

УДК 639.3.09

4.3.1. Технологии, машины и оборудование для агропромышленного комплекса (технические науки)

**ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ
АНТИМИКРОБНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS*
ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ДЛЯ
АКВАКУЛЬТУРЫ**

Мазанко Мария Сергеевна
Кандидат биологических наук, ведущий научный
сотрудник научно-исследовательской лаборатории
«Центр агробιοтехнологии»
SPIN РИНЦ: 2849-1879
e-mail: mary.bio@list.ru
*Донской государственный технический
университет, Россия, 344010, Ростовская
область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1*

Казарян Армине Армановна
Лаборант научно-исследовательской лаборатории
«Центр агробιοтехнологии»
e-mail: arminekazarian18@gmail.com
*Донской государственный технический
университет, Россия, 344010, Ростовская
область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1*

Чолутаева Энкрин Эренценовна
Обучающийся 4 курса по направлению
подготовки 19.03.01 «Биотехнология», факультет
«Агропромышленный»
e-mail: cholutaeva@mail.ru
*Донской государственный технический
университет, Россия, 344010, Ростовская
область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1*

Саркисян Диана Славиковна
Обучающийся 4 курса по направлению
подготовки 19.03.01 «Биотехнология», факультет
«Агропромышленный»
SPIN РИНЦ: 8500-8112
e-mail: dianassarkisyan@mail.ru
*Донской государственный технический
университет, Россия, 344010, Ростовская
область, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина 1*

В условиях роста устойчивости патогенных микроорганизмов к антибиотикам аквакультура остро нуждается в разработке альтернативных методов контроля заболеваний. Перспективным направлением является использование бактериоцинов, продуцируемых штаммами рода *Bacillus*. Данное исследование посвящено первичному скринингу штаммов с антимикробной активностью из донных отложений природных водоемов и рыбоводных хозяйств Ростовской области. В работе изучались пробы, отобранные из приповерхностного слоя

UDC 639.3.09

4.3.1. Technologies, machinery and equipment for the agro-industrial complex (technical sciences)

**PRIMARY SCREENING OF ANTIMICROBIAL
BACILLUS STRAINS FROM BOTTOM
SEDIMENTS FOR AQUACULTURE**

Mazanko Maria Sergeevna
Candidate of Biological Sciences, Leading
Researcher, Research Laboratory "Center for
Agrobiotechnology"
RSCI SPIN-code: 2849-1879
e-mail: mary.bio@list.ru
*Don State Technical University, Russia, 344010,
Rostov Oblast, Rostov-on-Don, pl.Gagarina 1*

Kazaryan Armine Armanovna
Laboratory Assistant, Research Laboratory "Center
for Agrobiotechnology"
e-mail: arminekazarian18@gmail.com
*Don State Technical University, Russia, 344010,
Rostov Oblast, Rostov-on-Don, pl.Gagarina 1*

Cholutaeva Enkrina Erencenovna
Fourth-year student majoring in 19.03.01
"Biotechnology," Faculty of Agro-Industrial Science
e-mail: cholutaeva@mail.ru
*Don State Technical University, Russia, 344010,
Rostov Oblast, Rostov-on-Don, pl.Gagarina 1*

Sarkisyan Diana Slavikovna
Fourth-year student majoring in 19.03.01
"Biotechnology," Faculty of Agro-Industrial Science
SPIN: 8500-8112
e-mail: dianassarkisyan@mail.ru
*Don State Technical University, Russia, 344010,
Rostov Oblast, Rostov-on-Don, pl.Gagarina 1*

With the increasing resistance of pathogenic microorganisms to antibiotics, aquaculture urgently needs to develop alternative disease control methods. A promising approach is the use of bacteriocins produced by strains of the genus *Bacillus*. This study focuses on the initial screening of strains with antimicrobial activity from bottom sediments of natural water bodies and fish farms in the Rostov Region. The study examined samples collected from the near-surface layer of bottom sediments in the Don River, the Temernik River, and a pond fish farm. After heat treatment of the suspensions,

донных отложений р. Дон, р. Темерник и прудового рыбоводного хозяйства. После термической обработки суспензий проводили выделение термоустойчивых спорообразующих бактерий на питательной среде LB.

Антимикробную активность выделенных штаммов оценивали методом перевернутых пластин и агаровых блочков с использованием тест-культуры *Salmonella* spp. SO1. В результате исследования отобрано шесть штаммов *Bacillus*, демонстрирующих выраженную антагонистическую активность в отношении патогена. Наибольший потенциал показали изоляты, выделенные из донных отложений рыбоводного хозяйства. Полученные данные свидетельствуют о том, что донные отложения являются ценным источником штаммов-продуцентов антимикробных веществ. Выделенные штаммы представляют практический интерес для разработки биологических препаратов, направленных на контроль бактериальных патогенов в аквакультуре, и могут стать основой для создания альтернативы традиционным антибиотикам

Ключевые слова: ДОННЫЕ ОТЛОЖЕНИЯ, *BACILLUS*, БАКТЕРИОЦИНЫ, АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ, *SALMONELLA*, АКВАКУЛЬТУРА, АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ ШТАММЫ, ОТБОР ПРОДУЦЕНТОВ

thermotolerant spore-forming bacteria were isolated on LB nutrient medium. The antimicrobial activity of the isolated strains was assessed using the inverted plate and agar block method using a *Salmonella* spp. SO1 test culture. As a result of the study, six *Bacillus* strains demonstrating pronounced antagonistic activity against the pathogen were selected. Isolates recovered from fish farm bottom sediments showed the greatest potential. The data obtained indicate that bottom sediments are a valuable source of strains producing antimicrobial agents. The isolated strains are of practical interest for the development of biological products aimed at controlling bacterial pathogens in aquaculture and may form the basis for creating alternatives to traditional antibiotics

Keywords: BOTTOM SEDIMENTS, *BACILLUS*, BACTERIOCINS, ANTIMICROBIAL ACTIVITY, *SALMONELLA*, AQUACULTURE, ANTAGONISTIC STRAINS, SELECTION OF PRODUCERS

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-214-034>

Введение

Мировой спрос на животный белок, в частности на рыбу, продолжает устойчиво расти. Однако истощение запасов рыб делает дальнейшее развитие аквакультуры обязательным элементом продовольственной безопасности. Потребление рыбной продукции на душу населения за последние 50 лет выросло более чем вдвое, и к 2030 г. именно аквакультура станет основным источником рыбы для человечества, обеспечивая 109 млн т против 74 млн т от вылова [1].

Стремительный рост отрасли сталкивается с серьезными вызовами, среди которых наиболее лимитирующим становится невозможность эффективно прогнозировать и сдерживать вспышки заболеваний рыб в

связи с антибиотикорезистентностью. В связи с этим для дальнейшего развития аквакультуры необходим подбор альтернативных решений.

Донные отложения в реках, а также активный ил в условиях аквакультуры способны как нивелировать рост патогенных бактерий, таких как сальмонелла, так и быть резервуаром для их сохранения и персистенции. Во многом супрессивные свойства донных отложений зависят от состава микробиоты [2].

Бациллы являются важнейшими представителями микробиоты донных отложений, и они могут делать большой вклад в супрессию патогенных микроорганизмов, в том числе и сальмонеллы. Многие штаммы *Bacillus* обладают мощными антимикробными свойствами, обеспечиваемыми прямыми и косвенными механизмами. К прямым механизмам антагонистической активности относится выработка антимикробных веществ, таких как бактериоцины, нерибосомально синтезируемые пептиды, антибиотики и др. К косвенным механизмам относят подавление кворум сенсинга патогенов, что мешает им образовывать биопленку, хелатирование ионов металлов, образование собственной биопленки и ограничение доступа к поверхностям, на которых патоген может закрепиться [3-4].

Материалы и методы

Отбор проб и оценка общей обсемененности донных отложений

Отбор проб донных отложений и воды был произведен в трех локациях: точка Д – акватория р. Дон в районе общественного пляжа; точка Т – акватория р. Темерник в границах городской черты; точка О – акватория рыбоводного хозяйства (Азовский район, Ростовская область). Пробы отбирали с приповерхностного горизонта (0-5 см) с последующим разделением каждой пробы на две аликвоты: одну подвергали немедленной обработке, вторую стабилизировали и хранили при температуре +4°C.

Для количественной оценки общей обсемененности образцов донных отложений и воды готовили серийные десятикратные разведения суспензий с последующим посевом на плотную питательную среду LB (Luria-Bertani). Учет результатов проводили после 48 ч инкубации при 37°C путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Идентификацию бактерий рода *Bacillus* проводили на основе характерной макроморфологии колоний, а также микроскопически по наличию эндоспор.

Выделение *Bacillus*, обладающих антимикробной активностью

Для выделения штаммов рода *Bacillus* из охлажденных проб донных отложений готовили суспензию в соотношении 1:10 на стерильном физиологическом растворе. С целью селекции термоустойчивых спорообразующих форм проведена пастеризация полученной суспензии при температуре 95°C в течение 5 минут. После термообработки выполняли серию последовательных десятикратных разведений с последующим высевом на плотную питательную среду LB. Посевы инкубировали на шейкере-инкубаторе BS-3031 (Senova, Китай) при 37°C в течение 48 ч для последующей визуализации и отбора колоний. Параллельно проводили подготовку тест-культуры штамма *Salmonella* spp. SO1, изолированного в ходе предыдущих исследований в акватории рыбоводного хозяйства. Культуру инокулировали в жидкую питательную среду LB с последующей инкубацией в шейкере-инкубаторе BS-3031 в течение 48 ч при температуре 37°C.

По истечении 48-часового периода инкубации производили отбор чашек Петри с изолированными колониями. На поверхность агар указанных чашек наносили суспензию тест-культуры *Salmonella* spp. SO1 методом поверхностного посева с использованием стерильных шпателей. Посевы повторно инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 48 часов для последующего анализа результатов антибиотической активности.

Колонии бацилл, над которыми в газоне *Salmonella* образовывалось чистое окно, отбирали петлей путем прокола слоя агара и переносили на чашки с питательной средой LB. Штаммы очищали методом истощающего штриха.

Первичная оценка антагонистической активности штаммов *Bacillus* методом агаровых блочков

Штаммы *Bacillus*, выделенные на предыдущем этапе, тестировали на уровень антимикробной активности методом агаровых блочков. На агаровые пластины LB поверхностным посевом инокулировали исследуемые штаммы бацилл. Инкубировали 2 суток при температуре 37°C.

На твердую среду LB поверхностно инокулировали штамм *Salmonella* spp. SO1. Затем сверху располагали блоки агара, стерильно вырезанные из агаровых пластин с выросшими на них *Bacillus*. Инкубировали 2 суток при температуре 37°C, затем измеряли ширину чистой зоны, образовавшейся вокруг блочков.

Результаты

Данные об обсемененности донных отложений р. Дон в районе общественного пляжа, р. Темерник в пределах городской черты, а также в акватории рыбоводного хозяйства, расположенного в Азовском районе Ростовской области, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Общая обсемененность донных отложений и наличие бактерий р. *Bacillus* в воде в различных точках отбора

Точка отбора	Общее количество культивируемых бактерий, КОЕ/г	<i>Bacillus</i> , КОЕ/г
р. Дон	$2,2 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$3,0 \pm 0,8 \cdot 10^3$
р. Темерник	$5,6 \pm 0,9 \cdot 10^5$	$6,2 \pm 0,8 \cdot 10^4$
Рыбоводное хозяйство	$1,1 \pm 0,1 \cdot 10^5$	$2,6 \pm 0,2 \cdot 10^4$

Обсемененность донных отложений р. Дон была ниже, чем в двух других точках. Донные отложения р. Дон, отобранные в районе пляжа, представляли собой песок, что сказалось на количестве бактерий. Во всех трех точках количество *Bacillus* составило примерно десятую часть от всего количества культивируемых бактерий.

С помощью метода перевернутых пластин в ходе исследования было отобрано 48 штаммов, демонстрирующих антагонистическую активность по отношению к штамму *Salmonella* spp. SO1. Из 48 штаммов только 6 штаммов показали широкую чистую зону вокруг блочков, что позволило нам выделить их как наиболее перспективных штаммов-антагонистов. На основе полученных штаммов создана коллекция штаммов-антагонистов сальмонеллы. Штаммы представлены в таблице 2.

Таблица 2. Штаммы-антагонисты *Salmonella*, выделенные из донных отложений

Название штамма	Место отбора
<i>Bacillus</i> O1	акватория рыбоводного хозяйства (Азовский район, Ростовская область)
<i>Bacillus</i> spp. O2.1	акватория рыбоводного хозяйства (Азовский район, Ростовская область)
<i>Bacillus</i> spp. O3	акватория рыбоводного хозяйства (Азовский район, Ростовская область)
<i>Bacillus</i> D4	р. Дон
<i>Bacillus</i> T5	р. Темерник
<i>Bacillus</i> spp. O6	акватория рыбоводного хозяйства (Азовский район, Ростовская область)

Заключение

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что донные отложения природных водоемов и аквакультурных хозяйств представляют собой перспективный источник для выделения штаммов *Bacillus* с выраженной антагонистической активностью в отношении *Salmonella* spp. Микробиота донных отложений обладает значительным супрессивным потенциалом, при этом бациллы составляют существенную часть культивируемых сообществ. Метод термической обработки проб с

последующим посевом на питательные среды доказал свою эффективность для отбора спорообразующих форм.

Применение метода перевернутых пластин и агаровых блоков позволило идентифицировать 6 наиболее перспективных штаммов-антагонистов, формирующих четкие зоны ингибирования тест-культуры *Salmonella* spp. SO1. Полученные результаты характеризуют потенциал сообщества анализируемых донных отложений в супрессии штаммов сальмонелл. В ходе дальнейших исследований перспективно изучение антимикробных свойств выделенных штаммов, включая идентификацию конкретных бактериоцинов и механизмов их действия. Практическая значимость работы заключается в потенциале разработки новых биологических препаратов для контроля бактериальных патогенов в аквакультуре, что может стать альтернативой традиционным антибиотикам.

Благодарности: Работа проведена в рамках выполнения проекта «Разработка персонифицированных кормов нового поколения с растительными и пробиотическими добавками для повышения выживаемости и улучшения здоровья рыб» (FZNE-2023-0003)

Список литературы

1. Pereira, W.A.; Mendonça, C.M.N.; Urquiza, A.V.; Marteinsson, V.P.; LeBlanc, J.G.; Cotter, P.D.; Villalobos, E.F.; Romero, J.; Oliveira, R.P.S. Use of probiotic bacteria and bacteriocins as an alternative to antibiotics in aquaculture //Microorganisms. – 2022. – V. 10. – №. 9. – P. 1705. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091705>
2. Hassard F. et al. Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and estuarine sediments-A review //Frontiers in microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 1692. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01692>
3. Tran C. et al. Antimicrobial Bacillus: metabolites and their mode of action //Antibiotics. – 2022. – V. 11. – №. 1. – P. 88 <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010088>
4. Zhang N. et al. Biocontrol mechanisms of Bacillus: Improving the efficiency of green agriculture //Microbial Biotechnology. – 2023. – V. 16. – №. 12. – P. 2250-2263 <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>

Reference

1. Pereira, W.A.; Mendonça, C.M.N.; Urquiza, A.V.; Marteinsson, V.P.; LeBlanc, J.G.; Cotter, P.D.; Villalobos, E.F.; Romero, J.; Oliveira, R.P.S. Use of probiotic bacteria and bacteriocins as an alternative to antibiotics in aquaculture //Microorganisms. – 2022. – V. 10. – №. 9. – P. 1705. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091705>
2. Hassard F. et al. Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and estuarine sediments-A review //Frontiers in microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 1692. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01692>
3. Tran C. et al. Antimicrobial Bacillus: metabolites and their mode of action //Antibiotics. – 2022. – V. 11. – №. 1. – P. 88 <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010088>
4. Zhang N. et al. Biocontrol mechanisms of Bacillus: Improving the efficiency of green agriculture //Microbial Biotechnology. – 2023. – V. 16. – №. 12. – P. 2250-2263 <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>