование противомикробных препаратов в кормах для скота привело к устойчивости организма к лекарственным препаратам, что стало угрожать здоровью как животных, так и человека. Во всем мире появились множественные лекарственно-устойчивые патогены. Устойчивые бактерии у животных могут прямо или косвенно попадать к человеку через пищу, воду, грязь и навоз, которые используют в качестве удобрений. На самом деле, существуют неопровержимые доказательства того, что продукты питания из многих животных источников и на всех этапах их обработки содержат большое количество устойчивых бактерий. Гомологичные взаимосвязи между лекарственно-устойчивыми бактериями у человека и животных были выявлены у наиболее распространенных пищевых патогенов, таких как кишечная палочка и сальмонелла, различные типы энтерококков и метициллин-резистентных золотистых стафилококков [1–3].

Во всем мире, в том числе России, стали активно разрабатывать и внедрять кормовые добавки на основе пробиотиков, как альтернативу антибиотиков. Пробиотические кормовые добавки состоят из живых непатогенных микроорганизмов или продуктов их ферментации. К пробиотическим микроорганизмам относят:

- бактерии, продуцирующие молочную и пропионовую кислоты (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*);
- непатогенные бактерии рода *Escherichia* (*E. coli* M-17);
- дрожжи (*Saccharomyces*, *Candida*);
- термофильные стрептококки (*Streptococcus*);
- спорообразующие бактерии (*Bacillus*, *Clostridium*).

Пробиотические добавки разнообразны по своему составу, но условно их классифицируют:

- на монокомпонентные препараты, содержащие один штамм бактерий;
- самоэлиминирующиеся антагонисты, к которым относятся представители рода *Bacillus*, главным образом *B. subtilis*, *B. Licheniformis*;
- комбинированные препараты, состоящие из нескольких штаммов бактерий (поликомпо-

нентные) или включающие добавки, усиливающие их действие;

- иммобилизованные на сорбенте (сорбированные) живые бактерии [4].

Для того чтобы быть включенными в группу пробиотиков, микроорганизмы должны соответствовать следующим критериям: предлагаемые для производства штаммы должны быть выделены от природных субстратов; идентифицированы до вида по фено- и генотипическим признакам; иметь генетический паспорт; штаммы должны обладать широким спектром антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; не должны угнетать нормальный микробиоценоз; оказывать положительный эффект на организм хозяина, например увеличивать противоионфекционную резистентность; иметь в своем составе жизнеспособные клетки или продукты их метаболизма; обладать способностью к выживанию и жизнедеятельности в условиях кишечного микроокружения, например микроорганизм должен быть резистентен к низким значениям pH и органическим кислотам, к высокому содержанию желчи, солей натрия; должны быстро размножаться и/или адгезироваться на эпителиальных клетках кишечника с последующей колонизацией; должны быть непатогенными и нетоксичными, безопасными для людей, включая иммунологическую безопасность; производственные штаммы должны быть стабильны по биологической активности, сохранять жизнеспособные бактерии в течение длительного срока хранения и удовлетворять технологическим требованиям [5].

В последние годы все большее внимание уделяется использованию спорообразующих бактерий, особенно из рода *Bacillus*, в качестве пробиотических культур. Эти грамположительные, аэробные и спорообразующие микроорганизмы находят широкое применение в сельском хозяйстве, включая производство пробиотиков и ферментов. Одним из наиболее продуктивных видов-антагонистов среди бацилл является *Bacillus subtilis*, который синтезирует более 65 антимикробных соединений. Его антагонистическая активность охватывает грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также вирусы и грибы [6].

Bacillus subtilis не является патогенным для человека микроорганизмом, не содержит эндо-

токсинов и считается подходящим для квалифицированного статуса презумпции безопасности (QPS) Европейского органа по безопасности пищевых продуктов. *Bacillus subtilis* классифицируется как «общепризнанно безопасная бактерия» (GRAS), что позволяет использовать его в качестве безопасного пищевого продукта [7, 8].

Российскими учеными разработано более двадцати пяти пробиотических добавок на основе *B. subtilis* для кормления сельскохозяйственных животных. К ним относятся: «Ветом», «Ветоспорин-Ж», «Карбитокс», «Субтиспорин», «Энзимспорин», «Ветастар» и другие [9]. Их применение значительно улучшает здоровье и продуктивность сельскохозяйственных животных, что является ключевым фактором для устойчивого развития животноводства. Одним из важнейших аспектов применения *Bacillus subtilis* является улучшение пищеварения за счет оптимизации процессов ферментации и усвоения питательных веществ в организме животных.

Кроме того, использование добавок с *Bacillus subtilis* способствует укреплению иммунной системы, что особенно важно для молодняка, еще не обладающего полноценным иммунитетом. За счет стимулирующего воздействия на иммунные клетки, такие как макрофаги и лимфоциты, эти бактерии помогают животным более эффективно противостоять различным инфекциям и стрессовым ситуациям [10, 11]. В конечном итоге это приводит к снижению заболеваемости и смертности среди животных, а также к уменьшению необходимости использования лекарственных препаратов, что в свою очередь снижает риск возникновения резистентных штаммов патогенов.

Не менее важным аспектом является влияние пробиотических добавок на общее состояние и продуктивность животных. Регулярное применение кормовых добавок на основе *Bacillus subtilis* способствует улучшению аппетита, скорейшему набору массы и повышению удоя у коров. Кроме того, улучшаются качественные характеристики продукции, такие как содержание белка и жира в молоке, а также органолептические свойства мяса. Это делает пробиотики неотъемлемой частью современных технологий в области кормления и содержания скота [12–15].

Кормовые пробиотики на основе *Bacillus subtilis*, например такие как «Сахабактисубтил», разработанный Якутским НИИСХ, представляют собой эффективное и безопасное средство для повышения здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных. Это позволяет не только решать актуальные проблемы, связанные с заболеваниями ЖКТ и коррекцией микробиоценоза, но и способствует развитию устойчивого и экологически чистого животноводства [16,17].

Поиск, селекция и отбор штаммов бактерий *B. subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных, представляет научный и практический интерес для разработки пробиотических кормовых добавок.

Цель исследования – изучение антагонистической активности шести коллекционных штаммов бактерий *B. subtilis* в отношении *S. aureus*, *E. coli* и *S. enteritidis* с целью отбора перспективных штаммов в качестве основы пробиотической кормовой добавки.

Задачи: изучить антагонистическую активность шести коллекционных штаммов бактерий *B. subtilis* в отношении условно-патогенных микроорганизмов; оценить влияние новой среды на антагонистическую активность штаммов бактерий *B. subtilis* в отношении двух изолятов *S. aureus spp.*; отбор перспективных штаммов бактерий *B. subtilis* для конструирования кормовой добавки.

Объекты и методы. Исследование проведено на базе лаборатории по разработке микробных препаратов Якутского НИИСХ им. М.Г. Сафронова. Изучены антагонистические активности шести штаммов бактерий *B. subtilis* из рабочей коллекции микроорганизмов лаборатории по разработке микробных препаратов под следующими наименованиями: *B. subtilis* 24-23к, *B. subtilis* 27-7/1л, *B. subtilis* 36-3/1L, *B. Subtilis* 5-1/2к, *B. subtilis* 11-4/1к и *B. subtilis* 3-1/1к, – выделенных из микробиоты диких копытных животных Якутии. Исследуемые штаммы бактерий *B. subtilis* молекулярно-генетически идентифицированы в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск).

В качестве тест-культур использованы изоляты *S. aureus spp.* (*S. aureus* 3.5 *spp.* выделен из абортрованного плода жеребенка, *S. aureus*

A spp. выделен из микробиоты дикой перелетной птицы), изолят *E. coli A spp.* (выделен из микробиоты дикой перелетной птицы) и штамм бактерий *Salmonella enteritidis* 13076.

Антагонистическую активность штаммов бактерий *B. subtilis* в отношении условно-патогенных микроорганизмов, таких как *S. aureus*, *E. coli* и *S. enteritidis*, исследовали методом перпендикулярных штрихов в соответствии с МУК 4.2.2602-10 «Методические указания по системе предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов: отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков».

Исследования по отбору перспективных штаммов в качестве основы пробиотической кормовой добавки проведены в два этапа:

1-й этап состоит из исследований антагонистической активности шести штаммов бактерий *B. Subtilis*, из которых выбраны наиболее сильные антагонисты условно-патогенных микроорганизмов;

2-й этап – посев на экспериментальную питательную среду и оценка влияния ее на антагонистическую активность отобранных штаммов бактерий *B. subtilis* в отношении двух изолятов *S. aureus spp.*

Экспериментальная среда состоит из 3 %-го овсяного отвара с добавлением 1 % NaCl. На данную питательную среду получен патент РФ на изобретение RU2822434C1 «Питательная среда для культивирования штаммов бактерий

Bacillus subtilis ТНП-3 и *Bacillus subtilis* ТНП-5». Разработанная питательная среда представляет собой безотходную технологию получения кормовой добавки (питательная среда + *B. Subtilis* – готовая кормовая добавка). Оценивали возможности создания кормовых добавок по данной технологии, в соответствии с чем изучили влияние среды на антагонистическую активность отобранных четырех штаммов бактерий *B. subtilis* в отношении к *S. aureus*.

Метод перпендикулярных штрихов. Из 3-суточных культур *B. subtilis* готовили взвесь по стандарту мутности 10 МЕ и высевали ее штрихом по диаметру чашки Петри на подсушенный в течение 24 ч мясопептонный агар (МПА). Культивировали при температуре 37 °С в течение 48 ч. Затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры бацилл подсеивали суточные тест-культуры по стандарту мутности, равные 5 МЕ. Чашки вновь культивировали при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Учет результатов антагонистической активности производили по зоне ингибирования тест-культур на границе со штрихом роста *Bacillus*. Зоны ингибирования измерялись с помощью линейки, и их размеры фиксировались для дальнейшего анализа. Контролем роста тест-культур *S. aureus*, *E. coli* и *S. enteritidis* служили параллельные посевы на чашки Петри без исследуемых штаммов бактерий *B. subtilis*.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты исследования антагонистической активности штаммов бактерий *B. subtilis*
Results of the study of antagonistic activity of *B. subtilis* bacterial strains

Исследуемый штамм бактерий <i>B. subtilis</i>	Зона задержки роста тест-штаммов, мм			
	<i>S. aureus A spp.</i>	<i>S. aureus 3.5 spp.</i>	<i>E. coli A spp.</i>	<i>S. enteritidis 13076</i>
24-23/к	17	8	7	–
27-7/1л	14	13	6	–
36-3/1L	12	17	3	1
5-1/2к	11	13	7	1
11-4/1к	18	15	7	0,5
3-1/1к	12	11	2	1

Представленные в таблице 1 параметры зоны задержки роста показывают, что штаммы бактерий *B. subtilis* обладают различной степенью антагонистической активности по отноше-

нию к исследуемым тест-культурам *Staphylococcus aureus spp.*, *Escherichia coli spp.* и *Salmonella enteritidis 13076*.

Антагонизм в отношении *Staphylococcus aureus* A spp. проявился в зонах задержки роста от 11 до 18 мм. Наибольший эффект наблюдался у штамма бактерий *B. subtilis* 11-4/1к (18 мм), в то время как штамм бактерий *B. subtilis* 5-1/2к показал наименьшую зону задержки роста (11 мм).

При тестировании на *Staphylococcus aureus* 3.5 spp. результаты варьировали от 8 до 17 мм. Наибольшую зону задержки роста показал штамм бактерий *B. subtilis* 36-3/1L (17 мм), в то время как самый низкий показатель – у штамма бактерий *B. subtilis* 24-23/к (8 мм).

Для *Escherichia coli* A spp. результаты оказались наиболее неоднородными, с зонами задержки роста от 2 до 7 мм. Максимальная задержка роста зафиксирована у штаммов бактерий *B. subtilis* 24-23/к, *B. subtilis* 5-1/2к и *B. Subtilis* 11-4/1к (7 мм), в то время как минимальная – у штамма бактерий *B. subtilis* 3-1/1к (2 мм).

Антагонизм по отношению к *S. enteritidis* 13076 у штаммов бактерий *B. subtilis* отсутствует или проявляется в слабой степени (от 0,5 до 1 мм). Отсутствие антагонизма к *S. enteritidis* можно объяснить утратой качественных свойств при длительном культивировании на селективных средах по сравнению со свежeweделенными изолятами. Это указывает на то, что не все штаммы *B. subtilis* одинаково эффективны против всех патогенных микроорганизмов и что существуют определенные ограничения в их использовании.

Результаты нашего исследования подтверждают данные, представленные в научной литературе, где указано, что штаммы бактерий *B. subtilis* демонстрируют выраженную антагонистическую активность в отношении различных патогенных микроорганизмов, включая *S. aureus* и *E. coli*. В работе А.А. Леяк с соавторами [18] сообщается о высокой эффективности природных сибирских штаммов бактерий *Bacillus Subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus licheniformis* в подавлении роста *S. aureus*, что согласуется с нашими наблюдениями.

Антагонистическая активность *B. subtilis* в отношении *Escherichia coli* может варьироваться от средней или слабой выраженности до полного отсутствия согласно данным литературы. *E. coli* является естественным представителем нормальной флоры кишечника, и его влияние на здоровье может зависеть от серотипа [19, 20]. Эти данные согласуются с нашими результатами, которые также показывают, что антагонис-

тическая активность *B. subtilis* по отношению к *E. coli* может быть менее выраженной.

Известно, что штаммы бактерий *B. subtilis* 2СП В-14405 и *B. subtilis* 5СП В-14406, аналогично выделенные из микробиоты диких животных Якутии и обладающие амилазной и ксиланазной активностями, также демонстрировали выраженный антагонизм против *S. aureus*. Что касается *Sal. abortus equi*, *Sal. enterica* и *E. coli*, антагонистическое действие не наблюдалось, за исключением небольших зон угнетения размером 1–2 мм, что схоже с нашими данными [21].

Исходя из полученных данных, выбраны четыре штамма бактерий *B. subtilis*: *B. subtilis* 27-7/1л, *B. subtilis* 36-3/1L, *B. subtilis* 5-1/2к, *B. subtilis* 11-4/1к для следующего этапа опытов. Исключили *B. subtilis* 24-23/к и *B. subtilis* 3-1/1к из-за низких показателей по *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Отобранные штаммы бактерий *B. subtilis* культивировали на экспериментальной жидкой среде в шейкер-инкубаторе «ES-20» при скорости вращения 230 об/мин и температуре 37 °С в течение 72 ч. После этого культуры пересеивали штрихом на мясопептонный агар в чашках Петри и инкубировали в течение 24 ч. Готовили взвеси тест-культур и аналогичным образом пересеивали перпендикулярными штрихами к выросшим культурам *B. subtilis*, оценивая их антагонистические активности по отношению к двум изолятам *S. aureus*. Результаты антагонистической активности штаммов бактерий *B. Subtilis*, выращенных на жидкой экспериментальной среде, представлены в таблице 2.

Анализируя результаты антагонистической активности штаммов *Bacillus subtilis*, выращенных на 3 % овсяном отваре с добавлением 1 % NaCl, можно отметить, что все исследуемые штаммы продемонстрировали выраженный антагонизм в отношении обеих *Staphylococcus aureus* от 10 до 13 мм. Наиболее выраженный эффект наблюдается у штамма бактерий *B. subtilis* 27-7/1л, который проявляет задержку обоих тест-штаммов на уровне 12 мм. Это свидетельствует о его сильных антагонистических свойствах и, возможно, наличии в его метаболических продуктах антимикробных соединений. В то же время меньшие зоны задержки роста у других штаммов, таких как *B. subtilis* 36-3/1L и *B. subtilis* 5-1/2к, показывают, что не все штаммы обладают одинаковой активностью.

**Антагонистические активности штаммов бактерий выращенных
на 3 % овсяном отваре с добавлением 1 % NaCl**
Antagonistic activity of bacterial strains grown on 3 % oat broth with the addition of 1 % NaCl

Исследуемый штамм <i>Bacillus subtilis</i>	Зоны задержки роста тест-культур, мм	
	<i>Staphylococcus aureus</i> A spp.	<i>Staphylococcus aureus</i> 3.5 spp.
27-7/1л	12	12
36-3/1L	10	13
5-1/2к	10	13
11-4/1к	11	13

Однако стоит отметить, что подавляющее воздействие штаммов бактерий *Bacillus subtilis* на *Staphylococcus aureus* 3.5 spp. (12–13 мм) в целом выше, чем на *Staphylococcus aureus* A spp. (10–12 мм). Это может свидетельствовать о разной восприимчивости этих возбудителей к антагонистическим веществам, продуцируемым штаммами *Bacillus subtilis*.

Эти результаты поднимают интересные вопросы о механизмах антагонистической активности штаммов *B. subtilis*. Из представленных данных сделан вывод, что экспериментальная питательная среда не стимулирует выработку метаболитов, ответственных за антагонизм. Работа по разработке питательных сред продолжается, поскольку улучшение условий выращивания и оптимизация состава питательных сред могут повысить эффективность штаммов.

Исследование С.А. Лазарева с соавторами [22] рассматривает влияние источников белка и углеводов на рост и функциональные свойства двух штаммов пробиотических бактерий *B. Subtilis*, обладающих высокой антагонистической активностью в отношении условно-патогенных микроорганизмов. В работе анализируются штаммы *B. subtilis* 1719 и *B. subtilis* 3Н. Оптимальный состав питательной среды оказывает значительное влияние на биосинтетическую активность и накопление вторичных метаболитов. На основе экспериментов был разработан питательный состав, обеспечивающий максимальный выход биомассы и антимикробную активность вторичных метаболитов.

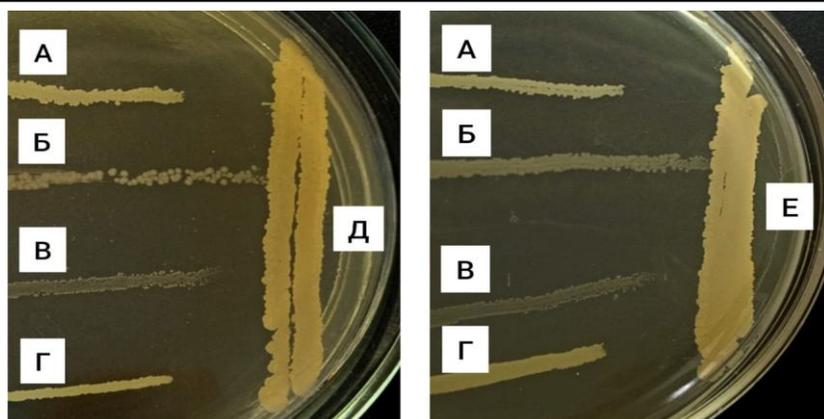
Авторы также исследовали антимикробные и ферментативные свойства метаболитов, полученных в результате глубокого культивирования штаммов *B. subtilis* 1719 и *B. subtilis* 3Н. Было обнаружено, что антимикробная активность ме-

таболитов сосредоточена во фракции с молекулярной массой менее 5 кДа и проявляет специфические особенности для каждого штамма. Метаболиты *B. subtilis* 3Н наиболее активны в отношении бактерий *S. aureus* FDA 209P и *C. albicans* 927, в то время как метаболиты *B. subtilis* 1719 демонстрируют наибольшую активность в отношении тестируемых штаммов *P. mirabilis* 24а и *E. coli* ATCC 25922 [23].

Данные, представленные авторами, демонстрируют актуальность разработки питательных сред для *B. subtilis*. Наши исследования согласуются с этими результатами, поскольку и другие ученые рассматривают аналогичные вопросы, связанные с культивированием и улучшением свойств микроорганизмов.

Исходя из полученных данных, выбраны два перспективных штамма бактерий: *B. subtilis* 11-4/1к и *B. subtilis* 27-7/1л, которые продемонстрировали наибольшую антимикробную активность против *Staphylococcus aureus* и средние показатели против *Escherichia coli*, как показано на рисунке.

Полученные данные, отраженные на рисунке, демонстрируют антагонистическую активность штаммов бактерий *B. subtilis* 27-7/1л и *B. subtilis* 11-4/1к как перспективных для разработки пробиотических добавок. Эти штаммы прошли международное патентное депонирование в Биоресурсном центре – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БЦР ВКПМ) Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Международным депозитарным органом штаммам бактерий присвоены регистрационные номера: *B. subtilis* 27L VKPM В-14800, дата депонирования 06.09.2024, *B. subtilis* 11K VKPM В – 14816, дата депонирования 06.09.2024.



Антагонистическая активность штаммов бактерий *B. subtilis* 27-7/1л и *B. subtilis* 11-4/1к:
 А – *Staphylococcus aureus* 3.5 spp.; Б – *Salmonella enteritidis* 13076; В – *Escherichia coli* A spp.;
 Г – *Staphylococcus aureus* A spp.; Д – *B. subtilis* 27-7/1л; Е – *B. subtilis* 11-4/1к

Antagonism of promising bacterial strains *B. subtilis* 27-7/1l and *B. subtilis* 11-4/1k: A – *Staphylococcus aureus* 3.5 spp.; Б – *Salmonella enteritidis* 13076; В – *Escherichia coli* A spp.; Г – *Staphylococcus aureus* A spp.; Д – *B. subtilis* 27-7/1l; Е – *B. subtilis* 11-4/1k

Таким образом, результаты представленных исследований подтверждают высокий потенциал штаммов бактерий *B. subtilis* для использования в составе пробиотических кормовых добавок.

Заключение. Полученные в ходе исследования результаты показывают, что штаммы бактерий *B. subtilis*, выделенные из микробиоты диких копытных животных Якутии, обладают значительным потенциалом в борьбе с *S. aureus* и *E. coli*. При проведении опытов по определению антагонистической активности шести штаммов бактерий *B. subtilis* отмечена высокая (от 11 до 18 мм) и средняя (8 мм) активность против *St. aureus* spp., а также средняя (6–7 мм) и слабая (2 мм) активность против *E. coli* spp. и отсутствие антагонизма по отношению к *S. enteritidis* 13076: у штаммов бактерий *B. subtilis* антагонизм отсутствует или проявляется в слабой степени (от 0,5 до 1 мм).

Для дальнейшего изучения выбрали два перспективных штамма бактерий: *B. subtilis* 11-4/1к и *B. subtilis* 27-7/1л, которые показали наибольшую антимикробную активность против *Staphylococcus aureus* и средние показатели против *Escherichia coli*. Эти штаммы представляют большой интерес для разработки пробиотической добавки, поскольку их антагонистические свойства наиболее стабильны независимо от влияния сред для повышения устойчивости животных к инфекционным заболеваниям.

Разработка пробиотических добавок на основе *B. subtilis*, выделенных из микробиоты ди-

ких копытных животных Якутии, представляет собой перспективное направление, способствующее повышению безопасности и качества продуктов питания, а также улучшению общего здоровья животных. Пробиотики играют важную роль в поддержании нормального баланса микрофлоры кишечника, что влияет на пищеварение и усвоение питательных веществ.

Потенциал *B. subtilis* также включает в себя их способность к продукции бактерицидных веществ, таких как антибиотики и антимикробные пептиды, которые могут быть использованы для создания новых биопрепаратов. Эти свойства делают штаммы *B. subtilis* выгодными не только с точки зрения снижения заболеваемости животных, но и с точки зрения повышения производительности животноводства. Эффективное использование пробиотических добавок может привести к улучшению прироста массы животных, повышению их стойкости к стрессовым условиям и улучшению качества мясных и молочных продуктов.

Результаты нашего исследования подчеркивают важность изучения штаммов *B. subtilis* как перспективных кандидатов для разработки пробиотических добавок. Их применение может стать значимым вкладом в устойчивое развитие животноводства и обеспечение безопасности продуктов питания, что особенно актуально в условиях растущего спроса на экологически чистые и безопасные продукты.

Список источников

1. Kim S.W., Less J.F., Wang L., et al. Meeting global feed protein demand: challenge, opportunity, and strategy // Annual review of animal biosciences. 2019. Vol. 7, № 1. P. 221–243. DOI: 10.1146/annurev-animal-030117-014838.
2. Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., et al. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? // Evolutionary applications. 2015. Vol. 8, № 3. P. 240–247. DOI: 10.1111/eva.12185.
3. Barour D., Berghiche A., Boulebda N. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria // Veterinary World. 2019. Vol. 12, № 8. P. 1195. DOI: 10.14202/vetworld.2019.1195-1203.
4. Решетникова А.И., Тарабукина Н.П. Актуальность разработки безотходной технологии в производстве пробиотической кормовой добавки. В сб.: Республиканская научная конференция «Аспирантские чтения–2023», Якутск, 23 ноября 2023 г. Якутск: СВФУ, 2024. С. 98–100. EDN: IEBJEL.
5. Чижаева А.В., Дудикова Г. Н. Научный обзор: теоретические и практические аспекты конструирования пробиотических препаратов // Научное обозрение. Биологические науки. 2017. № 2. С. 157–166. EDN: YNWPMX.
6. Гребенщикова А. В. Изучение антагонистической активности бактериальных консорциумов на основе штаммов *Bacillus subtilis* // Труды молодых ученых Алтайского государственного университета. 2018. № 15. С. 6–8. EDN: VUIVUH.
7. Иванова А.Ю., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Разработка и оценка качества отечественной питательной среды для идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* // Бактериология. 2022. Т. 7, № 1. С. 18. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-18-24. EDN: SXLBDP.
8. Zhang Y., Nie Y., Zhou X., et al. Enhancement of pullulanase production from recombinant *Bacillus subtilis* by optimization of feeding strategy and fermentation conditions // AMB Express. 2020. Vol. 10. P. 1–9. DOI: 10.1186/s13568-020-0948-5. EDN: YURQVX.
9. Решетникова А.И. Актуальность пробиотических кормовых добавок для молодняка крупного рогатого скота. В сб.: II Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные и прикладные научные исследования в условиях современных вызовов и угроз». М., 2024. С. 167–170. EDN: YKYPZC.
10. Наумов Н. М., Свазлян Г. А. Влияние *Bacillus subtilis* и его метаболитов на обмен веществ у поросят в период дорастивания // Достижения науки и техники АПК. 2021. Т. 35, № 6. С. 63–67. DOI: 10.24411/0235-2451-2021-10611. EDN: GEUTCQ.
11. Ma L., Wang L., Zhang Z., et al. Research Progress of Biological Feed in Beef Cattle // Animals. 2023. Vol. 13, № 16. P. 2662. DOI: 10.3390/ani13162662. EDN: IMIYVW.
12. Малков С. В., Красноперов А.С., Порываева А.П., и др. Кормовая добавка на основе эндо- и экзометаболитов *Bacillus subtilis* – стимулятор молочной продуктивности коров // Ветеринария Кубани. 2020. № 4. С. 19–22. DOI: 10.33861/2071-8020-2020-4-19-22. EDN: CNWTOU.
13. Алексеев И.А., Егоров Р.А., Кузнецов А.Ф. Ветеринарно-санитарные показатели мяса и субпродуктов телят под влиянием пробиотической кормовой добавки басулифор // Международный вестник ветеринарии. 2019. № 1. С. 100–103. EDN: HFQKRH.
14. Молянова Г.В., Ноготков М.П. Воздействие препарата на основе *Bacillus subtilis* на ростовесовые параметры телят голштино-фризской породы // Известия Самарской ГСХА. 2021. Т. 6, № 1. С. 46–51. DOI: 10.12737/42658. EDN: WNCXHO.
15. Текучев С.А., Евлушин Д.С., Гребенникова Л.А. Влияние современных технологий выращивания сельскохозяйственных животных на качество животного сырья. В сб.: VI Межрегиональная научно-практическая конференция «Научные основы создания и реализации современных технологий здоровья сбережения», Ростов-на-Дону, 15 октября 2019 г. М.: Сфера, 2019. С. 110–116. EDN: HXIJWG.
16. Неустроев М.П., Тарабукина Н.П., Степанова А.М., и др. Разработка и производство биологических препаратов с использованием биоресурсов Арктики и Субарктики. В сб.: XXIII Международная научно-техническая конференция «Аграрная наука – сельскохозяйственному производ-

- ству Сибири, Монголии, Казахстана, Беларуси и Болгарии», Минск, 1 октября 2020 г. Минск: Белорусская наука, 2020. С. 317–321. EDN: CDNWBW.
17. Владимиров Л.Н., Неустроев М.П., Тарабукина Н.П. Арктические штаммы *Bacillus subtilis* в современной микробиотехнологии // Ветеринария и кормление. 2020. № 2. С. 17–20. DOI: 10.30917/АТТ-ВК-1814-9588-2020-2-4. EDN: NXZGYU.
 18. Леляк А.А., Штерншис М.В. Антагонистический потенциал сибирских штаммов *Bacillus* spp. в отношении возбудителей болезней животных и растений // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2014. Т. 25, № 1. С. 42–55. EDN: TGWLZ.
 19. Terré M., Prat N., Sabrià D., et al. Supplementing a *Bacillus*-based direct-fed microbial improves feed efficiency in lactating dairy cows // *Translational Animal Science*. 2024. Vol. 8. DOI: 10.1093/tas/txae110.
 20. Basavaraju M., Gunashree B.S. *Escherichia coli*: an overview of main characteristics // *Escherichia coli-Old and New Insights*. 2022. DOI: 10.5772/intechopen.105508.
 21. Павлов А.Г., Неустроев М.П. Антагонистическая активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 2СП В-14405 и *Bacillus subtilis* 5СП В-14406 // Ветеринария и кормление. 2024. № 5. С. 72–75. DOI: 10.30917/АТТ-ВК-1814-9588-2024-5-17. EDN: RQJJP.
 22. Лазарев С.А., Арзуманян В.Г., Михайлова Н.А. Влияние состава питательной среды на прирост биомассы и синтез противомикробных метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* // Бактериология. 2021. Т. 6, № 2. С. 38–42. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-38-42. EDN: KGFVMJ.
 23. Лазарев С.А., Михайлова Н.А. Противомикробные и ферментативные свойства метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* 3Н и *Bacillus subtilis* 1719 // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2023. № 4. С. 29. DOI: 10.14427/jipai.2023.4.29. EDN: YDYWMB.

References

1. Kim SW, Less JF, Wang L, et al. Meeting global feed protein demand: challenge, opportunity, and strategy. *Annual review of animal biosciences*. 2019;7(1):221-243. DOI: 10.1146/annurev-animal-030117-014838.
2. Chang Q, Wang W, Regev-Yochay G, et al. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evolutionary applications*. 2015;8(3):240-247. DOI: 10.1111/eva.12185.
3. Barour D, Berghiche A, Boulebda N. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria. *Veterinary World*. 2019;12(8):1195. DOI: 10.14202/vetworld.2019.1195-1203.
4. Reshetnikova AI, Tarabukina NP. Aktual'nost' razrabotki bezothodnoj tekhnologii v proizvodstve probioticheskoy kormovoj dobavki. In: Respublikanskaya nauchnaya konferenciya "Aspirantskie chteniya–2023", Yakutsk, 2023 Nov 23. Yakutsk: SVFU, 2024. P. 98–100. (In Russ.). EDN: IEBJEL.
5. Chizhayeva AV, Dudikova GN. Scientific review: the teoretical and practical aspects of construction of probiotic preparations. *Scientific review. Biological sciences*. 2017;(2):157-166. (In Russ.). EDN: YNWPMX.
6. Grebenshchikova AV. Izucheniye antagonisticheskoy aktivnosti bakterial'nykh konsortsiumov na osnove shtammov *Bacillus subtilis*. *Trudy molodykh uchenykh Altayskogo gosudarstvennogo univertsiteta*. 2018;(15):6-8. (In Russ.). EDN: VUIVUH.
7. Ivanova AYU, Polosenko OV, Shepelin AP. Development and evaluation of the quality of the domestic nutrient medium for the identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *Bacteriology*. 2022;7(1):18-24. (In Russ.) DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-18-24. EDN: SXLBDP.
8. Zhang Y, Nie Y, Zhou X, et al. Enhancement of pullulanase production from recombinant *Bacillus subtilis* by optimization of feeding strategy and fermentation conditions. *AMB Express*. 2020;10:1-9. DOI: 10.1186/s13568-020-0948-5. EDN: YURQVX.
9. Reshetnikova AI. Aktual'nost' probioticheskikh kormovykh dobavok dlya molodnyaka krupnogo rogatogo skota. In: *Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferenciya "Fundamental'nye i prikladnye nauchnye issledovaniya v usloviyah sovremennykh vyzovov i ugroz"*. Moscow, 2024. P. 167–170. (In Russ.). EDN: YKYPZC.
10. Naumov NM, Svazlyan GA. Effect of *Bacillus subtilis* and its metabolites on the metabolism of piglets during the rearing period. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2021;35(6):63-7. (In Russ.) DOI: 10.24411/0235-2451-2021-10611. EDN: GEUTCQ.

11. Ma L, Wang L, Zhang Z, Xiao D. Research Progress of Biological Feed in Beef Cattle. *Animals*. 2023;13(16):2662. DOI: 10.3390/ani13162662. EDN: IMIYVW.
12. Malkov SV, Krasnoperov AS, Poryvaeva AP, et al. Feed supplement based on endo- and exometabolites *B. Subtilis* as stimulator of milk production of cows. *Veterinariya Kubani*. 2020;(4):19-22. (In Russ.). DOI: 10.33861/2071-8020-2020-4-19-22. EDN: CNWTOU.
13. Alekseev IA, Egorov RA, Kuznetsov AF. Veterinary and sanitary indicators of meat calves under the influence brobiotics feed supplements Basulifor. *International Journal of Veterinary Medicine*. 2019;(1):100-103. (In Russ.). EDN: HFQKRH.
14. Molyanova GV, Nogotkov MP. Effect of bacillus subtilus preparations on height and weight of holstein-friesian calves. *Bulletin Samara State Agricultural Academy*. 2021;6(1):46-51. (In Russ.). DOI: 10.12737/42658. EDN: WNCXXO.
15. Tekuchev SA, Evlushin DS, Grebennikova LA. Vliyanie sovremennyh tekhnologij vyrashchivaniya sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh na kachestvo zhivotnogo syr'ya. In: *VI Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferenciya "Nauchnye osnovy sozdaniya i realizacii sovremennyh tekhnologij zdorov'e sberezheniya"*, Rostov-on-Don, 2019 Oct 15. Moscow: Sfera, 2019. P. 110–116. (In Russ.). EDN: HXIJWG.
16. Neustroev M.P., Tarabukina N.P., Stepanova A.M., et al. Razrabotka i proizvodstvo biologicheskikh preparatov s ispol'zovaniem bioresursov Arktiki i Subarktiki. In: *XXIII Mezhdunarodnaya nauchno-tekhnicheskaya konferenciya "Agramaya nauka – sel'skohozyajstvennomu proizvodstvu Sibiri, Mongolii, Kazahstana, Belarusi i Bolgarii"*, Minsk, 2020 Oct 1. Minsk: Belorusskaya nauka, 2020. P. 317–321. (In Russ.). EDN: CDNWBW.
17. Vladimirov LN, Neustroev MP, Tarabukina NP. Arctic strains of *Bacillus subtilis* of in modern microbiotechnology. *Veterinary i kormlenie*. 2020;(2):17-20. (In Russ.). DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-2-4. EDN: NXZGYG.
18. Lelyak AA, Shternshis MV. Antagonistic potential of siberian strains of *Bacillus* spp. towards agents causing animal and plant diseases. *Tomsk State University Journal of Biology*. 2014;25(1): 42–55. (In Russ.). EDN: TGWLVS.
19. Terré M, Prat N, Sabrià D, et al. Supplementing a *Bacillus*-based direct-fed microbial improves feed efficiency in lactating dairy cows. *Translational Animal Science*. 2024;(8). DOI: 10.1093/tas/txae110.
20. Basavaraju M, Gunashree BS. *Escherichia coli*: an overview of main characteristics. In: *Escherichia coli – Old and New Insights*. 2022. DOI: 10.5772/intechopen.105508.
21. Pavlov AG, Neustroev MP. Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* 2SP B-14405 and *Bacillus subtilis* 5SP B14406 bacterial strains. *Veterinary i kormlenie*. 2024;(5):72-75. (In Russ.). DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2024-5-17. EDN: RQJCJP.
22. Lazarev SA, Arzumanyan VG, Mikhailova NA. Influence of nutrient medium composition on biomass growth and antimicrobial metabolites synthesis of *Bacillus subtilis* probiotic strains. *Bacteriology*. 2021;6(2):38-42. (In Russ.). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-38-42. EDN: KGFVMJ.
23. Lazarev SA, Mikhailova NA. Antimicrobial and enzymatic properties of *Bacillus subtilis* 3H and *Bacillus subtilis* 1719 probiotic strain metabolites. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2023;(4):29. DOI: 10.14427/jipai.2023.4.29. EDN: YDYWMB.

Статья принята к публикации 18.03.2025 / The article accepted for publication 18.03.2025.

Информация об авторах:

Альбина Ивановна Решетникова, аспирант, лаборатория по разработке микробных препаратов

Information about the authors:

Albina Ivanovna Reshetnikova, Postgraduate student, Laboratory for the Development of Microbial Preparations

