

Оригинальная статья / Original article

УДК 579.66

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>



Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250

© А.В. Малкова, И.Ю. Евдокимов, М.В. Ширманов,
А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник

Алтайский государственный университет, ИЦ «Промбиотех»,
г. Барнаул, Российская Федерация

Резюме: Цель настоящего исследования – разработать пробиотик для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250. Осуществлен подбор питательной среды для культивирования посевного материала данных микроорганизмов, а также проведен ряд ферментаций бактерий рода *Bacillus* в биологических реакторах емкостью 15 и 250 л. Отработана технология получения готового пробиотика для животных и аквакультуры. Установлено, что L-бульон является наиболее оптимальной питательной средой для культивирования изученных штаммов. В ходе культивирования штаммов *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 в ферментерах выявлено, что спорообразование начинается через 4–8 ч ферментации. На ферментативной среде, в отличие от вегетативной, бациллы развивают более высокие оптическую плотность (максимальное значение у штамма *B. pumilus* – $2,400 \pm 0,149$), значение pH (максимальное значение у штамма *B. toyonensis* – $8,483 \pm 0,609$) и титр (не менее 10^{10} КОЕ/г). Через 20–24 ч инкубирования оба штамма бацилл в ферментаторе почти полностью переходят в эндоспоры, это служит сигналом для начала центрифугирования биомассы. Получено: с 15-литрового ферментера – $83,3 \pm 6,1$ г концентрата, с 250-литрового – $499,8 \pm 51,4$ г. Численность бацилл в концентрированном состоянии для обоих штаммов составила не менее $1 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г. Для получения готового препарата бактериальные концентраты смешивали с мальтодекстрином до титра не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г. Численность бактерий в препарате проверяли в течение года ежемесячно, значение менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г не было зафиксировано. Таким образом, для выращивания материнской культуры штаммов *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 наиболее благоприятна L-среда, а для культивирования в ферментерах – ферментативная питательная среда. Срок хранения биопрепарата на основе бацилл – не менее 12 мес., в течение которых сохраняется не только титр бактерий (не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г) и их жизнеспособность, но также поликомпонентность, цвет и консистенция препарата.

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

Для цитирования: 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. Т. 11. N 3. С. 393–402. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>

Development of a probiotic for animals and aquaculture based on *Bacillus toyonensis* B-13249 and *Bacillus pumilus* B-13250 strains

Angelina V. Malkova, Ivan Yu. Evdokimov, Maxim V. Shirmanov,
Alena N. Irkitova, Dina E. Dudnik

Altai State University, Engineering Center “Prombiotech”,
Barnaul, Russian Federation,

Abstract: This article aims to develop a probiotic for animals and aquaculture based on the *Bacillus toyonensis* B-13249 and *Bacillus pumilus* B-13250 strains. The selection of a nutrient medium was conducted for cultivating the inoculum of these microorganisms. Several bacteria fermentations of the *Bacillus* genus were performed in biological reactors with a capacity of 15 and 250 l. A technology for obtaining a finished probiotic for animals and aquaculture was developed. The results indicate that L-broth is the most optimal nutrient medium for cultivating the studied strains. The cultivation of *B. toyonensis* B-13249 and

B. pumilus B-13250 strains in fermenters revealed that sporulation begins after 4–8 hours of fermentation. In contrast to the vegetative medium, the fermentative medium helped the bacilli develop a higher optical density (the maximum value in the *B. pumilus* strain – 2.400 ± 0.149), pH value (maximum value in the *B. toyonensis* strain – 8.483 ± 0.609) and titer (at least 10^{10} CFU/g). After 20–24 hours of incubation, both strains of bacilli in the fermenter, almost completely pass into endospores, which serve as a signal for the start of biomass centrifugation. This was indicated by the following: from a 15 l fermenter – 83.3 ± 6.1 g of concentrate, from a 250 l fermenter – 499.8 ± 51.4 g. The number of bacilli in a concentrated state was at least $1 \cdot 10^{11}$ CFU/g for both strains. Obtaining a finished preparation required mixing bacterial concentrates with maltodextrin to a titer of at least $1 \cdot 10^{10}$ CFU/g. The number of bacteria in the preparation checked every month during the year, recorded no value less than $1 \cdot 10^{10}$ CFU/g. Thus, L-broth is most favorable for growing the mother culture of the *B. toyonensis* B-13249 and *B. pumilus* B-13250 strains, and fermentative nutrient medium – for the cultivation in fermenters. The expiry date of the bacilli-based biological preparation is at least 12 months, during which the drug's polycomponence, color and consistency are preserved, in addition to the bacteria titer (at least $1 \cdot 10^{10}$ CFU/g) and their viability.

Keywords: *Bacillus pumilus*, *Bacillus toyonensis*, aquaculture, probiotics, fermentation

For citation: Malkova AV, Evdokimov IYu, Shirmanov MV, Irkitova AN, Dudnik DE. Development of a probiotic for animals and aquaculture based on *Bacillus toyonensis* B-13249 and *Bacillus pumilus* B-13250 strains. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):393–402. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>

ВВЕДЕНИЕ

Микробные биопрепараты состоят из живых клеток или спор микроорганизмов, а также продуктов их метаболизма, отобранных по полезным и технологически ценным свойствам [1]. В последние годы увеличилось количество исследований, направленных на разработку биопрепаратов, содержащих спорообразующие бактерии рода *Bacillus* в качестве основы. Это обусловлено тем, что многие виды бацилл имеют особые свойства, которые дают возможность использовать их в качестве объектов для разработки бактериальных препаратов. К таким характеристикам можно отнести:

1) безопасность для человека и позвоночных животных (за исключением некоторых патогенных представителей группы *Bacillus cereus* [2]);

2) способность производить антимикробные вещества и различные токсины (бактерии рода *Bacillus* известны как активные антагонисты по отношению к различным патогенным микроорганизмам и вредителям сельского хозяйства [3–6]);

3) способность к спорообразованию, благодаря которой увеличивается жизнеспособность и сохраняемость бацилл в окружающей среде [7] и непосредственно в препаратах, а также обеспечивается высокая выживаемость клеток при различных технологических операциях (заморозка, сушка и пр.).

Типовым видом р. *Bacillus* является *B. subtilis*, который лучше всего изучен и поэтому чаще используется для производства биопрепаратов. Например, такие пробиотики, как Субтилис, Проваген и Олин, содержащие штаммы вида *B. subtilis*, способствуют увеличению рентабельности выращивания поросят на 12,8, 17,1 и 18,2% соответственно [8]. В ходе экспериментов, проведенных иранскими учеными, было установлено,

что у креветок, при выращивании которых применялись пробиотические препараты на основе бацилл, наблюдался повышенный уровень выживаемости, а также более эффективное усвоение пищи [9]. Корейские исследователи установили, что штаммы *B. subtilis* KA1 и *B. subtilis* KA3 улучшают усвоение пищи креветками *Palaemon paucidens*, а также способствуют их выживаемости при такой вирусной инфекции, как синдром белого пятна [10]. Ученые из Китая в ходе своих экспериментов доказали, что пробиотические бактерии *B. coagulans* ATCC 7050 в концентрации $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г эффективнее всего действуют на морфологию кишечника, иммунный ответ и устойчивость к *Vibrio parahaemolyticus* у креветок *Litopenaeus vannamei*, а также улучшают их рост [11]. Иранские ученые показали, что пробиотический штамм *B. subtilis* оказывает положительный эффект на микрофлору кишечника, рост и развитие немого, или японского, перепела [12].

Сегодня ученые стремятся расширить пул видов р. *Bacillus*, которые могут быть использованы в различных отраслях народного хозяйства, поэтому активно изучают их безопасность и антагонистическую активность. Вид *B. pumilus* является продуцентом антибиотика амикумацин А, который обладает противомикробным действием в отношении таких патогенов человека и животных, как *Helicobacter pylori*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *St. epidermidis* [13, 14]. Авторами работы [15] было установлено, что штамм *B. pumilus* AQAHBS01 в составе пробиотика способен повышать иммунный ответ и устойчивость к *Streptococcus agalactiae* у нильской тилапии. Другой группой ученых было доказано, что штамм *B. pumilus* H2 имеет большой потенциал для профилактики и лечения

вибриоза рыб в аквакультуре [16]. В работе [17] продемонстрировано, что пробиотик на основе штаммов *B. amyloliquefaciens* 54A и *B. pumilus* 47B увеличивает скорость роста и устойчивость к инфекции, вызываемой *Edwardsiella ictaluri*, у полосатого сома.

В состав пробиотика Toyocerin входит штамм *B. toyonensis* BCT-7112T. В 1994 г. данный препарат был одобрен в Европе, и таким образом штамм BCT-7112T стал первым микроорганизмом, разрешенным в качестве кормовой добавки в Европейском Союзе [18]. Было установлено, что данный биопрепарат улучшает здоровье и показатели роста поросят [19]. В другом эксперименте было доказано, что добавление к пище пробиотика Toyocerin® положительно влияет на продуктивность кроликов [20]. Также было зафиксировано, что применение препарата Toyocerin® в рационе угрей приводит к снижению их смертности от *Edwardsiella* spp. [21].

На основании всех перечисленных фактов, а также ввиду необходимости постоянной ротации штаммов в составе биопрепаратов ради сохранения их эффективности разработка многокомпонентного пробиотика из штаммов *B. pumilus* и *B. toyonensis* актуальна для развития и экологизации различных отраслей сельского хозяйства и аквакультуры. В предыдущих исследованиях нами было установлено, что штаммы *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 обладают антагонистической активностью по отношению к *E. coli*, *Candida albicans*, *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* [22, 23]. Данные микроорганизмы являются возбудителями инфекционных заболеваний у птиц, крупного рогатого скота, домашних животных, креветок и рыб, поэтому разработка пробиотика на основе выбранных штаммов является перспективной.

После селекции лучших штаммов с необходимой биологической активностью перед исследователями встает задача масштабирования процесса получения биомассы микроорганизмов или их метаболитов. Для этого необходимо подобрать режимы культивирования отобранных бактерий в ферментерах, а также отработать технологию производства биопрепарата.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использовали два штамма ризосферных споровых бактерий: *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250. Оба штамма запатентованы и задепонированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

Питательные среды и реактивы, использо-

ванные в работе, их состав.

Л-среда, г/л: дрожжевой экстракт – 5,0; пептон – 15,0; NaCl – 5,0; агар – 15,0; дистиллированная вода – 1,0 л. Стерилизация в автоклаве. Для приготовления жидкого Л-бульона использован этот же состав, только без добавления агара.

Среда Эндо: 37 г сухой среды вносили в 1000±50 мл холодной воды, смесь тщательно кипятили в течение 3–5 мин и фильтровали через ватно-марлевый фильтр (при наличии осадка) по ГОСТ 28085-2013. Данную среду использовали для проверки наличия в пробах бактерий группы кишечной палочки.

Вегетативная питательная среда, г/л: дрожжевой экстракт – 5; пептон – 3; NaH₂PO₄ – 1; K₂HPO₄ – 4; MgSO₄ – 0,25; MnSO₄ – 0,03; NaCl – 1; CaCl₂ – 1; FeSO₄ – 0,01; глюкоза – 15; дистиллированная вода – до 1 л. (pH = 6,8–7,0). Раствор глюкозы готовили отдельно: 150 г кристаллической глюкозы растворяли в горячей дистиллированной воде, доводили объем до 0,3 л и стерилизовали в автоклаве при давлении 0,08 МПа в течение 40 мин.

Ферментативная питательная среда, г/л: меласса – 25; кукурузный экстракт – 12,5; дрожжевой экстракт – 1; триптон – 0,5; MgSO₄ – 0,25; MnSO₄ – 0,03; CoCl₂ – 1; солевой сток – 10 мкл; дистиллированная вода – 1 л. Для приготовления солевого стока в небольшом количестве дистиллированной воды растворяли 1 г FeSO₄ и 1 г CuSO₄, затем доводили объем до 100 мл.

Защитная среда, г/л: желатин – 25, сахароза – 100.

Посевной материал составлял около 10% объема питательной среды в ферментере. Для приготовления посевного материала штаммы глубинно засевали петлей в колбы на 500 мл с объемом питательной среды 150 мл. Культивировали в шейкер-инкубаторе Innova 44 (New Brunswick, США) при температуре 37 °C в течение 24 ч со скоростью 250 об./мин (эксцентриситет – 5 см). Подсчет численности бактерий, а также проверку чистоты процесса ферментации и готового препарата осуществляли путем поверхностного посева на среды и дальнейшего инкубирования в термостате Binder BD 115 (Германия) при 37 °C в течение 24 ч [24].

Глубинное культивирование каждого штамма проводили в биореакторах объемом 15 и 250 л (ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург). Для получения большего количества бактериальных концентратов *B. pumilus* и *B. toyonensis* ферментацию осуществляли в биореакторе объемом 250 л с ферментативной питательной средой, предварительно вырастив микробные культуры бактерий до стадии активного деления на вегетативной питательной среде в биореакторе на 15 л. Перед загрузкой питательной среды биореактор, и в особенности индивидуальный воздушный фильтр, предварительно стерилизовали острым паром в

течение 1 ч при 121–125 °С и давлении 0,13–0,15 МПа.

Для биореактора объемом 15 л готовили 10 л вегетативной среды, доля посевного материала составляла не менее 10% от этого объема. Для биореактора объемом 250 л готовили 180 л ферментативной среды. Культуру, выращенную в 15-литровом биореакторе, использовали как посевной материал для ферментации в 250-литровом биореакторе. Для поддержания необходимого pH использовали 10%-й раствор NaOH и 10%-й раствор HCl. В качестве пеногасителя использовали лапрол. Ферментативную и вегетативную среды стерилизовали непосредственно в биореакторе при температуре 121–125 °С в течение 1 ч при давлении 0,13–0,15 МПа.

После засева ферментера температуру культуральной жидкости поддерживали на уровне 37 ± 1 °С. В начале процесса в ферментер непрерывно подавали стерильный воздух в количестве 0,5 л/мин на 1 л среды и поддерживали давление 0,02–0,03 МПа, перемешивали со скоростью 250 об./мин. Каждые 2 ч производили стерильный отбор проб для проведения наблюдений за развитием бактериальной культуры, морфологическим состоянием и отсутствием посторонней микрофлоры, а также измерения оптической плотности культуральной жидкости (при 490 нм).

Целевым продуктом ферментации является биомасса бактерий, поэтому ее концентрировали путем центрифугирования. Процесс вели на проточной центрифуге GTGQ-1251 Tubular Centrifuge (Китай) при 15000 об./мин в случае ферментации в 250 л биореакторе и на центрифуге SIGMA 4-16S/KS (Япония) в течение 20 мин при 4100 об./мин после культивирования бацилл в ферментере объемом 15 л.

Еще одним этапом в производстве биопрепарата является его высушивание в замороженном состоянии в условиях вакуума или лиофилизации¹. После концентрирования биомассу смешивали с предварительно простерилизованной защитной средой, замораживали и отправляли в камеру лиофильной сушки SP Scientific 25L Genesis SQ Super ES-55 (США) (250 л) или Epsilon 1-4 LSCplus (Германия) (15 л). Время сушки составляло около 40 ч, после чего биомассу извлекали, измельчали и проверяли на содержание влаги с помощью анализатора влажности MOC63u Shimadzu (Япония). Как правило, после 40 ч сушки содержание влаги в готовом концентрате было минимальным – менее 5%.

Конечным этапом производства биопрепара-

та являлся процесс смешивания с наполнителем для получения желаемого титра. В качестве наполнителя был выбран мальтодекстрин. В течение года хранения также проверяли численность бактерий в готовом препарате. Для получения готового препарата использовали смеситель периодического действия типа «пьяная бочка», в котором сухой концентрат смешивали с мальтодекстрином в течение 60 мин в соотношении, необходимом для получения титра бацилл в готовом препарате не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При выращивании посевного материала в колбах при 37 °С на вегетативной среде и L-бульоне оба штамма вырастают за 18–24 ч, и визуально это заметно в виде образования мути по всей колбе. Результаты по подбору питательной среды для культивирования посевного материала представлены на VII региональной молодежной конференции «Мой выбор – наука»².

Согласно полученным ранее данным, численность живых клеток при культивировании посевного материала на изучаемых средах отличалась: штамм *B. toyonensis* имел численность, КОЕ/мл: на вегетативной среде – $4,6(\pm 2,0) \cdot 10^8$ (M $\pm$ m), на L-бульоне – $5,9(\pm 1,6) \cdot 10^9$ (M $\pm$ m); штамм *B. pumilus*: на вегетативной среде – $4,7(\pm 2,5) \cdot 10^8$ (M $\pm$ m), на L-бульоне – $2,4(\pm 0,8) \cdot 10^9$ (M $\pm$ m). Исходя из полученных данных L-среду можно считать наиболее оптимальной для культивирования посевного материала.

Установлено, что в начале ферментации идет увеличение количества клеток микроорганизмов, изменяется их размер, активно потребляются питательные вещества из среды, что ведет к снижению показателя pH и количества растворенного кислорода. Для поддержания уровня pH в среде в диапазоне 6,8–7,0 в нее автоматически перистальтическим насосом Etatron добавляли 10%-й раствор NaOH. Подачу воздуха регулировали механически по показателям ротаметра. Через 6–8 ч титрование заканчивалось, начиналось выделение в среду ферментов и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Поскольку в этот период возможно пенообразование, регулировка количества (высоты) образовавшейся пены производилась механически периодическим включением перистальтического насоса, отвечающего за подачу пеногасителя.

После того как микроорганизмами были использованы все питательные элементы среды, наблюдалось повышение уровня pH вплоть до

¹Фирсов Н.Н. Микробиология: словарь терминов. М.: Дрофа, 2006. 256 с.

²Гребенщикова А.В. Подбор условий культивирования для бактерий рода *Bacillus* // Труды молодых ученых Алтайского государственного университета: материалы VII региональной молодежной конференции «Мой выбор – наука», XLVII научной конференции студентов, магистрантов, аспирантов и учащихся лицейных классов. Вып. 17. Барнаул: Изд-во Алтайского университета, 2020. С. 3–5.

8,5–9,0. При pH = 8,2–8,5 начинается активное спорообразование, во время которого бациллы активно дышат, поэтому в это время применяли интенсивную аэрацию. После окончания спорообразования уровень растворенного кислорода достигал 50–100%, что говорит об отсутствии дыхания и окончании процесса ферментации.

На протяжении всего процесса ферментации производились замеры оптической плотности среды. По окончании выравнивания pH оптическая плотность среды практически не изменялась. При наступлении фазы активного спорообразования оптическая плотность уменьшалась незначительно (22–24 ч роста) и после принимала постоянное значение. Это свидетельствует о том, что культура полностью перешла в споры.

В табл. 1 представлены средние результаты по показателям ферментации штаммов *B. pumilus* и *B. toyonensis* на ферментативной питательной среде. Штамм *B. toyonensis* в процессе роста сильнее смещает pH среды от первоначального значения, чем штамм *B. pumilus*. К 20–24 ч культивирования у обоих штаммов бацилл заканчивается процесс спорообразования, вегетативных клеток фактически не остается.

По окончании процесса ферментации концентрированные на центрифуге, а затем высушенные в лиофильной сушке бактериальные концентраты использовали для дальнейших исследований. Масса концентратов как штамма *B. pumilus*, так и штамма *B. toyonensis*, получаемая с 15-литрового ферментера, в среднем составляла 83,3±6,1 г, с 250-литрового – 1499,8±51,4 г.

Как видно из данных, приведенных в табл. 2,

на ферментативной питательной среде бактерии р. *Bacillus* развивают численность на 1 порядок выше, поэтому сушка после культивирования осуществлялась именно на этой питательной среде, в результате чего численность бактерий возросла еще на 1 порядок.

Полученные концентраты смешивали с мальтодекстрином до итогового титра препарата не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г. Соотношение *B. toyonensis* и *B. pumilus* всегда составляло 1:3. Поскольку штамм *B. pumilus* развивает более высокую численность, его преобладание в препарате экономически оправдано.

Ввиду того что готовый бактериальный препарат является поликомпонентным, в нем можно наблюдать два морфологически различных вида бацилл (рисунок). Санитарно-показательные микроорганизмы из группы кишечной палочки (БГКП) ни в концентратах, ни в готовом бактериальном препарате на момент их получения обнаружены не были.

Для установления срока годности готового микробного препарата на протяжении времени хранения при 5 °С проверяли изменение титра бацилл, а также наличие, либо отсутствие, посторонней микрофлоры (табл. 3).

В ходе хранения препарата в течение 12 месяцев титр менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г не зафиксирован. Посторонняя микрофлора не обнаружена (в том числе БГКП), поэтому можно сказать, что срок хранения биопрепарата на основе бацилл – не менее 12 месяцев. Однако для установления окончательного срока годности необходимо вести дальнейшее наблюдение.

Таблица 1. Показатели ферментации штаммов бацилл

Table 1. Indices of bacilli strains fermentation

Время ферментации, ч	Питательная среда	pH (M±m)		Оптическая плотность (M±m)	
		Штамм			
		<i>B. pumilus</i>	<i>B. toyonensis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. toyonensis</i>
0	Вегетативная	6,755±0,063	6,657±0,149	0,269±0,073	0,233±0,023
	Ферментативная	6,632±0,362	6,875±0,106	0,639±0,165	0,531±0,159
2	Вегетативная	7,025±0,050	6,860±0,228	1,236±0,132	0,861±0,069
	Ферментативная	6,906±0,054	7,127±0,424	1,187±0,309	0,795±0,224
4	Вегетативная	7,250±0,509	7,018±0,520	1,838±0,519	1,904±0,247
	Ферментативная	7,214±0,371	8,063±0,146	1,706±0,513	1,464±0,313
6	Вегетативная	7,385±0,671	8,013±0,549	1,860±0,040	2,011±0,120
	Ферментативная	7,5694±0,354	8,465±0,148	1,931±0,419	1,672±0,192
20–24	Вегетативная	7,655±0,191	8,230±0,347	1,926±0,037	2,090±0,317
	Ферментативная	7,890±0,193	8,483±0,609	2,400±0,149	2,042±0,421

Таблица 2. Численность бацилл после культивирования в ферментерах и сушки

Table 2. The number of bacilli after cultivation in fermenters and drying

Штамм	Титр, КОЕ		
	Вегетативная среда, КОЕ/мл	Ферментативная среда, КОЕ/мл	Лиофилизированный концентрат, КОЕ/г
<i>B. toyonensis</i>	$4,3(\pm 0,9) \cdot 10^9$	$2,5(\pm 0,8) \cdot 10^{10}$	$3,6(\pm 0,6) \cdot 10^{11}$
<i>B. pumilus</i>	$4,6(\pm 0,9) \cdot 10^9$	$5,2(\pm 1,6) \cdot 10^{10}$	$5,8(\pm 1,6) \cdot 10^{11}$



Внешний вид колоний бацилл в готовом препарате:
1 – КОЕ *B. toyonensis*; 2 – КОЕ *B. pumilus*

Colonies of bacilli in the finished preparation:
1 – CFU of *B. toyonensis*; 2 – CFU of *B. pumilus*

Таблица 3. Изменение численности бацилл в готовом биопрепарате в ходе хранения

Table 3. Change in the number of bacilli in the finished biological product during storage

Срок хранения	Титр, КОЕ/г ($M \pm m$)
1 день	$1,3(\pm 0,3) \cdot 10^{10}$
1 месяц	$1,9(\pm 0,1) \cdot 10^{10}$
2 месяца	$2,6(\pm 0,2) \cdot 10^{10}$
3 месяца	$3,5(\pm 0,4) \cdot 10^{10}$
4 месяца	$2,9(\pm 0,3) \cdot 10^{10}$
5 месяцев	$2,6(\pm 0,3) \cdot 10^{10}$
6 месяцев	$2,3(\pm 0,5) \cdot 10^{10}$
7 месяцев	$3,5(\pm 0,9) \cdot 10^{10}$
8 месяцев	$1,0(\pm 0,1) \cdot 10^{10}$
9 месяцев	$1,5(\pm 0,2) \cdot 10^{10}$
10 месяцев	$1,9(\pm 0,4) \cdot 10^{10}$
11 месяцев	$1,7(\pm 0,1) \cdot 10^{10}$
12 месяцев	$1,4(\pm 0,3) \cdot 10^{10}$

Стоит отметить особо, что на протяжении времени хранения оба штамма бацилл сохраняют свою жизнеспособность, т.е. препарат остается поликомпонентным. Об этом свидетельствует рост двух различных по морфологии типов колоний бактерий р. *Bacillus*, характерных для штаммов *B. toyonensis* и *B. pumilus*. Также в течение 12 месяцев хранения цвет и консистенция препарата остались неизменными. Посторонние запахи выявлены не были.

ВЫВОДЫ

1. Для культивирования материнской закваски (посевного материала) на основе бацилл наиболее благоприятна L-жидкая питательная среда. Численность живых клеток на ней составляет, КОЕ/мл: у штамма *B. pumilus* – $2,4(\pm 0,8) \cdot 10^9$; у *B. toyonensis* – $5,9(\pm 1,6) \cdot 10^9$.

2. Разработаны режимы культивирования *B. pumilus* и *B. toyonensis* в ферментационных установках, определены оптимальные условия культивирования для роста и спорообразования бацилл: температура выращивания – 37 °C; pH = 6,8–7,0; время роста – 22–24 ч; уровень растворенного кислорода – 50%.

3. Для наращивания биомассы бацилл в биореакторе наиболее благоприятна ферментативная среда. При культивировании на ней бактерии *Bacillus* развивают численность на 1 порядок выше (не менее $2,5(\pm 0,8) \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл), чем на вегетативной (не менее $4,3(\pm 0,9) \cdot 10^9$ КОЕ/мл).

4. Отработана технология получения готового биопрепарата на основе лиофилизированных концентратов штаммов *B. pumilus* и *B. toyonensis* с титром не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г и мальтодекстрином в качестве наполнителя.

5. Установлен предварительный срок годности готового бактериального препарата – не менее 12 месяцев при температуре хранения 4–5 °C.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Муродова С.С., Давранов К.Д. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике // *Biotechnologia Acta*. 2014. Т. 7. N 6. С. 92–101. <https://doi.org/10.15407/biotech7.06.092>
2. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with pathogenic potential // *Microbiology Spectrum*. 2019. Vol. 7. Issue 3. P. 1–35. <https://doi.org/10.1128/microbiol-spec.gpp3-0032-2018>
3. Kivanç S.A., Takim M., Kivanç M., Gullulu G. *Bacillus* Spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens // *African Health Sciences*. 2014. Vol. 14. Issue 2. P. 364–371. <https://doi.org/10.4314/ahs.v14i2.11>
4. Sharif M., Yazdani M., Almas Z., Ghias W., Qureshi R., Zakki S., et al. *Bacillus* species found antagonistic activity against bacteria isolated from currency notes in local circulation // *Biomedical Letters*. 2016. Vol. 2. Issue 2. P. 86–90.
5. Abbas A., Khan S.U., Khan W.U., Saleh T.A., Khan M.H.U., Ullah S., et al. Antagonist effects of strains of *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides // *Comptes Rendus Biologies*. 2019. Vol. 342. Issue 5-6. P. 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2019.05.002>
6. Akarapisan A., Khamtham J., Kositratana W. Characterization of antagonistic-potential of *Bacillus velezensis* SK71 against bacterial brown spot on a terrestrial orchid (*Habenaria lindleyana*) // *International Journal of Agricultural Technology*. 2020. Vol. 16. Issue 1. P. 1–18.
7. Савустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* // *Актуальная инфектология*. 2016. N 2 (11). С. 35–44.

8. Абрамова Н.В. Сравнительная эффективность применения спорообразующих пробиотиков в технологии выращивания поросят // Вестник КрасГАУ. 2015. N 8. С. 173–176.
9. Ziaei-Nejad S., Rezaei M.H., Takami G.A., Lovett D.L., Mirvaghefi A.-R., Shakouri M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* // Aquaculture. 2006. Vol. 252. Issue 2-4. P. 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>
10. Sekar A., Kim M., Jeon H., Kim K. Screening and selection of bacteria inhibiting white spot syndrome virus infection to *Litopenaeus vannamei* // Biochemistry and Biophysics Reports. 2019. Vol. 19. Article number 100663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100663>
11. Amoah K., Huang Q.-C., Tan B.-P., Zhang S., Chi S.-Y., Yang Q.-H., et al. Dietary supplementation of probiotic bacteria, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* // Fish and Shellfish Immunology. 2019. Vol. 87. P. 796–808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
12. Bahrampour K., Afsharmanesh M., Khajen Bami M. Comparative effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* and Flavophospholipol supplements on growth performance, intestinal microflora and jejunal morphology of Japanese quail // Livestock Science. 2020. Vol. 239. Article number 104089. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104089>
13. Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Зенкова В.А., Королев А.М., Остерман И.А., Сергиев П.В. [и др.]. Изыскание антибиотиков, эффективных в отношении бактерий с лекарственной устойчивостью, на примере *Bacillus pumilus* продуцента антибиотика амикумацина А // Вестник Оренбургского государственного университета. 2014. N 13 (174). С. 27–31.
14. Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И., Маланичева И.А., Ефименко Т.А., Сумарукова И.Г., Глухова А.А. [и др.]. Антимикробные свойства амикумацина А // Антибиотики и химиотерапия. 2017. Т. 62. N 1-2. С. 16–19.
15. Srisapoorne P., Areechon N. Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials // Fish and Shellfish Immunology. 2017. Vol. 67. P. 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.018>
16. Gao X.-Y., Liu Y., Miao L.-L., Li E.-W., Hou T.-T., Liu Z.-P. Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance // AMB Express. 2017. Vol. 7. Issue 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0323-3>
17. Thy H.T.T., Tri N.N., Quy O.M., Fotedar R., Kannika K., Unajak S., et al. Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) // Fish & Shellfish Immunology. 2017. Vol. 60. P. 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.016>
18. Jiménez G., Urdiain M., Cifuentes A., López-López A., Blanch A.R., Tamames J., et al. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations // Systematic and Applied Microbiology. 2013. Vol. 36. Issue 6. P. 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
19. Kantas D., Papatsiros V.G., Tassis P.D., Giavasis I., Bouki P., Tzika E.D. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets // Journal of Applied Microbiology. 2015. Vol. 118. Issue 3. P. 727–738. <https://doi.org/10.1111/jam.12729>
20. Pinheiro V., Mourão J.L., Jimenez G. Influence of Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyo*) on the breeding performances of primiparous rabbit does // World Rabbit Science. 2007. Vol. 15. Issue 4. P. 179–188. <https://doi.org/10.4995/wrs.2007.590>
21. Cruz P.M., Ibañez A.L., Hermosillo O.A.M., Saad H.C.R. Use of probiotics in aquaculture // International Scholarly Research Network. 2012. Vol. 2012. Article ID 916845. 13 p. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
22. Пат. № 2693439, Российская Федерация. Штамм бактерий *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* / А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова; патентообладатель ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»; заявл. 25.12.2018; опубл. 02.07.2019.
23. Пат. № 2694522, Российская Федерация. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis* / А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова; патентообладатель ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»; заявл. 25.12.2018; опубл. 16.07.2019.
24. Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В., Яценко Е.С., Сперанская Н.Ю., Мацюра А.В. Морфологическое разнообразие *Bacillus subtilis* // Ukrainian Journal of Ecology. 2018. Т. 8. N. 2. С. 365–370. https://doi.org/10.15421/2018_355

REFERENCES

1. Murodova SS, Davranov KD. Complex microbial preparations. The application in agricultural practice. *Biotechnologia Acta*. 2014;7(6):92–101. (In Russian) <https://doi.org/10.15407/biotech7.06.092>
2. Ehling-Schulz M, Lereclus D, Koehler TM. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*. 2019; 7(3):1–35. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>
3. Kivanç SA, Takim M, Kivanç M, Gullulu G. *Bacillus* spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens. *African Health Sciences*. 2014;14(2):364–371. <https://doi.org/10.4314/ahs.v14i2.11>
4. Sharif M, Yazdani M, Almas Z, Ghias W, Qureshi R, Zakki S, et al. *Bacillus* species found antagonistic activity against bacteria isolated from currency notes in local circulation. *Biomedical Letters*. 2016;2(2):86–90.
5. Abbas A, Khan SU, Khan WU, Saleh TA, Khan MHU, Ullah S, et al. Antagonist effects of strains of *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides. *Comptes Rendus Biologies*. 2019;342(5-6):124–135. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2019.05.002>
6. Akarapisan A, Khamtham J, Kositratana W. Characterization of antagonistic-potential of *Bacillus velezensis* SK71 against bacterial brown spot on a terrestrial orchid (*Habenaria lindleyana*). *International Journal of Agricultural Technology*. 2020;16(1):1–18.
7. Savustyanenko AV. Mechanisms of action of probiotics based on *Bacillus subtilis*. *Aktual'naâ Infektologîâ = Actual Infectology*. 2016;2:35–44. (In Russian)
8. Abramkova NV. Comparative efficiency of the spore-forming probiotic application in the piglet breeding technology. *Vestnik KrasGAU = The Bulletin of KrasGAU*. 2015;8:173–176. (In Russian)
9. Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovett DL, Mirvaghefi A-R, Shakouri M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*. 2006;252(2-4):516–524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>
10. Sekar A, Kim M, Jeon H, Kim K. Screening and selection of bacteria inhibiting white spot syndrome virus infection to *Litopenaeus vannamei*. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2019;19. Article number 100663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100663>
11. Amoah K, Huang Q-C, Tan B-P, Zhang S, Chi S-Y, Yang Q-H, et al. Dietary supplementation of probiotic bacteria, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2019;87:796–808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
12. Bahrapour K, Afsharmanesh M, Khajen Bami M. Comparative effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* and Flavophospholipol supplements on growth performance, intestinal microflora and jejunal morphology of Japanese quail. *Live-stock Science*. 2020;239. Article number 104089. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104089>
13. Efimenko TA, Malanicheva IA, Zenkova VA, Korolev AM, Osterman IA, Sergiev PV, et al. *Bacillus pumilus* – producer of amicoumacin A as an example of searching for new antibiotics which effective against drug resistant bacteria. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2014;13:27–31. (In Russian)
14. Efremenkova OV, Gabrielyan NI, Malanicheva IA, Efimenko TA, Sumarukova IG, Gluhova AA, et al. Antibacterial properties of amicoumycin A. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2017;62(1-2):16–19. (In Russian)
15. Srisapoom P, Areechon N. Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials. *Fish and Shellfish Immunology*. 2017;67:199–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.018>
16. Gao X-Y, Liu Y, Miao L-L, Li E-W, Hou T-T, Liu Z-P. Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express*. 2017;7(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0323-3>
17. Thy HTT, Tri NN, Quy OM, Fotedar R, Kanika K, Unajak S, et al. Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 2017;60:391–399. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.016>
18. Jiménez G, Urdiain M, Cifuentes A, López-López A, Blanch AR, Tamames J, et al. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013;36(6):383–391. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
19. Kantas D, Papatsiros VG, Tassis PD, Giavasis I, Bouki P, Tzika ED. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. *Journal of Applied Microbiology*. 2015;118(3):727–738. <https://doi.org/10.1111/jam.12729>
20. Pinheiro V, Mourão JL, Jimenez G. Influence of Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on the breeding performances of primiparous rabbit does. *World Rabbit Science*. 2007;15(4):179–188. <https://doi.org/10.1016/j.wrs.2007.04.001>

doi.org/10.4995/wrs.2007.590

21. Cruz PM, Ibañez AL, Hermosillo OAM, Saad HCR. Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network*. 2012;2012. Article ID 916845. 13 p. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>

22. Irkitova AN, Grebenshchikova AV. Bacterial strain *Bacillus toyonensis* VKPM B-13249, having marked antagonism with respect to microorganisms *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*. Patent RF, no. 2693439; 2018. (In Russian)

23. Irkitova AN, Grebenshchikova AV. Bacterial strain *Bacillus pumilus* RNCIM V-13250, having expressed antagonism towards microorganisms *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Patent RF, no. 2694522; 2018. (In Russian)

24. Irkitova AN, Grebenshchikova AV, Yatsenko ES, Speranskaya NY, Matsyura AV. Morphological diversity of *Bacillus subtilis*. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018;8(2):365–370. https://doi.org/10.15421/2018_355 (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Малкова Ангелина Владимировна,
младший научный сотрудник,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
✉ e-mail: gelishka96@mail.ru

Евдокимов Иван Юрьевич,
исполняющий обязанности заместителя
директора,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
e-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

Ширманов Максим Вячеславович,
младший научный сотрудник,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
e-mail: maks-shirmanov@mail.ru

Ирkitова Алена Николаевна,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
e-mail: elen171987@mail.ru

Дудник Дина Евгеньевна,
лаборант-исследователь,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
e-mail: dudnik-dina@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Angelina V. Malkova,
Junior Researcher,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
✉ e-mail: gelishka96@mail.ru

Ivan Yu. Evdokimov,
Acting Deputy Director,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
e-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

Maxim V. Shirmanov,
Junior Researcher,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
e-mail: maks-shirmanov@mail.ru

Alena N. Irkitova,
Cand. Sci. (Biology),
Leading Researcher,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
e-mail: elen171987@mail.ru

Dina E. Dudnik,
Laboratory Assistant-Researcher,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
e-mail: dudnik-dina@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Поступила в редакцию 17.05.2021.

Одобрена после рецензирования 01.08.2021.

Принята к публикации 30.08.2021.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

The article was submitted 17.05.2021.

Approved after reviewing 01.08.2021.

Accepted for publication 30.08.2021.