

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Дудник Дина Евгеньевна

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММОВ *BACILLUS* SPP. И
LACTIPLANTIBACILLUS SPP. И РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКОГО
ПРЕПАРАТА НА ИХ ОСНОВЕ**

1.5.6 – биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Ирkitова Алёна Николаевна

Барнаул – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Микрофлора сельскохозяйственных помещений.....	11
1.2 Технологии коррекции микрофлоры в животноводческих помещениях	16
1.3 Перспективы применения биологических препаратов для модуляции микробного фона.....	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	25
2.1 Объекты исследования.....	25
2.2 Питательные среды и реактивы	27
2.3 Методы исследования	30
2.3.1 Микробиологические методы	30
2.3.1.1 Методы посевов.....	30
2.3.1.2 Условия культивирования микроорганизмов.....	30
2.3.1.3 Учет численности микроорганизмов.....	31
2.3.1.4 Определение антагонистической активности	31
2.3.1.5 Определение биохимических свойств штаммов	32
2.3.2 Идентификация штаммов	34
2.3.3 Исследование метаболомного профиля штаммов.....	35
2.3.4 Оценка биобезопасности	36
2.3.4.1 Исследование факторов патогенности.....	36
2.3.4.2 Антибиотикорезистентность	37
2.3.4.3 Определение острой токсичности	37
2.3.5 Культивирование штаммов в ферментерах	38
2.3.5.1 Культивирование в 3 л биореакторе.....	38
2.3.5.2 Культивирование в 15 л биореакторе.....	39
2.3.6 Определение сроков хранения прототипа биологического препарата	39
2.3.7 Проведение лабораторных испытаний прототипа биологического препарата	39
2.3.8 Проведение промышленных испытаний прототипа биологического препарата	40

2.3.9 Статистическая обработка экспериментальных данных	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
3.1 Выделение и отбор штаммов	43
3.1.1 Выделение и скрининг антагонистической активности штаммов <i>Bacillus</i> spp.	43
3.1.2 Выделение и скрининг антагонистической активности штаммов <i>Lactobacillus</i> spp.	56
3.1.3 Биосовместимость штаммов	62
3.2 Ценные биотехнологические свойства штаммов <i>Bacillus</i> spp. и <i>Lactiplantibacillus</i> spp.	64
3.2.1 Биохимическая характеристика	64
3.2.2 Метаболомные профили	69
3.2.3 Биобезопасность	76
3.3 Разработка технологии получения биологического препарата	80
3.3.1 Подбор условий культивирования	80
3.3.2 Совместное культивирование	83
3.3.3 Культивирование в лабораторном ферментере	84
3.3.4 Культивирование в ферментере 15 л	87
3.3.5 Определение сроков хранения прототипа биологического препарата	88
3.4 Определение эффективности прототипа биологического препарата	91
3.4.1 Лабораторные испытания прототипа биологического препарата	91
3.4.2 Испытания прототипа биологического препарата в условиях животноводческого комплекса	95
ВЫВОДЫ	102
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ..	105
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	108
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Акт внедрения результатов диссертационного исследования	146
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Акт внедрения результатов диссертационного исследования в образовательный процесс АлтГУ	147
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Справки о депонировании и патенты на штаммы <i>Bacillus</i> spp.	148
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Справки о депонировании штаммов <i>Lactiplantibacillus</i> spp.	150

ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Метаболиты штаммов <i>Bacillus</i> spp.	151
ПРИЛОЖЕНИЕ Е. Метаболиты штаммов <i>Lactiplantibacillus</i> spp.	153
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж. Нормативно-техническая документация на производство опытных партий биологического препарата	156
ПРИЛОЖЕНИЕ З. Протоколы испытаний телят на бруцеллез в возрасте 4 месяцев ..	158

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Здоровье и продуктивность сельскохозяйственных животных напрямую зависит от санитарно-гигиенического состояния помещения, в котором они содержатся. Важным показателем санитарного фона помещения является его микробная обсемененность. На поверхностях помещения и в подстилке распространены бактерии группы кишечных палочек, бактерии рода *Staphylococcus*, спорообразующие бактерии рода *Clostridium*, вызывающие инфекционные заболевания пищеварительной, дыхательной, выделительной и половой систем животных [1–3]. Высокая численность микроорганизмов в животноводческих комплексах обеспечивается большой плотностью животных, содержащихся в ограниченном пространстве. Также повышенная обсемененность достигается за счет наличия избытка питательных субстратов (фекалии, частицы кормов и покровов животных) и разных типов поверхностей [1, 4]. Чрезмерная контаминация внутренней среды помещения патогенными и условно-патогенными микроорганизмами увеличивает нагрузку на иммунную систему животных и, как следствие, ведет к большей подверженности риску инфекционных заболеваний [5–8].

Основным способом коррекции микробного фона в животноводстве является химическая дезинфекция. Однако, несмотря на долгую историю использования химических дезинфектантов, они имеют существенные недостатки: токсичность, аккумулярование в окружающей среде, влияние на распространение антибиотикорезистентности [9–14]. Поэтому их применение для профилактической обработки помещений не всегда оправдано. В качестве альтернативного способа снижения обсеменённости помещений и подстилки патогенной микрофлорой выступает использование биологических препаратов на основе микроорганизмов, обладающих биоконтрольными свойствами. Микробные препараты для коррекции микрофлоры помещений направлены на вытеснение патогенных бактерий и грибов на обрабатываемых участках. При этом на поверхностях формируется стабильная, заселенная непатогенными микроорганизмами среда, препятствующая быстрой повторной контаминации [15–17].

Внедрение профилактической обработки биологическими препаратами позволяет снизить количество санитарно-показательных микроорганизмов на поверхностях помещения и в подстилке. Исследователи отмечают положительные результаты при

использовании биологических средств коррекции микрофлоры в хозяйствах, занимающихся разведением КРС, свиней и бройлеров [3, 18–21]. К тому же установлено, что микробные препараты благоприятно сказываются на показателях продуктивности животных [19, 20].

Препараты для коррекции микрофлоры появились на рынке в начале XXI в. Первые средства были выпущены бельгийской компанией Chrisal. В настоящее время на рынке представлены преимущественно препараты зарубежных производителей (Бельгия, Украина, США, Франция). В России также выпускаются биологические средства на основе микроорганизмов для санации помещений, например, биопрепарат для дезинфекции жилых помещений и уничтожения въевшихся запаховTM (BioSide), ЭМ-ВитаTM (ООО «Приморский ЭМ-Центр») и Санвит-КTM (ООО «НТЦ БИО»).

Современным мировым трендом является переход к экологически чистому сельскому хозяйству с внедрением биологических средств для защиты и повышения продуктивности животных. В России также прогнозируется рост органического производства и, следовательно, возрастет потребность в биологических препаратах для животноводства [22]. Разработка новых микробных препаратов, а также ротация штаммов в уже существующих, требует поиска высокоактивных штаммов-антагонистов, способных закрепляться в среде животноводческих помещений, и при этом, безопасных и нетоксичных для животных, человека и окружающей среды [23, 24]. Таким образом, выделение и изучение биотехнологических свойств новых штаммов, обладающих высокой биологической активностью и проявляющих антагонизм в отношении инфекционных агентов сельскохозяйственных животных, является перспективным направлением исследований.

Цель исследования: изучение биотехнологического потенциала штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp., разработка биологического препарата на их основе и оценка его эффективности.

Задачи исследования:

1. Выделить новые штаммы из природных и антропогенных источников.
2. Провести скрининг штаммов, обладающих выраженной антагонистической активностью в отношении возбудителей инфекционных заболеваний животных, и определить их биосовместимость.

3. Оценить безопасность и биотехнологические свойства штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp.
4. Разработать технологию получения биологического препарата на основе штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp.
5. Определить эффективность полученного прототипа биологического препарата в лабораторных и промышленных условиях.
6. Оценить влияние прототипа биологического препарата на показатели продуктивности телят.

Научная новизна работы

1. В работе впервые описаны новые штаммы *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp., изолированные из природных и антропогенных биотопов. Оценена их антагонистическая активность в отношении бактерий и грибов, вызывающих инфекционные заболевания человека и животных.
2. Впервые для штаммов *B. atrophaeus* RCAM06423, *B. subtilis* RCAM06733, *L. plantarum* B-14828, *L. plantarum* B-14829 и *L. paraplantarum* B-14830 проведен анализ биохимических свойств и их метаболомных профилей. Значимость штаммов подтверждена патентами РФ (Пат. РФ № 2821008, Пат. РФ № 2859479).
3. Разработана, теоретически и практически обоснована технология производства нового многоштаммового биологического препарата для санации животноводческих помещений и подстилки.
4. Впервые показана эффективность полученного прототипа препарата в условиях телятника: отмечено снижение количества патогенных микроорганизмов в телятнике и зафиксировано увеличение среднесуточного привеса телят на 10,34–18,75% по сравнению с контролем при обработке помещения прототипом препарата.

Практическая значимость работы

1. Результаты исследования расширяют знания о морфолого-культуральных, физиологических и биохимических свойствах, а также биотехнологических возможностях штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. Полученные данные могут быть использованы практикующими микробиологами и биотехнологами, сотрудниками животноводческих предприятий при проведении санитарно-ветеринарных мероприятий.
2. Российские коллекции микроорганизмов (ВКСМ, ВКПМ, ГКПМ-Оболensk) пополнены новыми штаммами бактерий. В ВКСМ депонированы 3 штамма: *B. atrophaeus*

RCAM06422, *B. atrophaeus* RCAM06423, *B. subtilis* RCAM06733 (справки о депонировании: № 192/09 от 01.09.2023; № 193/09 от 01.09.2023; № 262/11 от 13.11.2023). В ВКПМ депонированы 5 штаммов: *B. atrophaeus* B-14827, *B. safensis* B-14826, *L. plantarum* B-14828, *L. plantarum* B-14829, *L. paraplantarum* B-14830 (справки о депонировании: №14827 от 04.12.2024; №14826 от 04.12.2024; №14828 от 04.12.2024; №14829 от 04.12.2024; №14830 от 04.12.2024). В ГКПМ-Оболensk депонированы 7 штаммов: *B. safensis* B-16922, *B. safensis* B-16923, *B. safensis* B-16915, *B. safensis* B-16920, *B. safensis* B-16916, *B. subtilis* B-16924, *B. subtilis* B-16919 (справки о депонировании: №1092 от 03.09.2024; №1093 от 03.09.2024; №1085 от 03.09.2024; №1090 от 03.09.2024; №1086 от 03.09.2024; №1094 от 03.09.2024; №1089 от 03.09.2024).

3. Разработанный в рамках диссертационной работы прототип многоштаммового биологического препарата на основе двух штаммов *Bacillus* spp. и трёх штаммов *Lactiplantibacillus* spp. для санации животноводческих помещений и подстилки прошел испытания в Племенном заводе «Комсомольское» – филиале ФГБНУ ФАНЦА отделение №2 в пос. Урожайный Павловского района Алтайского края в 2025 г. (приложение А). Показана эффективность препарата в качестве средства для коррекции микробного фона телятника. Установлено положительное влияние препарата на среднесуточный привес телят. Сформирована нормативно-техническая документация на производство опытных партий препарата: Технические условия (ТУ 10.89.19.290-008-02067818-2026, приказ ректора «Алтайский государственный университет» №123/П от 04.02.2026); Технологическая инструкция (приказ ректора «Алтайский государственный университет» №122/П от 04.02.2026).

4. Материалы диссертационного исследования использованы в ходе научных практик, а также на лабораторных занятиях студентов Алтайского государственного университета по дисциплинам «Микробиология и вирусология» и «Промышленная биотехнология» (Приложение Б), а также при выполнении плановых НИР в Инжиниринговом центре «Промбиотех» АлтГУ.

Положения, выносимые на защиту

1. Из природных и антропогенных источников выделено и описано 25 новых штаммов, пять из которых (*B. atrophaeus* 7, *B. subtilis* 1/8, *L. plantarum* ЛВ, *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б) перспективны для разработки биологических препаратов для животноводства на основании их антагонистической активности к патогенным и условно-

патогенным микроорганизмам (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *St. xylosus*, *St. epidermidis*, *St. gallinarum*, *St. lentus*, *Candida albicans*, *Geotrichum* spp.), биохимических свойств, метаболомного профиля и безопасности.

2. Оптимальная технология получения биологического препарата для санации животноводческих помещений и подстилки: ферментация в виде двух ко-культур из двух штаммов *Bacillus* spp. и трёх штаммов *Lactiplantibacillus* spp. при температуре 30 °С и продолжительности ферментации 24 ч; смешивание культуральных жидкостей ко-культур в соотношении 1:1. Разработанная технология позволяет достичь в жидкой форме препарата максимального количества живых микроорганизмов: споровых бактерий не менее 9,00 lg КОЕ/мл и лактобактерий не менее 9,00 lg КОЕ/мл.

3. Прототип биологического препарата обладает биоконтрольными свойствами в отношении бактерий группы кишечных палочек, бактерий рода *Staphylococcus*, дрожжей и плесеней, а также увеличивает среднесуточный привес телят.

Методология и методы исследования

В работе использовались методы теоретического (анализ, сравнение) и эмпирического (эксперимент) исследований. При выделении и изучении свойств штаммов, а также получении прототипа препарата и оценке его эффективности применяли современные методы микробиологических, биохимических и биотехнологических исследований. Достоверность полученных результатов подтверждена методами статистической обработки.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена на базе ИЦ «Промбиотех» и кафедре экологии, биохимии и биотехнологии Алтайского государственного университета в период 2018–2026 гг. Достоверность результатов исследований подтверждается их воспроизводимостью и согласованностью с описанными в современной научной литературе результатами других исследователей.

Результаты исследования были представлены и обсуждены на XVI Международной научно-практической конференции «Пища. Экология. Качество», г. Барнаул, 24–26 июня 2019 г.; VII Региональной молодежной конференции «Мой выбор – НАУКА!», г. Барнаул, 17–27 апреля 2019 г.; X международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», г. Алушта, 12–16 сентября 2022 г.; XI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика»,

п. Новомихайловский, 11–14 сентября 2023 г.; IV Российском микробиологическом конгрессе, г. Томск, 24–29 сентября 2023 г.; III Международной конференции «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов», г. Санкт-Петербург, 8-10 июля 2024 г.; IV Международном биотехнологическом форуме «BIOAsia–Altai 2024», г. Барнаул, 23–28 сентября 2024 г.; IV Международной конференции «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов», г. Санкт-Петербург, 30 июня – 2 июля 2025 г.; V Российском микробиологическом конгрессе, г. Волгоград, 29 сентября – 3 октября 2025 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 работ, в том числе: 2 публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, 3 публикации в изданиях, входящих в базы данных Scopus и Web of Science, 8 публикаций в других изданиях и 3 – в сборниках всероссийских и международных конференций. Получено 2 патента РФ.

Личный вклад автора

Заключался в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, а также обработке полученных результатов. Некоторые разделы выполнены совместно с к.б.н. Иркитовой А.Н., к.б.н. Малковой А.В., к.б.н. Евдокимовым И.Ю., Ширмановым М.В., Кожевниковой Е.Н., Лапшиной Н.В., Корсык Л.Н., Басовым Н.В. и Хлоповой К.В.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, а также результаты собственных исследований, выводов, списка использованной литературы и 8 приложений. Работа изложена на 158 страницах, содержит 28 рисунков и 25 таблиц. Список литературы включает 330 источников, в том числе 255 – на иностранном языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Микрофлора сельскохозяйственных помещений

Сельскохозяйственные помещения характеризуются значительной микробной обсемененностью, обусловленной высокой интенсивностью производства. Большая концентрация поголовья на ограниченных площадях, избыток питательных субстратов для микроорганизмов являются основными факторами накопления в воздухе, подстилке, а также на поверхностях помещения и оборудования различных бактерий и грибов, в том числе патогенных и условно-патогенных [1, 4]. Микрофлора сельскохозяйственных помещений представлена разнообразными таксонами микроорганизмов. Численность и видовой состав микрофлоры помещения определяются физико-химическими условиями, которые зависят от пространственного расположения местообитания, а также от группы содержащихся в нем животных. В целом при исследовании микроорганизмов сельскохозяйственных комплексов особое внимание акцентируют на таких объектах как подстилка, кормушки и поилки, инвентарь, используемый для уборки помещений [1, 25–27]. Также активно изучается микробный состав взвешенных в воздухе частиц [28–31].

Подстилка является важной частью сельскохозяйственных помещений и представляет собой определенный субстрат, размещаемый на полу помещения или клеток, с целью адсорбции избытка влаги, термоизоляции, повышения комфорта и обогащения среды для животных. При этом подстилка также является экологической нишей, где создается благоприятная среда для обитания множества видов микроорганизмов. Условия существования здесь определяются преимущественно материалом из которого состоит подстилка. Для создания подстилки используют различные органические и неорганические материалы. Наиболее распространенными являются опилки, песок, древесная стружка и солома [26, 32–34].

Песок, как неорганический материал подстилки, имеет одно важное преимущество – он не способствует быстрому росту микроорганизмов. Низкая численность бактерий при этом определяется меньшей исходной обсемененностью, высокими значениями pH и низким содержанием углерода [32, 33, 35]. Однако в исследованиях Bell et al. (2023) и Pilch et al. (2022) использование песчаной подстилки не влияло на уровень контаминации патогенными бактериями *Salmonella* и *Treponema* [36, 37]. Подавление роста бактерий было отмечено только при добавлении в песок извести [36].

Органические материалы, используемые для подстилки, состоят преимущественно из стеблей травянистых растений или древесных частиц. Такие компоненты характеризуются большей влажностью и исходной обсемененностью микроорганизмами [32, 33]. Так Robles et al. (2020) отмечают более высокий титр грамотрицательных бактерий и стрептококков в свежей подстилке из соломы и древесных опилок по сравнению с песком [34].

Альтернативным вариантом подстилки для содержания крупного рогатого скота является переработанный навоз. Такой подстилочный материал является более доступным и экономически выгодным для фермеров. Помимо этого, он оказывается более предпочтительным для коров и телят по физическим характеристикам [38, 39]. К тому же при содержании КРС на подстилке из переработанного навоза отмечают меньшую распространенность ортопедических патологий [40]. Однако данному материалу свойственна более высокая исходная бактериальная обсемененность. Авторы ряда работ отмечают, что содержание стрептококков в неиспользованной подстилке из переработанного навоза в 1,5-2 раза выше чем в других типах подстилок [34, 41]. Повышенная численность микроорганизмов здесь может быть следствием влажности материала. По данным Robles et al. (2020) количество сухого вещества в переработанном навозе не превышает 50% [34].

Микрофлора подстилки не стабильна во времени и подвержена изменениям в течении эксплуатации материала. Исходный подстилочный материал, уже имеющий микробную обсемененность, смешивается с фекалиями, кормом, перьями, шерстью и кожей, формируя новую среду со своим микробиомом. Его основная масса представлена бактериями типов *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [26, 41–43], а общая численность микроорганизмов может составлять от 10^6 до 10^{16} КОЕ/г [34, 41, 44]. Видовой состав микрофлоры использованной подстилки специфичен и зависит как от структуры и свойств подстилочного материала, так и вида животных, содержащихся в помещении. Доминирующими видами в микробном сообществе при разведении КРС в зависимости от типа подстилки могут быть *Chryseobacterium*, *Pantoea*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* и *Xanthomonas* (для соломенной подстилки) либо *Acinetobacter*, *Cellvibrio*, *Flavobacterium*, *Luteimonas*, *Pseudomonas* и *Symbiobacterium* (для подстилки из переработанного навоза) [26].

Исходная микробная популяция свежего материала подстилки заменяется по мере загрязнения органическими соединениями и микроорганизмами из фекалий. Также большой вклад в формирование подстилочной микрофлоры, помимо кишечной микробиоты, вносят покровы животных, являющиеся источником сапрофитных микроорганизмов [42, 45]. Не уплотнившаяся подстилка представляет собой среду с высокой степенью аэрации, что сдерживает размножение анаэробных бактерий кишечника. Однако наличие кислорода позволяет расти факультативно анаэробным бактериям, в частности бактериям семейств *Lactobacillaceae* и *Enterobacteriaceae*. По мере уплотнения в подстилке формируются относительно благоприятные условия для существования анаэробных форм [43].

Микрофлора подстилки оказывает значительное влияние на здоровье сельскохозяйственных животных. Особенно велико значение бактериального компонента подстилки на ранних стадиях развития. По результатам исследований было установлено, что микроорганизмы подстилки способны колонизировать незаселенную среду кишечника животных и влиять на ее качественный и количественный состав [42, 46].

Режимы использования подстилки также оказывают большое влияние на продуктивность животных. Повторное использование подстилочного материала экономически выгодно, однако может быть связано с определенными рисками [2, 46, 47]. Повторно используемая подстилка может быть источником патогенных микроорганизмов родов *Clostridium* и *Staphylococcus*, а также бактерий группы кишечных палочек [2, 3]. Также длительная эксплуатация материала может вызвать повышенную эмиссию аммиака, и, как следствие, увеличение восприимчивости животных к респираторным инфекциям и существенному снижению их продуктивности [48–50].

Подстилка, как источник микробного загрязнения, вносит вклад в качество получаемой сельскохозяйственной продукции. В современных исследованиях отмечается зависимость контаминации молока от численности бактерий в подстилке и ее типа. При содержании коров на подстилке из переработанного навоза была зафиксирована большая микробная загрязненность молока [44, 51].

Воздушная среда животноводческих помещений также является резервуаром бактериальных сообществ. Микробные аэрозоли представляют собой твердые или жидкие частицы с агрегированными на них микроорганизмами. Концентрация микробных аэрозолей в сельскохозяйственных помещениях относительно внешней среды

значительно выше, что связано с высокой плотностью животных в ограниченном пространстве. Микробный компонент взвешенных частиц разнообразен и зависит от многих факторов. В исследовании Khan et al. (2022) [28] отмечается зависимость микробного состава биоаэрозолей от химического состава воздуха. Наибольшее влияние на структуру бактериального сообщества оказывали ионы аммония, сульфат и нитрат ионы. Изменение микробного состава воздуха также связывают с изменением возраста сельскохозяйственных животных [29–31].

Большинство бактерий, обнаруживаемых в воздухе сельскохозяйственных помещений относятся к филумам *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*. Видовой состав бактериальных сообществ биоаэрозолей зависит от видов животных или птиц, которые содержатся в помещении. Для птичников доминирующими родами будут *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Macrococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Rothia* [28, 52, 53]. При разведении КРС в воздухе обнаруживаются преимущественно *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Agrobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Pseudomonas* [54–57]. В воздухе животноводческих и птицеводческих комплексов обнаруживаются представители *Escherichia*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, вызывающие инфекционные заболевания дыхательной системы, пищеварительного тракта и покровов [29, 65].

Различия видового состава аэрозолей связывают с фекальным и подстилочным происхождением основной части микробиоты воздуха. Особую опасность представляют микробные аэрозоли с размером частиц менее 2,5 мкм (PM_{2,5}). Благодаря своему размеру такие частицы могут проникать глубоко в легкие, вызывая повреждения бронхов и альвеол. Вдыхание PM_{2,5} повышает восприимчивость организма к инфекционным агентам, вследствие ослабления легочного иммунитета, путем нарушения функций макрофагов и снижения защитной способности эпителия дыхательных путей [66, 67]. Помимо этого, вклад в формирование микрофлоры воздуха вносят микроорганизмы из корма, пыли, воздуха внешней среды и с поверхности кожи, шерсти и перьев [30, 52, 58].

Неотъемлемой частью сельскохозяйственных помещений являются также кормушки, поилки и инвентарь, используемый для ухода за животными. Однако анализ микробного разнообразия на них сосредоточен преимущественно на определении санитарно-показательных видов микроорганизмов [1, 27]. При этом на поверхностях помещения и инвентаре обнаруживают бактерий родов *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*,

Citrobacter, *Morganella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, а также грибы родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* и *Candida* [1, 7, 27, 59].

Микрофлора поверхностей окружающей среды, особенно на ранних стадиях развития, оказывает значительное влияние на разнообразие микробиома кишечника животных [60, 61]. Так, в исследовании было установлено, что микроорганизмы родов *Aggregatibacter* и *Chryseobacterium*, доминирующие на поверхностях пола, кормушек и поилок, были одними из наиболее распространенных в кишечнике поросят [60].

Качественный и количественный состав микрофлоры сельскохозяйственных помещений является фактором, определяющим возникновение инфекционных заболеваний животных. Так подстилка может быть источником возбудителей мастита. Заражение маститом может происходить при контакте вымени с подстилкой, контаминированной инфекционными агентами. Присутствие бактерий, вызывающих мастит, отмечено для разных типов подстилочных материалов [34, 44, 45, 62]. Исследователи при определении взаимосвязи заболеваемости интрамаммарной инфекцией и используемым типом подстилки приходят к противоречивым выводам. По данным Patel et al. (2019) и Fréchette et al. (2021), на молочных фермах, использовавших для подстилки переработанный навоз зафиксирована большая заболеваемость клиническим маститом [44, 63]. Напротив, в работах Rowe et al. (2019), Fréchette et al. (2022) и Jeppsson et al. (2024) не прослеживается статистически значимой корреляции между типом подстилки и зараженностью маститом [40, 62, 64].

Сельское хозяйство является одним из основных источников антибиотикорезистентности микроорганизмов. Чрезмерное использование антибиотиков в животноводстве привело к появлению на фермах большого количества устойчивых к антимикробным препаратам бактерий. Микрофлора сельскохозяйственных помещений содержит популяции бактерий резистентные преимущественно к β -лактамным антибиотикам, тетрациклинам, амфениколам, сульфаниламидам. При этом наибольшие показатели устойчивости характерны для птицефабрик, а самые низкие – для молочных хозяйств [68, 69]. Это связано с более интенсивным применением антибиотиков при разведении птиц [69].

Опасность представляет не только появление антибиотикоустойчивых микроорганизмов в сельскохозяйственных помещениях, но и их распространение во внешнюю среду. Распространение может происходить при использовании подстилки в

качестве удобрения на полях [69–71]. Так содержание генов устойчивости в почве после внесения отходов животноводства возрастает в тысячи раз [69]. Микроорганизмы биоаэрозолей также могут способствовать распространению детерминант резистентности во внешнюю среду. В работе McEachran et al. (2015) было установлено увеличение устойчивых к антибиотикам бактерий на взвешенных в воздухе частицах рядом с животноводческими предприятиями [72].

Таким образом, микрофлора сельскохозяйственных помещений представлена большим количеством видов микроорганизмов. Бактерии и грибы распространены по всему помещению и достигают наибольшей численности в подстилке. Микрофлора помещения и животные, которые в нем содержатся, тесно связаны и оказывают взаимное влияние друг на друга. В таких условиях особое значение приобретают методы контроля микробного сообщества в животноводческих комплексах и фермах как способ сохранения продуктивности и здоровья поголовья.

1.2 Технологии коррекции микрофлоры в животноводческих помещениях

Санитарно-гигиенический фон животноводческих помещений характеризуется состоянием микроклимата и текущей микробной нагрузки. В соответствии с принятой на сегодняшний день в России нормативной документацией в животноводческих помещениях нормируются такие показатели микроклимата как температура, влажность, газовый состав воздуха [73]. Однако качественные и количественные показатели микробной обсемененности не имеют закрепленных норм и используются лишь для оценки качества дезинфекционных мероприятий [74]. При этом чрезмерная контаминация среды микроорганизмами, особенно патогенной микрофлорой, ведет к увеличенной нагрузке на иммунную систему животных и, как следствие, большей подверженности риску инфекционных заболеваний [5–8]. В связи с чем в системе ветеринарно-санитарных мероприятий первостепенное значение имеют мероприятия, направленные на недопущение чрезмерного накопления в среде патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Дезинфекция – главный способ борьбы с обсеменённостью помещений патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. На территории Российской Федерации мероприятия по дезинфекции сельскохозяйственных помещений проводятся

в соответствии с Правилами проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного ветеринарного надзора, утвержденными Министерством сельского хозяйства 15.07.2002 г.

Дезинфекция в ветеринарной практике имеет две основные формы: профилактическую и вынужденную, которая в свою очередь делится на текущую и заключительную. Профилактическая дезинфекция проводится с целью предотвращения заноса и накопления патогенных микроорганизмов на территории предприятия. Такая дезинфекция является обязательной, независимо от наличия зараженных объектов, и позволяет уменьшить риск заражения животных и птиц микроорганизмами, находящимися в окружающей среде, путем снижения их численности [74].

Вынужденная дезинфекция проводится при наличии очага инфекции для предотвращения распространения заболеваний внутри животноводческого комплекса или хозяйства и за его пределы. В ходе борьбы с инфекцией используется текущая дезинфекция, как способ снижения контаминации и недопущения заражения здоровых животных. По завершению карантина проводят заключительную дезинфекцию с целью полной ликвидации возбудителя инфекции на всей территории, подвергшейся заражению [74–76].

В настоящее время своевременная дезинфекция играет главную роль в благополучном содержании сельскохозяйственных животных и птиц, а также в повышении продуктивности поголовья скота [4, 77]. Методы дезинфекции делят на химические, физические и биологические [78]. Некоторые авторы выделяют также механический и комбинированный методы. Физическая и механическая дезинфекции имеют ряд серьезных недостатков. В частности, механический способ не позволяет достичь необходимого антимикробного эффекта. Физический же способ требует специального оборудования и не подходит для всех видов дезинфекции [79].

Химическая дезинфекция является наиболее распространённым способом уничтожения патогенной микрофлоры. К основным компонентам, обеспечивающим дезинфицирующий эффект химических средств относятся соединения на основе йода и хлора, фенольные соединения, четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), глутаровый альдегид, спирты, перекисные соединения. Наиболее широко применяемыми компонентами в настоящее время являются четвертичные аммониевые соединения, в связи с их низкой токсичностью [9, 80, 81].

Соединения в составе химических дезинфектантов обладают не только необходимыми антимикробными свойствами, но и рядом токсических эффектов. Средства на основе гипохлорита натрия токсичны, вследствие образования канцерогенных продуктов их распада [12]. А для ЧАС отмечена способность вызывать реакции гиперчувствительности у человека и животных. У персонала ферм и больниц, где для дезинфекции используются средства с ЧАС, развиваются астма и дерматит [9].

Применение средств дезинфекции не всегда эффективно действует на уничтожение патогенной микрофлоры окружающей среды. Это обуславливается периодическим появлением микроорганизмов с пониженной чувствительностью к различного рода веществам, входящим в состав дезинфектантов [82]. В исследовании Ohashi et al. (2022) отмечают низкую эффективность средств на основе ЧАС и хлора в отношении штаммов *Salmonella* spp. [83].

Химические средства дезинфекции могут оказывать влияние на процессы возникновения устойчивости к антибиотикам у бактерий. Так, в исследованиях Bakht et al. (2022) и Kim et al. (2018), было показано возникновение перекрестной резистентности к антибиотикам у штаммов *Pseudomonas aeruginosa* после воздействия растворов гипохлорита натрия и бензалкония хлорида. Повышенную толерантность к антимикробным соединениям авторы связывают с сверхэкспрессией генов эффлюксного насоса и генными мутациями [10, 11].

Широкое использование дезинфектантов ведет к их накоплению в окружающей среде. Так ЧАС обнаруживаются в поверхностных водах и отложениях эстуариев [13, 14]. Помимо этого, прогнозируется повышение концентрации этих соединений в почве, вследствие внесения побочных продуктов животноводства или осадков сточных вод [84]. Аккумуляция компонентов дезинфицирующих средств оказывает токсическое действие на макро- и микробиоту природных ниш [13, 84].

Биологическая дезинфекция менее распространена в ветеринарной практике. К биологическим средствам модуляции микрофлоры относят препараты на основе микроорганизмов и/или их метаболитов, а также бактериофагов. Биологическая дезинфекция является экологически чистой и более безопасной для человека и животных [85]. Помимо этого, применение средств на основе бактерий не приводит к распространению устойчивости к антимикробным соединениям, что делает их перспективными агентами биоконтроля [86].

В биологической дезинфекции применяют вирулентные бактериофаги, для избирательного уничтожения патогенных микроорганизмов. Механизм действия препаратов бактериофагов основан на заражении фагом бактерий-мишеней, ведущей к гибели микробной клетки и дальнейшему распространению фага. Наиболее распространена дезинфекция бактериофагами в лечебно-профилактических учреждениях, а также на предприятиях, занимающихся переработкой мясной и молочной продукции [85, 87].

Высокая специфичность действия фагов может неоднозначно сказываться на эффективности дезинфекции. С одной стороны, данное свойство ведет к избирательности действия вируса на бактерии-мишени: фаг уничтожает только популяцию патогенного микроорганизма, не угнетая полезную микрофлору [87, 88]. С другой стороны, высокая специфичность бактериальных вирусов влияет на качество дезинфекции. Действие конкретного фага может не распространяться на штамм целевого микроорганизма, представленный в данной среде [88, 89].

Микробные препараты для коррекции микробного фона также рассматриваются как безопасная альтернатива химическим средствам. Такие препараты нацелены на замещение патогенных микроорганизмов и создание полезной микрофлоры на обрабатываемых поверхностях. Образование стабильной, заселенной полезными микроорганизмами среды, препятствует быстрой повторной контаминации. Напротив, после применения химических средств остается стерильная среда, которая быстро колонизируется бактериями и грибами [15, 90, 91].

Механизм действия микробных дезинфектантов основан на явлении конкуренции. Бактерии из препарата, колонизируя обрабатываемые поверхности, вступают в конкуренцию за питательные вещества и пространство с патогенной микрофлорой. Преимущество микроорганизмов биопрепарата обеспечивается продукцией антимикробных соединений, ферментов и соединений, ингибирующих кворум-сенсинг патогенов (QS) [3, 16, 92]. Эти свойства позволяют вытеснять патогенов, а заселенная пробиотическими бактериями среда препятствует быстрому повторному заражению. Устойчивость результата санации отмечается в течении 4 месяцев после прекращения использования биологических средств дезинфекции [93].

К основным недостаткам микробных препаратов относят их отсроченный эффект на микрофлору помещения. Микроорганизмам, входящим в состав средства, необходимо

время чтобы закрепиться в данной среде. При этом наличие на поверхностях помещения уже сформированных микробных сообществ может затруднять этот процесс [94]. В связи с чем важно проводить обработку биологическими средствами после проведения процедур механической и/или химической очистки. Дополнительные трудности вызывают сложности в оценке влияния микробных средств на микрофлору помещения. Сама среда помещения характеризуется наличием высокой плотности микроорганизмов, обилием питательных субстратов для них и разнообразием поверхностей с неоднородной структурой [95]. Все это зачастую оказывает значительное влияние на полученный результат и формирует противоречивые сведения о эффективности таких средств.

Безопасность микробных средств позволяет рассматривать широкий диапазон мест для их применения. Многие исследования направлены на оценку эффективности использования биологических препаратов для обработки медицинских учреждений. В этой области ученые отмечают снижение риска заражения внутрибольничными инфекциями [15, 86], сокращение количества патогенов [86, 90, 93] и генов устойчивости к антибиотикам [15, 86, 93] в среде. В условиях животноводства применение микробных средств модуляции микрофлоры также активно изучается во всем мире. В настоящее время учеными из Беларуси, Италии, Франции, США, Казахстана и России получены положительные результаты в хозяйствах, занимающихся разведением КРС, свиней и бройлеров [3, 18–21, 27, 96].

Антимикробные метаболиты бактерий также могут рассматриваться как способ борьбы с патогенной микрофлорой в животноводстве. Перспективными соединениями в данном аспекте являются биосурфактанты. В исследовании Cruz Mendoza et al. (2022) было показано, что обработка поверхностей на предприятии, занимающимся переработкой продукции животноводства, позволила снизить контаминацию *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes* более чем на 50% [97].

Комбинирование химических и биологических средств может компенсировать их недостатки при самостоятельном использовании. Ряд авторов сообщают о существенном и стабильном сокращении патогенных микроорганизмов при комбинированной санитарной обработке по сравнению с обработками только химическими дезинфектантами [18, 98]. Кроме того, такой способ обеззараживания позволил уменьшить количество генов антибиотикорезистентности в микробной популяции [98].

Таким образом, перспективным способом коррекции микробного фона являются биологические препараты на основе микроорганизмов. Такие препараты безопасны для животных, человека и окружающей среды, а также положительно влияют на качество продукции животноводства.

1.3 Перспективы применения биологических препаратов для модуляции микробного фона

Под биологическими средствами для коррекции микробного фона понимают препараты, действующими компонентами которых являются микроорганизмы и/или продукты их обмена, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий и грибов. В отечественной литературе в качестве терминов с аналогичным значением авторы используют такие как «биологический дезинфектант» [99], «пробиотические чистящие средства» [27, 100]. Зарубежные авторы в своих работах используют следующие обозначения для биологических средств модуляции микрофлоры: «позитивные биопленки» [16, 101], «биологический дезинфектант» [19, 20], «пробиотическая очистка» [17, 91, 102, 103], «микробная очистка» [104, 105].

Основой биологического препарата для коррекции микробного фона, определяющим его эффективность, являются микроорганизм (бактерии, грибы, бактериофаги) и/или его метаболиты (липopeптиды, бактериоцины, органические кислоты и др.). Помимо действующего биологического компонента такие препараты могут содержать синтетические ПАВ, ферменты и консерванты [103]. Препараты на основе живых микроорганизмов или спор при этом представляют особый интерес так как позволяют не только снижать численность инфекционных агентов при обработке, но и формируют новый микробиоценоз, препятствующей повторной контаминации поверхностей патогенными микроорганизмами [91, 103]. В состав микробных препаратов преимущественно включают представителей родов *Achromobacter*, *Actinobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Rhodobacter*, *Bacillus* и *Lactobacillus* [15, 16, 103, 105, 106]. При этом молочнокислые бактерии и споровые бактерии рода *Bacillus* (за исключением группы *Bacillus cereus*) наиболее распространены в связи с их высоким антагонистическим потенциалом, безопасностью и

длительной историей использования в биологических препаратах различного назначения [16, 102, 107].

Биоконтрольное действие средств для коррекции микрофлоры осуществляется за счет антагонизма и конкуренции между микроорганизмами препарата и микроорганизмами, населяющими поверхности помещения. Такой механизм действия определяет отсроченную эффективность биопрепаратов и не позволяет использовать их для вынужденной дезинфекции. Однако пролонгированное действие микробных средств благоприятно для включения их в профилактическую дезинфекцию [16, 17, 108].

Впервые средства для коррекции микрофлоры помещений были предложены бельгийской компанией Chrisal. Продукты компании, содержащие клетки споровых бактерий, появились на рынке в 2006 г. Основой для разработки таких биопрепаратов служила концепция «микробного управления» (microbial management), заключающаяся в борьбе с патогенными микроорганизмами на поверхностях посредством их обработки пробиотическими бактериями [109].

Сейчас на рынке представлено ограниченное количество биологических средств для снижения обсемененности животноводческих помещений патогенными микроорганизмами. Большинство средств доступных к приобретению являются импортными. К ним относятся препараты All Friends Animal House Cleaner™ (Chrisal, Бельгия), Дезобакт™ (Биона, Украина), Охупова™ (Agranco-corp, США), LALFILM PRO™ (Lallemand SAS, Франция) и C+ Biosurfactant Cleaner™ (Z BioScience, США). Среди отечественных средств на рынке представлены Биопрепарат для дезинфекции жилых помещений и уничтожения въевшихся запахов™ (BioSide), ЭМ-Вита™ (ООО «Приморский ЭМ-Центр») и Санвит-К™ (ООО «НТЦ БИО»).

Результаты практического применения микробных средств модуляции микрофлоры появляются в литературе с начала 2000-х гг. К настоящему времени проведено много исследований, однако значительная их часть сосредоточена на определении эффективности обработки в медицинских организациях. В условиях животноводческих комплексов практика применения биологических препаратов для коррекции микрофлоры описана в работах De Cesare et al. (2019), Guéneau et al. (2022), Bazzoli et al. (2019) и Беззубова и др. (2009, 2012) [3, 18–20, 110]. Так санация свиноводческих помещений микробными препаратами сократила численность стафилококков, стрептококков и бактерий группы кишечных палочек в воздухе и на

окружающих поверхностях [19, 20, 110]. Применение биологических препаратов в птичниках позволило снизить количество энтеробактерий на поверхностях помещения и в подстилке [3, 18]. А после обработки телятников средствами для модуляции микрофлоры наблюдалось сокращение количества бактерий родов *Streptococcus*, *Corynebacterium* и *Pseudomonas* на поверхностях клеток [21]. Для микробных препаратов также установлена противовирусная активность в отношении вирусов птичьего (H10N1) и свиного (H1N2) гриппа [17].

Помимо модуляции микробного фона помещения биологические препараты способны влиять также на показатели продуктивности животных и качество сельскохозяйственной продукции. Увеличение среднесуточного привеса и живой массы отмечают Беззубов с соавт. (2009, 2012) в опытах на поросятах [19, 20]. А в работе Zhumakayeva et al. (2023) установлено снижение заболеваемости клиническим маститом после включения в санитарно-гигиенические мероприятия биологических препаратов [96].

Несмотря на то, что биологические средства являются перспективным способом коррекции микрофлоры животноводческих помещений, имеющим доказанную эффективность, практика их внедрения в процесс сельскохозяйственного производства распространена крайне слабо. Одной из причин этого является отсутствие нормативно-правовой базы, регулирующей применение таких средств. В России, согласно действующим правилам проведения дезинфекции на объектах ветеринарного надзора [74], не предусмотрено использование биологических средств для профилактической обработки помещений. Хотя на территории нашей страны действует закон ФЗ «Об органической продукции и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» от 03.08.2018 согласно которому для борьбы с болезнями животных при производстве органической продукции должны применяться средства биологического происхождения [111].

Ученые также указывают на отсутствие надзора за качеством, эффективностью и безопасностью биологических средств. При этом затруднение вызывает и отнесение препаратов коррекции микрофлоры помещений к какой-либо группе средств. Так приравнивание биологических препаратов к химическим средствам для дезинфекции затрудняет оценку их показателей. Требования, применяемые для химических средств, сложно, а порой невозможно, адаптировать под биологические препараты [16, 103, 105].

Так же Boesenberg et al. (2025) [104] выражают озабоченность неизвестностью о влиянии «измененной» микробной нагрузки на животных и человека, а также на их эндогенный микробиом. Микроорганизмы препарата должны проходить строгий отбор, включающий точную идентификацию, изучение их фенотипических характеристик, патогенности и токсичности [16, 103–105].

Вероятно, значительную роль в слабом распространении микробных препаратов для санации помещений играет также и недостаточная осведомленность сотрудников предприятий о биологических средствах модуляции микробного фона.

Однако, в настоящее время большую значимость приобретают экологические и ресурсосберегающие подходы в сельскохозяйственном производстве. Согласно указу Президента РФ от 28.02.2024 г. № 145 приоритетным направлением развития России является «переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработка и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных...» [112]. А согласно прогнозам, представленным в Распоряжении Правительства РФ от 4.07.2023 г. № 1788-р Об утверждении Стратегии развития производства органической продукции в РФ до 2030 г., органическое производство молока и мяса вырастет в 16,69 и 5,4 раз соответственно к 2030 г [22]. Таким образом, это будет стимулировать развитие рынка биологических препаратов для коррекции микробного фона животноводческих комплексов и соответственно, актуализировать данное направление исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования при разработке прототипа биологического препарата для сельскохозяйственных помещений и подстилки были выбраны штаммы споровых бактерий рода *Bacillus* и штаммы молочнокислых бактерий семейства *Lactobacillaceae* из коллекции Инжинирингового центра «Промбиотех» АлтГУ. Все штаммы были выделены из различных природных и антропогенных источников на территории Алтайского и Краснодарского краев в период с 2018 по 2024 годы (таблица 1).

Таблица 1 – Штаммы микроорганизмов, использованные в исследовании

№	Штамм, номер в коллекции ИЦ	Номер в российских коллекциях микроорганизмов	Источник выделения
1.	<i>B. atrophaeus</i> 1	RCAM06422*	Вода из пруда
2.	<i>B. atrophaeus</i> 7	RCAM06423*	Подстилка из курятника
3.	<i>B. atrophaeus</i> 8	B-14827**	Ризосфера <i>Taraxacum officinale</i> F.H.Wigg
4.	<i>B. mojavensis</i> 9	RCAM05965*	Ризосфера <i>Chelidonium majus</i> L.
5.	<i>B. pumilus</i> 4	RCAM05516*	Ризосфера <i>Berteroa incana</i> (L.) DC.
6.	<i>B. pumilus</i> 7	RCAM05517*	Ризосфера <i>Rumex acetosa</i> L
7.	<i>B. pumilus</i> 16	B-13250**	Ризосфера <i>Helianthus annuus</i> L.
8.	<i>B. safensis</i> 1F	B-16922***	Водоросли из Черного моря
9.	<i>B. safensis</i> 2F	B-16923***	Водоросли из Черного моря
10.	<i>B. safensis</i> 5P	B-16915***	Ризосфера <i>Ranunculus polyanthemus</i> L
11.	<i>B. safensis</i> 5	B-16920***	Вода из Черного моря
12.	<i>B. safensis</i> 6P	B-16916***	Ризосфера <i>Urtica urens</i> L
13.	<i>B. safensis</i> 6	B-14826**	Подстилка из свинарника
14.	<i>B. subtilis</i> 1/8	RCAM06733*	Подстилка из курятника
15.	<i>B. subtilis</i> 3F	B-16924***	Подстилка из коровника
16.	<i>B. subtilis</i> 10	B-16919***	Сено
17.	<i>B. toyonensis</i> 15	B-13249**	Ризосфера <i>Cichorium intybus</i> L
18.	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ЛВ	B-14828**	Квашенная капуста
19.	<i>L. plantarum</i> М	B-14829**	Квашенная капуста
20.	<i>Lactobacillus</i> sp. 2	-	Прямая кишка телят
21.	<i>Lactobacillus</i> sp.3М	-	Прямая кишка телят
22.	<i>Lactobacillus</i> sp.4М	-	Прямая кишка телят
23.	<i>Lactobacillus</i> sp.5М	-	Прямая кишка телят
24.	<i>L. paraplantarum</i> .8Б	B-14830**	Прямая кишка телят
25.	<i>Lactobacillus</i> sp.9	-	Прямая кишка телят

* штамм депонирован в ВКСМ, ** штамм депонирован в ВКПМ, *** штамм депонирован в ГКПМ-Оболенск

В качестве тест-культур были использованы штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов 4 группы патогенности и грибные культуры 3 и 4 групп патогенности из коллекции ИЦ «Промбиотех». Патогенные микроорганизмы были выделены в период с 2022 по 2024 годы (таблица 2).

Таблица 2 – Штаммы тест-культур, использованные в исследовании

№	Штамм, номер в коллекции ИЦ	Номер штамма в ГКПМ-Оболensk	Источник выделения
Грамотрицательные микроорганизмы			
1.	<i>Serratia marcescens</i> 1	В-16933	Подстилка из коровника
2.	<i>Escherichia coli</i> Pr4	В-16936	Подстилка из свинарника
3.	<i>E. coli</i> 6Т	-	Прямая кишка телят
4.	<i>E. coli</i> 9Т	-	Прямая кишка телят
5.	<i>E. coli</i> 10Т	-	Прямая кишка телят
6.	<i>E. coli</i> 11Т	-	Прямая кишка телят
7.	<i>E. coli</i> 12Т	В-16937	Прямая кишка телят
8.	<i>Citrobacter freundii</i> 1	В-16934	Подстилка из коровника
9.	<i>C. freundii</i> 4	В-16935	Подстилка из клетки декоративного кролика
Грамположительные микроорганизмы			
10.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1	В-16938	Гнойный абсцесс у домашней кошки
11.	<i>St. xylosus</i> 3	-	Подстилка из коровника
12.	<i>St. lentus</i> 1Т	-	Прямая кишка телят
13.	<i>St. aureus</i> 2Т	-	Прямая кишка телят
14.	<i>St. gallinarum</i> 3Т	-	Прямая кишка телят
Грибы			
15.	<i>Candida albicans</i> 1	F-2174	Цервикальный канал человека
16.	<i>C. albicans</i> 2	F-2175	
17.	<i>Geotrichum</i> sp. 1	-	Прямая кишка телят
18.	<i>Geotrichum</i> sp. 2	-	Прямая кишка телят
19.	<i>Geotrichum</i> sp. 4	-	Прямая кишка телят
20.	<i>Geotrichum</i> sp. 5	-	Прямая кишка телят
21.	<i>Geotrichum</i> sp. 6	-	Прямая кишка телят

При проведении промышленных испытаний прототипа биологического препарата объектом исследования были новорожденные телята черно-пестрой породы. Возраст животных на момент начала эксперимента 1-2 дня. Контрольная группа включала 27 телят, а опытная – 20. Подбор животных был проведен по методу сбалансированных групп [113]. Испытания проводили в Племенном заводе «Комсомольское» – филиале ФГБНУ ФАНЦА отделение №2 в пос. Урожайный Павловского района Алтайского края с июля по декабрь 2025 г.

2.2 Питательные среды и реактивы

Для проведения исследования готовили бульонные и агаризованные питательные среды. Жидкие среды использовали для накопления биомассы микроорганизмов. Для поверхностных и глубинных посевов, определения антагонистической и ферментативной активностей, а также резистентности к антибиотикам применяли твердые среды. В процессе работы с культурами микроорганизмов были использованы следующие среды и реактивы:

L бульон (г/л): NaCl – 5, пептон – 15, дрожжевой экстракт – 5, дистиллированная вода – до 1,0 л. Кислотность среды устанавливали на уровне $7,0 \pm 0,2$. Для поверхностных посевов и хранения культур использовали твердую L среду аналогичного состава с добавлением агара 15 г/л [114].

Солевой мясопептонный бульон (г/л): NaCl – 65, пептон – 10, мясной экстракт – 10, дистиллированная вода – до 1,0 л. Перед стерилизацией pH устанавливали на уровне $7,0 \pm 0,2$. Поверхностные посевы проводили на аналогичную среду с добавлением агара 15 г/л. [115].

YEP бульон (г/л): NaCl – 5, пептон – 10, дрожжевой экстракт – 10, 40% раствор глюкозы – 7,5 мл, дистиллированная вода – до 1,0 л. Раствор глюкозы стерилизовали отдельно и вносили после стерилизации. Конечное значение pH среды доводили до $6,8 \pm 0,2$. Твердая среда YEP готовили с добавлением агара 15 г/л [116].

Мясопептонный агар (г/л): NaCl – 5, пептон – 10, мясной экстракт – 10, агар – 15, дистиллированная вода – до 1,0 л. Устанавливали pH на $7,0 \pm 0,2$.

Среда Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия): 40 г среды растворяли в 1 л дистиллированной воды. Среду кипятили до растворения агара, затем фильтровали и разливали по чашкам Петри.

Среда Сабуро с хлорамфениколом (ООО «НИЦФ», Россия): 60 г среды растворяли в 1 л дистиллированной воды. Итоговая концентрация антибиотика составляла 0,05 г/л. Среду автоклавировали и разливали по чашкам Петри.

Среда КМАФАнМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия): 39,5 г питательной среды размешивали в 1 л дистиллированной воды. Среду кипятили 2 мин до растворения агара и стерилизовали в автоклаве.

Физиологический раствор готовили, растворяя 8,5 г NaCl в 1 л дистиллированной воды [117]. Раствор разливали в пробирки и стерилизовали.

MRS бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия): 60 г готовой среды растворяли в 1 л дистиллированной воды. Среду кипятили в течение 2 мин до полного растворения компонентов, разливали в колбы или пробирки и стерилизовали.

MRS агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия): 70 г готовой среды вносили в 1 л дистиллированной воды. Среду кипятили до полного растворения компонентов и разливали по банкам для стерилизации.

Культивирование штаммов *Bacillus* spp. в биореакторах проводили на *ферментационной среде* (ФБ) следующего состава (г/л): меласса свекловичная – 25, кукурузный экстракт – 12,5, дрожжевой экстракт – 1, пептон – 0,5, MgSO₄ – 0,25, MnSO₄ – 0,03, CoCl₂ – 0,046, CaCl₂ – 1, солевой сток – 10 мкл, вода – 1,0 л. Солевой сток готовили отдельно. Его состав (г/л): CuSO₄ – 10,0 г, FeSO₄ – 10,0 г, вода – 1,0 л. Устанавливали pH на уровне 6,8±0,2 и стерилизовали [118].

Культивирование штаммов *Lactiplantibacillus* spp. в биореакторах проводили на *ферментационной среде* (ФЛ) следующего состава (г/л): меласса свекловичная – 20, кукурузный экстракт – 5, дрожжевой экстракт – 3, глюкоза – 20, FeSO₄ – 0,05, MnSO₄ – 0,05, CH₃COONa – 5, CaCO₃ – 0,5, вода – 1,0 л. Активную кислотность среды доводили до 6,8±0,2 и затем автоклавировали [119].

Агар с крахмалом (г/л): NaCl – 5, агар – 15, 1% крахмальный клейстер – 1, дистиллированная вода – до 1,0 л. Крахмальный клейстер готовили отдельно и вносили в среду перед стерилизацией [120].

Определение амилалитической активности проводили с использованием 1% *раствора Люголя*. Раствор готовили перед применением.

Молочный агар (г/л): NaCl – 5, агар – 15, молоко обезжиренное – 10%, дистиллированная вода – до 1,0 л. Молоко обезжиренное автоклавировали отдельно и вносили после стерилизации в охлажденную до 50°C среду [121].

Молоко обезжиренное готовили путем восстановления из сухого. В подогретую дистиллированную воду вносили 115 г/л сухого молока и оставляли на 30 мин до полного растворения. Затем готовое молоко разливали в колбы и стерилизовали [122].

Среда Гетчинсона (г/л): NaNO_3 – 2,5, KH_2PO_4 – 1, MgSO_4 – 0,3, NaCl – 0,1, CaCl_2 – 0,1, FeCl_3 – 0,01, карбоксиметилцеллюлоза – 10, дистиллированная вода – до 1,0 л. Устанавливали pH среды на уровне $6,8 \pm 0,2$ [123].

Целлюлазную активность определяли с помощью 1% водного *раствора Конго красный*. Раствор готовили непосредственно перед использованием [123].

Хитиназную активность штаммов изучали на *среде с коллоидным хитином* (г/л): хитин – 10, агар – 15, дистиллированная вода – до 1,0 л. Устанавливали pH на $7,0 \pm 0,2$ и автоклавируют [124].

Среда Хоттингера (г/л): ГМФ-основа – 9, NaCl – 5, KCl – 0,2, Na_2HPO_4 – 1, глюкоза – 5, агар – 15, дистиллированная вода – до 1,0 л. Данную среду использовали как основу для оценки факторов патогенности. Для определения продукции щелочной фосфатазы в среду дополнительно вносили фенолфталеин натрия до конечной концентрации 0,01%. Оценку лецитиназной активности проводили с добавлением яичного желтка к расплавленной и охлажденной до 50 °C среде. Гемолитическую активность изучали дополняя среду 5 % дефибринированной крови крупного рогатого скота [125].

Рибонуклеазную активность оценивали на среде следующего состава (г/л): казеин – 15, NaCl – 5, пептон – 5, РНК – 2, агар – 15, дистиллированная вода – до 1,0 л [125]. Итоговый pH среды $7,3 \pm 0,2$.

Бульон с сердечно-мозговым экстрактом (Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Condalab, Испания): 52 г готовой среды растворяли в 1 л дистиллированной воды. Среду кипятили в течение 1 мин и разливали в колбы. Конечный pH $7,4 \pm 0,2$.

Для доведения pH сред до конечного значения использовали 20% растворы NaOH и HCl .

Все микробиологические среды и вспомогательные растворы, за исключением среды Эндо, стерилизовали автоклавированием в течение 30 мин при 121 °C и 1,5 атм. Молоко стерилизовали в течение 15 мин при 111 °C и 0,6 атм. После стерилизации твердые среды охлаждали до 50 °C и разливали в чашки Петри. Чашки с застывшей средой переносили в термостат на 30 °C и выдерживали в течение 24 ч для проверки стерильности. Готовые неагаризованные среды после автоклавирования также выдерживали при 30 °C в течение 24 ч в термостате для проверки стерильности. Хранение сред осуществляли в комнатных условиях при +20–25 °C не более 3 суток или в холодильнике при +3–5 °C не более месяца.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Микробиологические методы

2.3.1.1 Методы посевов

Посев микроорганизмов на бульонные среды осуществляли с помощью бактериологической петли путем переноса биомассы с коллекционной культуры, хранящейся на скошенном агаре, в колбу со средой. Для лактобактерий, хранящихся на жидкой питательной среде, пересев проводили пипеткой, перенося 100 мкл культуры в свежую среду.

Посевы на агаризованные среды выполняли поверхностным или глубинным способом в зависимости от вида целевого микроорганизма. Определение количества *Bacillus* spp. производили с помощью поверхностного посева на чашки Петри с L-агаром согласно ГОСТ 26670-91 [126]. Аналогично исследовали численность бактерий группы кишечных палочек, бактерий р. *Staphylococcus*, а также дрожжей и плесеней при оценке эффективности прототипа препарата. Численность лактобактерий устанавливали путем глубинного посева на MRS агар согласно ГОСТ Р 56139-2014 [127]. Также методом глубинного посева оценивали количество мезофильных микроорганизмов при проведении промышленных испытаний.

2.3.1.2 Условия культивирования микроорганизмов

Культивирование штаммов *Bacillus* spp. на жидких средах в колбах проводили в шейкере-инкубаторе Innova 44 (New Brunswick scientific, США) при 200 об/мин (эксцентриситет 5 см) и температуре 30 °С, в течение 24 ч. Выращивание на агаризованных средах осуществляли в термостате BD 115 (Binder, Германия) при 30 °С в течение 24 ч.

Штаммы *Lactiplantibacillus* spp. на бульонных средах в колбах инкубировали в термостате BD 115 при 30 °С в течение 24 ч. Культивирование на агаризованных средах проводили также в термостате BD 115 при 30 °С в течение 48–72 ч.

Тест-культуры энтеробактерий, *Staphylococcus* spp. и *Candida* spp. выращивали на жидких средах в колбах в шейкере-инкубаторе Innova 44 при 200 об/мин (эксцентриситет

5 см) и температуре 37 °С, в течение 24 ч. На агаризованных средах культивирование осуществляли в термостате BD 115 при температуре 37 °С в течение 24 ч. Штаммы *Geotrichum* spp. выращивали на агаризованных средах в термостате BD 115 при температуре 30 °С в течение 7–10 дней.

2.3.1.3 Учет численности микроорганизмов

Количественный учет микроорганизмов осуществляли путем посева исследуемых культуральных жидкостей или иных образцов на твердые питательные среды и дальнейшего подсчета выросших колониеобразующих единиц. Расчет количества микроорганизмов (М) проводили по формуле:

$$M = \frac{N}{m} \times C \quad (1),$$

где N – номер разведения, m – объем разведения, высеянный на чашку, C – среднее арифметическое количества колоний [126].

2.3.1.4 Определение антагонистической активности

Метод перпендикулярных штрихов. Метод использовали при изучении антагонизма бацилл к тест-культурам бактерий группы кишечных палочек, бактериям р. *Staphylococcus* и грибам р. *Candida*. Исследуемый штамм засекали штрихом по диаметру чашки Петри и инкубировали в термостате в течение 24 ч. По истечении времени культивирования к штриху перпендикулярно подсекали штрихи тест-культур. Культивирование осуществляли при условиях оптимальных для роста тест-культур в течение 24 ч. Результат определяли по размеру зоны задержки роста тест-культуры на границе контакта с исследуемым штаммом. Наличие зон подавления роста тест-культуры 10 мм и более оценивали, как высокую антагонистическую активность. Зоны 4–10 мм считали средним уровнем антагонизма, а менее 4 мм – низким [128].

Метод лунок. Метод применяли для исследования антагонизма лактобактерий в отношении бактерий группы кишечных палочек, бактерий р. *Staphylococcus* и грибов р. *Candida*. Тест-культуру засекали газоном: 100 мкл культуральной жидкости вносили на поверхность агаризованной среды и равномерно распределяли шпателем Дригальского. Затем в засеянной среде с помощью пробочного сверла пробивали лунки. Полученные

лунок заполняли 100 мкл культуральной жидкости исследуемого штамма. Культивирование проводили при температуре оптимальной для роста тест-культуры в течение 24 ч. Результат оценивали по размеру зоны ингибирования тест-культуры вокруг лунок с исследуемым штаммом. При диаметре зон ингибирования 20 мм и более отмечали высокий уровень антагонистической активности, средний – 9–20 мм, низкий – менее 9 мм [128].

Метод блоков. Метод использовали для определения ингибирования роста грибов рода *Geotrichum*. Культуры *Geotrichum* spp. выращивали в течение 7 дней на YEP агаре. С колонии гриба пробочным сверлом вырезали блок диаметром 6 мм. Блок помещали на чашку, засеянную газонем исследуемого штамма *Bacillus* spp. или *Lactiplantibacillus* spp. Инкубировали чашки в течение 10 дней. Для оценки антагонистической активности рассчитывали индекс блокирования роста (ИБР) по формуле:

$$\text{ИБР} = \frac{(D_{\text{контр}} - D_{\text{опыт}})}{D_{\text{контр}}} \times 100\% \quad (2),$$

где, $D_{\text{контр}}$ – диаметр колонии тест-культуры в контроле, мм; $D_{\text{опыт}}$ – диаметр колонии тест-культуры в опыте, мм [129].

В качестве референтных значений использовали следующие значения ИБР: 50% и более – высокий уровень антагонистической активности, 30–50% – средний, менее 30% – низкий.

Наличие антагонизма между исследуемыми штаммами *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. определяли, используя выше перечисленные методы. Совместимость штаммов *Bacillus* spp. изучали с помощью метода перпендикулярных штрихов. Для лактобацилл оценку взаимного угнетения проводили методом лунок. С помощью данного метода также определяли биосовместимость штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp.

2.3.1.5 Определение биохимических свойств штаммов

Изучение биохимического профиля штаммов проводили с помощью тест-систем. Для штаммов *Bacillus* spp. использовали тест-системы Microgen Bacillus ID (Microgen Bioproducts, Великобритания), а для *Lactiplantibacillus* spp. тест-систему API 50 (BioMerieux, Франция). Анализ проводили согласно инструкции производителей.

Продукцию гидролитических ферментов определяли качественно чашечными методами. Для штаммов оценивали продукцию протеолитических, амилалитических, целлюлолитических и хитинолитических ферментов.

Протеолитические ферменты определяли на молочном агаре. Исследуемые штаммы наносили каплями по 10 мкл на поверхность среды и культивировали в течение 24 ч. Ферментативную активность оценивали по наличию зоны гидролиза казеина вокруг колонии [130].

Амилалитическую активность изучали на питательной среде с крахмалом. На поверхность среды наносили каплями по 10 мкл культуральной жидкости исследуемых штаммов. Посевы инкубировали в течение 24 ч. По завершении культивирования в чашки на поверхность среды заливали 1% раствор Люголя на 5–10 мин для визуализации результатов. Затем раствор сливали и интерпретировали полученные результаты. Продукцию амилаз оценивали по наличию неокрашенных зон гидролиза крахмала [130].

Продукцию целлюлаз определяли на среде Гетчинсона. Культуральную жидкость исследуемых штаммов в объеме 10 мкл наносили на поверхность среды каплями. Культивировали в течение 24 ч. После чего заливали чашки 0,2% раствором Конго красного на 15–20 мин. По завершению выдержки раствор сливали и промывали поверхность среды 10% раствором NaCl. Результат определяли по наличию неокрашенных зон гидролиза карбоксиметилцеллюлозы [130].

Хитиназную активность изучали на агаризованной среде с коллоидным хитином в качестве единственного источника азота и углерода. Штаммы выращивали в течение 72 ч и визуально определяли наличие роста [131].

Оценку *продукции биосурфактантов* проводили с помощью теста на растекание капли. Каплю супернатанта суточной культуры исследуемого штамма наносили на гидрофобную поверхность и в течение 1–2 мин фиксировали изменение профиля капли. При сохранении капель округлого профиля результат считали отрицательным, а при сглаживании – положительным. В качестве положительного контроля использовали 1% раствор лаурилсульфата натрия, а в качестве отрицательного – дистиллированную воду. Также для штаммов определяли индекс эмульгирования (E_{24}). Для этого смешивали 2 мл супернатанта исследуемого штамма с 2 мл керосина и встряхивали на вихревом смесителе V3 (Elmi, Латвия) в течение 2 мин. Полученную эмульсию оставляли отстаиваться на

сутки при комнатной температуре. Через 24 ч проводили измерение высоты слоя стойкой эмульсии. Расчет индекса эмульгирования проводили по формуле:

$$E_{24} = \frac{h}{H} \times 100\% \quad (3),$$

где h – высота слоя эмульсии, мм; H – высота всего слоя жидкости, мм [132].

Для этого теста в качестве положительного контроля использовали 1% раствор лаурилсульфата натрия, а в качестве отрицательного – чистую питательную среду.

Для штаммов *Lactiplantibacillus* spp. исследовали *продукцию молочной кислоты*. Определение проводили спектрофотометрическим методом [133]. Предварительно строили калибровочный график для растворов с известной концентрацией молочной кислоты. Для этого к 2 мл 0,2% раствора FeCl_3 приливали 50 мкл раствора молочной кислоты и измеряли его оптическую плотность на спектрофотометре UV-1280 (Shimadzu, Япония) при 390 нм. Полученный график зависимости оптической плотности от концентрации кислоты в растворе использовали для расчета количества молочной кислоты, производимой штаммами за 24 ч. Количество молочной кислоты в супернатанте штаммов *Lactiplantibacillus* spp. оценивали следующим образом: 50 мкл супернатанта вносили в 2 мл 0,2% раствора FeCl_3 и измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при 390 нм. Затем производили расчет количества молочной кислоты (г/л) по уравнению полученного калибровочного графика.

2.3.2 Идентификация штаммов

Выделение новых штаммов бацилл проводили в соответствии с определителем Берджи [134]. Определение видовой принадлежности новых штаммов *Bacillus* spp. на первом этапе исследования осуществляли с помощью тест-систем Microgen Bacillus ID. Затем штаммы бацилл прошли дополнительную идентификацию в ВКСМ с использованием тест-системы Biolog GEN III и анализа генов 16S рРНК, в ВКПМ путем анализа генов 16S рРНК и в ГКПМ-Оболensk с помощью определения средней идентичности нуклеотидов (ANI).

Выделение и первичную идентификацию штаммов лактобацилл проводили по морфолого-культуральным и биохимическим признакам согласно определителю Берджи [134]. Выбранные по результатам скрининга штаммы получили генетическую

идентификацию в ВКПМ на основании анализа последовательности гена 16S рРНК и последующей идентификации с использованием видоспецифичных праймеров.

2.3.3 Исследование метаболомного профиля штаммов

Исследование метаболома штаммов было проведено на базе ФГАОУ ВО «Новосибирского национального исследовательского государственного университета» под руководством Басова Н.В.

Предварительно для исследования получали супернатанты штаммов. Для этого штаммы *Bacillus* spp. культивировали на L бульоне в шейкере-инкубаторе при 30 °С в течение 24 ч, а штаммы *Lactiplantibacillus* spp. на MRS бульоне в термостате при 30 °С в течение 24 ч. Суточные культуры штаммов фильтровали через шприцевой фильтр 0,22 мкм. В качестве контроля использовали чистые бульонные среды.

Пробоподготовку осуществляли следующим образом: смешивали 100 мкл исследуемого супернатанта с 400 мкл изопропанола и инкубировали в течение 20 мин. Затем пробы центрифугировали при 13700 об и 4 °С в течение 45 мин. Надосадочную жидкость использовали для анализа. Каждый образец анализировали в 7 повторностях.

Экзометаболомный анализ проводился методом ВЭЖХ с тандемной масспектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) [135]. Исследование осуществляли с использованием системы LC-20AD Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенной автодозатором SIL-20AC (Shimadzu, Япония), термостатом для образцов (10 °С) и термостатом колонки CTO-10ASvp. Хроматографическое разделение проводили с использованием подвижной фазы, состоящей из 5% ацетонитрила в 20 мМ водном растворе (NH₄)₂CO₃ (элюент А) и 100 % ацетонитрил (элюент В). Образцы анализировали в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии. Протокол разделения был следующим. Градиент гидрофильной хроматографии: 0 мин – 98% Б, 2 мин – 98% Б, 6 мин – 0% Б, 10 мин – 0% Б, затем уравнивание колонки в течение 4 мин. Градиент обращенно-фазовой хроматографии: 0 мин – 0% Б, 1 мин – 0% Б, 6 мин – 98% Б, 16 мин – 98% Б, затем уравнивание колонки в течение 3 мин. Объем пробы при этом составлял 2 мкл, а скорость потока устанавливали на 300 мкл/мин. Разделение проводили на монолитной колонке на основе 1-винил-1,2,4-триазола (2×60 мм), термостатированной при 35 °С. Материал колонки был синтезирован по методике, представленной в работе Patrushev et al. (2020) [136].

Масс-спектрометрическую детекцию 489 метаболитов проводили в режиме мониторинга множественных реакций на масс-спектрометре API 6500 QTRAP (SCIEX, США) с источником ионизации электрораспылением в режимах положительной и отрицательной полярности ионов. Параметры работы были установлены следующим образом: напряжение на источнике ионов +5500 В и –4500 В для режимов положительной и отрицательной ионизации соответственно; температура газа-осушителя 475 °С; газ в ячейке соударений – средний; давление газ-распылитель и газ-осушитель составляли по 33 psi, а давление газа-завесы – 30 psi; потенциал декластеризации ± 91 В; потенциал входа ± 10 В; потенциал на выходе из ячейки соударений ± 9 В. Управление прибором и сбор данных осуществляли с помощью ПО Analyst 1.6.3 (SCIEX, США), обработку хроматограмм проводили в программе Skyline 23.1.

2.3.4 Оценка биобезопасности

2.3.4.1 Исследование факторов патогенности

Безопасность штаммов *Bacillus* spp. оценивали по наличию факторов патогенности. Для этого у штаммов изучали возможность продукции лецитиназы, щелочной фосфатазы, рибонуклеазы и гемолизина.

Гемолитическую активность определяли посредством выращивания штаммов бацилл на агаризованной среде Хоттингера, содержащей 5% дефибринированной крови КРС. Посевы культивировали в течение 24 ч при 36 °С, после чего оценивали наличие зон гемолиза [137].

Фосфатазную активность оценивали на агаре Хоттингера с добавлением 0,01% фенолфталеинфосфата натрия. Чашки инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. Затем на крышку чашки вносили несколько капель 25%-ого водного раствора NH_3 . Под действием паров аммиака колонии бацилл, активно продуцирующие щелочную фосфатазу, окрашиваются в розовый цвет [137].

Лецитиназную активность устанавливали на плотной яично-желточной среде (агар Хоттингера, содержащий 10% желтка куриного яйца). Положительный результат устанавливали по образованию ореола преципитации через 24 ч культивирования при 37 °С [138].

Рибонуклеазную активность определяли согласно методике из [139]. Для этого суточные культуры штаммов засеивали короткими штрихами на поверхность МПА, содержащего 2,0 мг/мл нуклеиновой кислоты (дрожжевой РНК). Посевы инкубировали 24 ч при 37 °С. Затем на поверхность агара заливали 5–7 мл 3 М раствора HCl. Через 2–3 мин кислоту сливали и регистрировали результаты. Появление вокруг культуры прозрачной зоны, которая в 4 и более раз превосходит по ширине зону микробного роста, расценивали как положительный реакции на РНК-азу.

2.3.4.2 Антибиотикорезистентность

Устойчивость штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. к основным группам антибиотикам определяли диско-диффузионным методом. Для этого использовали набор для оценки антибиотикочувствительности для ветеринарных лабораторий №25 (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Россия). Исследуемые штаммы высевали газоном на питательные среды. Чашки подсушивали в течение 5 мин. Затем на поверхность среды раскладывали диски, пропитанные растворами антибиотиков. Чашки культивировали в течение 24 ч. Результаты оценивали по наличию и размеру зон ингибирования роста штаммов вокруг дисков. В качестве референтных значений для лактобацилл использовали данные из работ Anisimova et al. (2022), Sharma et al. (2016) и Charteris et al. (1998) [140–142], а для бацилл – требования международного стандарта CLSI M100, определенные для других видов грамположительных бактерий [143].

2.3.4.3 Определение острой токсичности

Определение острой токсичности супернатантов штаммов бацилл проводили на мышинной модели. Исследование было проведено на базе ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск под руководством Хлоповой К.В.

Штаммы для экспериментов предварительно выращивали на жидкой среде ВНИ в шейкере при 37 °С и 120 об/мин в течение 18 ч. Супернатанты получали путем центрифугирования культуральных жидкостей штаммов 10 мин при 8000 об/мин.

Все протоколы экспериментов были одобрены комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ. Работы выполняли в соответствии с руководством и правилами Евросоюза по

обращению, уходу и защите лабораторных животных [144] и ГОСТ 33216-2014 [145]. Заражение проводили однократно внутрибрюшинной инъекцией в объеме 500 мкл. Были использованы нелинейные мыши в возрасте 18–20 дней, по три мыши на каждую группу. Наблюдение за животными проводили в течение 7 дней. Выжившие животные были гуманно эвтаназированы ингаляцией CO₂.

2.3.5 Культивирование штаммов в ферментерах

2.3.5.1 Культивирование в 3 л биореакторе

Ферментацию штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. проводили в лабораторных биореакторах ФА-03 (ООО «Проинтех», Россия) объемом 3 л.

Посевной материал выращивали в колбах 24 ч при 37 °С в шейкер-инкубаторе для штаммов *Bacillus* spp. и 24 ч при 30 °С в термостате для штаммов *Lactiplantibacillus* spp. Готовый инокулят, в условиях ламинар-бокса, сливали в колбу для посева с шлангом для передачи посевного материала в ферментер. Засев аппарата осуществляли путем закола стерильной иглы, соединенной трубкой с посевной колбой. Посевной материал составлял 10% от объёма среды.

Культивирование штаммов *Bacillus* spp. вели 18–26 ч при 30 °С, 250 об/мин, концентрации растворенного кислорода 50%. Параметры культивирования для штаммов *Lactiplantibacillus* spp. были следующими: 18–26 ч, 30 °С, 250 об/мин, анаэробные условия.

В процессе ферментации для контроля роста культур проводили отбор проб. Для культуральной жидкости определяли оптическую плотность, активную кислотность и проводили микроскопический анализ (ООО «Альтами», Россия). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре UV-1280 (Shimadzu, Япония) при 600 нм. Пробы предварительно разбавляли в 10 раз.

Ферментацию продолжали до прекращения роста оптической плотности. Для штаммов *Bacillus* spp. также учитывали соотношение количества вегетативных клеток и спор. Культивирование прекращали при достижении 50% спор.

2.3.5.2 Культивирование в 15 л биореакторе

Опытную партию биологического препарата получали путем культивирования штаммов в 15 л ферментере (ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург). Подготовку и засев посевного материала осуществляли аналогично 3 л биореакторам. Доля посевного материала составляла 10% от объема среды.

Условия культивирования штаммов *Bacillus* spp.: 18–26 ч, 30 °C, 250 об/мин, концентрации растворенного кислорода 50%. Для штаммов *Lactiplantibacillus* spp. ферментацию вели 18–26 ч при 30 °C, 250 об/мин без подачи кислорода. Активную кислотность среды для лактобацилл статировали на 6,5–6,8 с помощью 20% раствора NaOH в течение первых 8–10 ч для недопущения чрезмерного закисления.

2.3.6 Определение сроков хранения прототипа биологического препарата

Сохранность численности микроорганизмов в готовом препарате определяли в течение 6 месяцев при хранении в холодильнике (+4 °C) и при комнатной температуре (+25 °C) с использованием консервантов и без них. В качестве консервантов в разных образцах использовали аскорбиновую кислоту, NaCl и глицерин. Аскорбиновую кислоту вносили до концентрации в растворе 0,3%, а NaCl и глицерин – до 10%. Численность бактерий *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. оценивали в начале исследования и далее каждый месяц путем посевов десятикратных разведений на агаризованные среды.

2.3.7 Проведение лабораторных испытаний прототипа биологического препарата

Оценку эффективности полученного прототипа биологического препарата в лабораторных условиях проводили согласно руководству Р 4.2.2643-10 [146]. Для испытаний использовали тест-поверхности из керамогранита, оцинкованной стали и бетона. На каждой поверхности отмечали по 6 квадратов (по 3 квадрата на контроль и на опыт) площадью 100 см². Поверхности предварительно очищали и высушивали, а затем контаминировали тест-культурами в объеме 0,5 мл/100 см². В качестве тест-культур использовали штаммы *E. coli* 6Т, *S. aureus* 2Т и *C. albicans* 1. Контаминацию проводили суточными культурами с численностью микроорганизмов не менее 9,00 lg КОЕ/мл. Тест-поверхности подсушивали и обрабатывали путем крупнокапельного орошения.

Контрольные варианты обрабатывали дистиллированной водой, а опытные – прототипом препарата. Расход воды или препарата на обработку 1 квадрата составлял 1 мл.

Численность тест-культур на контрольных и опытных поверхностях определяли через 24 и 48 ч. Отбор смывов проводили следующим образом: стерильные марлевые салфетки, размером 5×5 см, пропитывали физиологическим раствором и с помощью пинцета тщательно протирали поверхность салфеткой, а затем погружали ее в пробирку с физиологическим раствором. Предварительно перед проведением посева пробирку с салфеткой встряхивали на вихревом смесителе в течение 5 мин для перераспределения микроорганизмов с поверхности марли в раствор.

Учет количества микроорганизмов проводили путем посева смывов с поверхностей на селективные среды: агар Эндо, солевой МПА или агар Сабуро в зависимости от вида тест-культуры. Результаты оценивали после 24 ч культивирования при 37 °С на средах Эндо и МПА или после 48–72 ч культивирования при 30 °С на среде Сабуро.

2.3.8 Проведение промышленных испытаний прототипа биологического препарата

Испытания прототипа биологического препарата в условиях животноводческого комплекса проводили в ПЗ «Комсомольское» – филиал ФГБНУ ФАНЦА отделение №2 в пос. Урожайный Павловского района Алтайского края с июля по декабрь 2025 г. Опытный и контрольный участки представляли собой помещения площадью 127 м² с индивидуальными клетками (боксами). В качестве подстилки в клетках использовалась солома. Предварительно перед началом эксперимента на контрольном участке телятника была проведена дезинфекция каустической содой и побелка стен. В опытном участке была проведена только побелка стен.

Эффективность прототипа препарата изучали при содержании на опытном участке 20 телят черно-пестрой породы. Количество телят на контрольном участке составляло 27. Возраст телят на начало эксперимента 1–2 дня.

Обработку опытного участка биологическим препаратом осуществляли путем орошения с использованием ручного опрыскивателя типа ЖУК. Расход препарата составлял 75–80 мл/м². Обработку проводили двукратно перед размещением животных. В процессе содержания телят обработку осуществляли 3 раза с интервалом в 2 недели. На

контрольном участке дезинфекционные мероприятия после набора группы не проводились.

В течении эксперимента определяли динамику микробиологических показателей: общая микробная обсемененность, количество бактерий группы кишечных палочек, стафилококков, дрожжей и плесеней. Смывы с поверхностей пола брали в 3 различных точках контрольного и опытного участков. Для определения контаминации клеток смывы делали с передних прутьев 3 произвольно выбранных клеток на каждом участке. Образцы подстилок, весом 5–10 грамм, отбирали с 4 произвольно выбранных клеток на каждом участке. Отбор образцов на посев осуществляли до начала эксперимента и затем каждые 2 недели, перед проведением обработки.

Количественный учет разных групп микроорганизмов проводили путем посева смывов с пола, клеток и подстилок на агаризованные среды и дальнейшего подсчета колоний. Посев производили не позднее 12 ч после отбора образцов. Определение численности мезофильных микроорганизмов осуществляли на среде КМАФАнМ, бактерий группы кишечных палочек – на среде Эндо, бактерий р. *Staphylococcus* – на солевом МПА, дрожжей и плесневых грибов – на среде Сабуро с хлорамфениколом. Культивирование посевов на среде Эндо и солевом МПА проводили в термостате при 37 °С в течение 24 ч, на среде КМАФАнМ – при 30 °С в течение 72 ч, а на среде Сабуро – при 25 °С в течение 120 ч.

Для телят в течение эксперимента проводили также оценку их среднесуточного прироста массы тела. Взвешивание проводили после рождения и затем каждый месяц утром до поения и кормления. Всего было проведено 4 взвешивания: 3 взвешивания в течение эксперимента и 1 взвешивания после его завершения. Расчет среднесуточного привеса (В) осуществляли по формуле:

$$B = \frac{W_1 - W_0}{t} (4),$$

где W_1 – живая масса телят в конце эксперимента, кг; W_0 – живая масса телят в начале эксперимента, кг; t – продолжительность учетного периода, дней [147].

В соответствии с правилами ветеринарного осмотра для телят опытной и контрольной групп в возрасте 4 месяцев было проведено серологическое исследование на бруцеллез. Плановое исследование поголовья проведено в КГБУ «Управлении ветеринарии государственной ветеринарной службы Алтайского края по Павловскому району» в декабре 2025 г.

2.3.9 Статистическая обработка экспериментальных данных

Статистическую обработку данных, полученных в исследовании, проводили с помощью программы Microsoft Excel 2016. Для всех значений рассчитывали среднеарифметическое значение (M) и стандартное отклонение (m). Значения численности микроорганизмов были преобразованы с помощью логарифма с основанием 10 (lg) для стабилизации дисперсий. Для оценки достоверности различий между опытной и контрольной группами использовали t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Статистический анализ результатов метаболомного профиля проводился с использованием тестов Манна–Уитни. Коррекция выбросов проводилась следующим образом: выбросом считалось любое значение, выходящее за пределы 1,5-го межквартильного диапазона (МКР). Выявленные выбросы заменялись скорректированными значениями, рассчитанными как $1,5 \times \text{МКР} \pm 10^{-5}$ (вычиталось для верхних выбросов и добавлялось для нижних выбросов).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Выделение и отбор штаммов

3.1.1 Выделение и скрининг антагонистической активности штаммов *Bacillus* spp.

Эффективность биологических препаратов зависит от включенных в их состав штаммов микроорганизмов. Штаммы должны быть способными к выживанию и размножению в конкретной среде, а также обладать ценными техническими и биологическими свойствами, обеспечивающими необходимое действие препарата. При разработке препаратов для животноводства важнейшим критерием отбора штаммов является их способность к подавлению патогенных и условно-патогенных бактерий и грибов – возбудителей инфекционных заболеваний животных [23, 148]. Штаммы-антагонисты широко распространены среди представителей родов *Bacillus* и *Lactobacillus*, которые активно используются в производстве микробных препаратов для человека и животных.

На начальном этапе исследования провели выделение и отбор штаммов бацилл по схеме, представленной на рисунке 1.

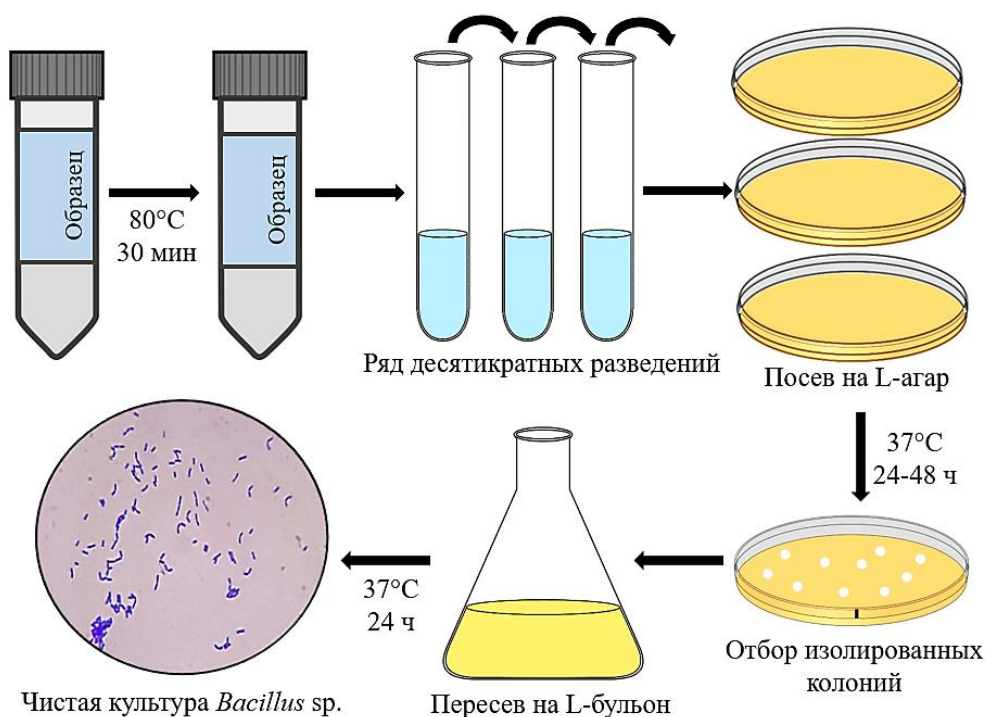


Рисунок 1 – Схема выделения и отбора штаммов *Bacillus* spp.

Всего для исследования было выделено 17 новых штаммов рода *Bacillus* из различных источников. Для каждого из штаммов была проведена первичная идентификация до вида по биохимическим признакам с помощью тест-систем Microgen Bacillus ID [149, 150]. Затем штаммы получили дополнительную идентификацию в ведущих российских коллекциях микроорганизмов (ВКПМ, ВКСМ, ГКПМ-Оболенск) в ходе данного и других исследований (таблица 3).

Таблица 3 – Методы идентификации штаммов *Bacillus* spp.

Название и номер штамма в коллекции ИЦ	Метод идентификации			
	Тест-система Microgen Bacillus ID	Тест-система Biolog Gen III Microplate	Секвенирование 16S рРНК	Определение средней идентичности нуклеотидов (ANI)
<i>B. atrophaeus</i> 1	<i>B. subtilis</i>	<i>B. atrophaeus</i> *	-	-
<i>B. atrophaeus</i> 7	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. atrophaeus</i> *	-	-
<i>B. atrophaeus</i> 8	<i>B. licheniformis</i>	-	<i>B. atrophaeus</i> **	-
<i>B. mojavensis</i> 9	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. mojavensis</i> *	-	-
<i>B. pumilus</i> 4	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i> *	-	-
<i>B. pumilus</i> 7	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i> *	-	-
<i>B. pumilus</i> 16	<i>B. pumilus</i>	-	<i>B. pumilus</i> **	-
<i>B. safensis</i> 1F	<i>B. firmus</i>	-	-	<i>B. safensis</i> ***
<i>B. safensis</i> 2F	<i>B. firmus</i>	-	-	<i>B. safensis</i> ***
<i>B. safensis</i> 5P	<i>B. pumilus</i>	-	-	<i>B. safensis</i> ***
<i>B. safensis</i> 5	<i>B. licheniformis</i>	-	-	<i>B. safensis</i> ***
<i>B. safensis</i> 6P	<i>B. pumilus</i>	-	-	<i>B. safensis</i> ***
<i>B. safensis</i> 6	<i>B. licheniformis</i>	-	<i>B. safensis</i> **	-
<i>B. subtilis</i> 1/8	<i>B. megaterium</i>	-	<i>B. subtilis</i> *	-
<i>B. subtilis</i> 3F	<i>B. firmus</i>	-	-	<i>B. subtilis</i> ***
<i>B. subtilis</i> 10	<i>B. licheniformis</i>	-	-	<i>B. subtilis</i> ***
<i>B. toyonensis</i> 15	<i>B. lentus</i>	-	<i>B. toyonensis</i> **	-

* штамм идентифицирован на базе ВКСМ, ** штамм идентифицирован на базе ВКПМ, *** штамм идентифицирован на базе ГКПМ-Оболенск

По морфологическим признакам выделенные штаммы существенно различались. При культивировании на L агаре при 37 °С в течение 24 ч все штаммы формировали колонии со сложной структурой. Всего было выделено 5 морфологических типов колоний. Для 59% штаммов были характерны белые выпуклые колонии 2–6 мм в диаметре с ровным или волнистым краем и выраженной складчатостью в центре. Такие колонии формировали штаммы *B. safensis* 5, *B. atrophaeus* 1, *B. pumilus* 4, *B. pumilus* 7, *B. pumilus* 16, *B. safensis* 1F, *B. safensis* 2F и *B. subtilis* 3F. На остальные морфотипы приходилось по 6–17% штаммов. Штаммы *B. subtilis* 10, *B. subtilis* 1/8 и *B. mojavensis* 9 формировали крупные белые колонии от 6–10 мм до 30–40 мм в диаметре с волнистым

или неровным краем и матовой шероховатой поверхностью. Штаммы *B. safensis* 6 и *B. toyonensis* 15 образовывали колонии другого морфотипа. Для них были характерны колонии 3–10 мм в диаметре белого или светло бежевого цвета с ровным краем, плоским профилем и гладкой матовой поверхностью. Штамм *B. atrophaeus* 8 образовывал круглые колонии 3–4 мм в диаметре желто-зеленого цвета с валиком по краю. Для штамма *B. atrophaeus* 7 были характерны круглые колонии от средних 3–4 мм до крупных 12–14 мм в диаметре белого цвета с волнистым краем и матовой складчатой поверхностью (рисунок 2).

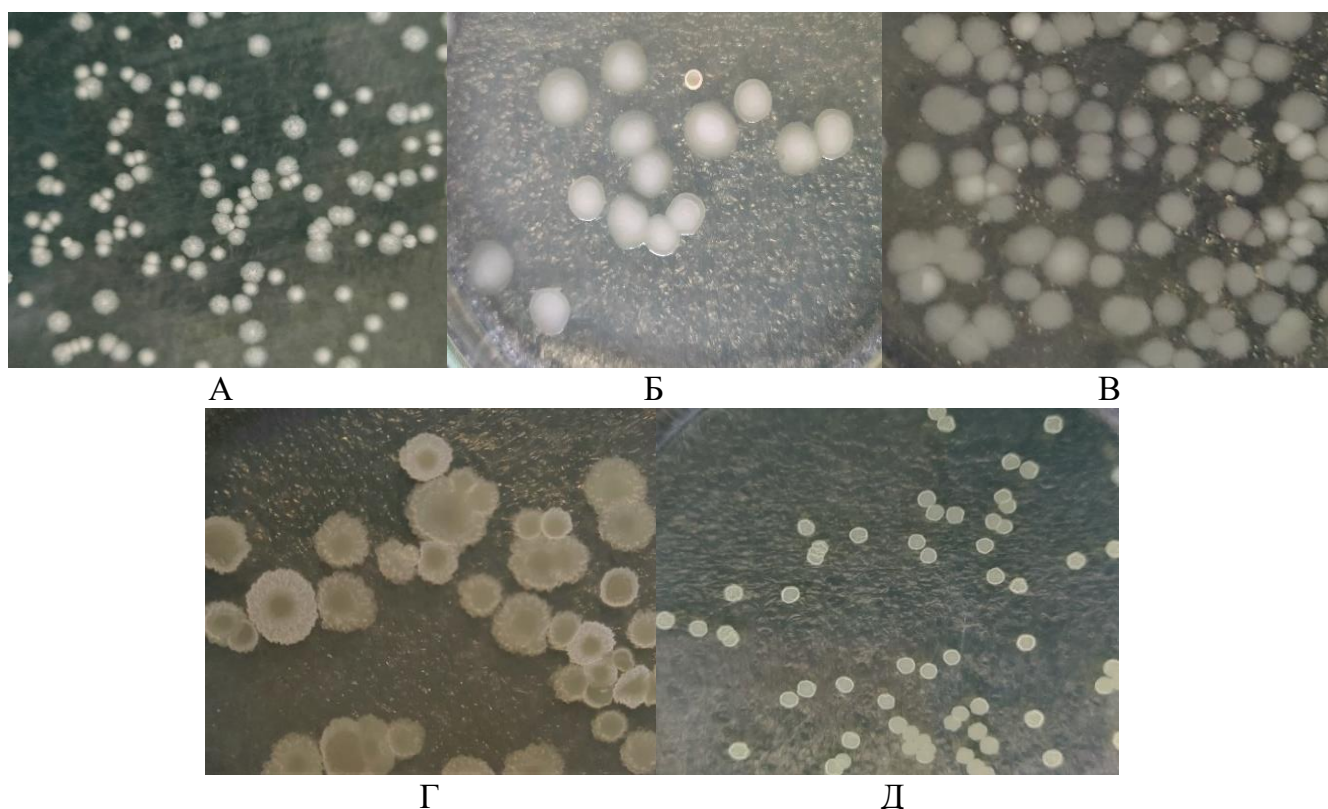


Рисунок 2 – Морфологические типы колоний новых штаммов *Bacillus* spp.: А – *B. safensis* 5; Б – *B. safensis* 6; В – *B. subtilis* 1/8; Г – *B. atrophaeus* 7; Д – *B. atrophaeus* 8

В данном исследовании морфологические различия штаммов, принадлежащих к одному виду, не позволяют относить их к одной группе по морфологии, что согласуется с выводами других исследователей о том, что для бактерий рода *Bacillus* характерна высокая вариативность межвидовой и внутривидовой морфологии колоний. Особенно гетерогенны колонии видов *B. licheniformis* и *B. subtilis*. Различия во внешнем виде колоний могут быть обусловлены количеством продуцируемого матрикса или локальной гибелью клеток [134, 151]. Также гетерогенность морфологии колонии, идентифицированных как один вид, может быть связана с выделением штаммов из

разных экологических ниш. Адаптация к существованию в конкретной нише может приводить к изменению пространственной организации колоний и формированию бактериальной популяции с другими признаками [152, 153].

Помимо этого, для трёх штаммов установлена продукция пигментов, вызывающая окрашивание колоний и среды в коричневый или коричнево-розовый цвета. Пигментообразование штаммов зависело от времени и температуры культивирования. Для штамма *B. subtilis* 3F характерное окрашивание колоний появлялось при росте 18–24 ч при 37 °С. Штаммы *B. atrophaeus* 8 и *B. atrophaeus* 1 накапливают пигмент при температуре не выше 30 °С и полностью меняют цвет колонии только через 48–72 ч (рисунок 3).



Рисунок 3 – Пигментообразование у штаммов *Bacillus* spp.: А – *B. atrophaeus* 1; Б – *B. atrophaeus* 8; В – *B. subtilis* 3F

Пигментация колоний у представителей рода *Bacillus* spp. отмечена для видов *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. infantis* [154, 155]. Чаще всего цвет колоний связывают с продукцией одного или нескольких видов каротиноидов. Для бактерий *B. firmus* или близких к ним видам характерно наличие специфичных розовых каротиноидов [156].

Для разработки прототипа биологического препарата был проведен скрининг новых штаммов споровых бактерий рода *Bacillus* по критерию выраженной антагонистической активности к широкому спектру патогенных микроорганизмов. Антагонизм штаммов оценивали по отношению к 15 тест-культурам, из которых 9

штаммов грамотрицательных бактерий, 5 штаммов грамположительных бактерий и 7 штаммов грибов. Все тест-культуры были выделены из использованного подстилочного материала животноводческих помещений или от животных и людей с признаками бактериальной или грибковой инфекции.

Enterobacteriaceae – семейство патогенных и условно-патогенных бактерий, вызывающих различные инфекционные заболевания. Представители этого семейства широко распространены в животноводческих комплексах и фермах. Они обнаруживаются в воздухе, подстилке и на поверхностях помещений. Энтеробактерии часто выделяются от животных с признаками желудочно-кишечных инфекций. Большинство изолятов при этом идентифицируют как виды *E. coli*, *C. freundii*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *S. marcescens*, *Morganella morganii* [157–159].

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* относятся к 3 и 4 группам патогенности и вызывают мастит, сепсис, инфекции желудочно-кишечного и репродуктивного трактов [157–160]. Лечение этих заболеваний затрудняется распространением резистентности к β -лактамным антибиотикам у циркулирующих в сельском хозяйстве штаммов [160, 161]. В связи с чем при разработке биологического препарата отбирали штаммы, угнетающие рост тест-культур данных видов.

Антагонистическая активность в отношении всех исследуемых тест-культур *E. coli* отмечена для 23,5% штаммов *Bacillus* spp. Не обнаружен антагонизм к *E. coli* у 5,9% штаммов бацилл. Для 70,6% штаммов зафиксировано подавление не более половины тест-культур кишечных палочек.

Ингибирование других тест-культур, принадлежащих к группе БГКП (*C. freundii* и *S. marcescens*), отмечено только у нескольких штаммов *Bacillus* spp. (17,6%). Результаты исследования приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Антагонистическая активность штаммов *Bacillus* spp. в отношении энтеробактерий (M±m)

Исследуемый штамм	Тест-культура								
	<i>E. coli</i> Pr4	<i>E. coli</i> 6T	<i>E. coli</i> 9T	<i>E. coli</i> 10T	<i>E. coli</i> 11T	<i>E. coli</i> 12T	<i>C. freundii</i> 1	<i>C. freundii</i> 4	<i>S. marcescens</i> 1
	Зона угнетения роста, мм								
<i>B. atrophaeus</i> 1	1,0±0,0	2,0±0,0	3,0±0,1	2,0±0,0	2,7±0,1	3,0±0,0	2,0±0,0	1,5±0,0	4,0±0,1
<i>B. atrophaeus</i> 7	1,0±0,0	4,0±0,1	2,7±0,1	3,0±0,0	3,0±0,1	3,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	3,4±0,1
<i>B. atrophaeus</i> 8	2,0±0,1	2,0±0,1	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	-*	-	3,0±0,0
<i>B. mojavensis</i> 9	-	2,3±0,1	2,0±0,0	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i> 4	-	3,0±0,0	5,0±0,2	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i> 7	-	4,0±0,0	4,7±0,2	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i> 16	-	3,7±0,1	4,0±0,1	5,0±0,1	-	-	-	-	-
<i>B. safensis</i> 1F	-	4,0±0,0	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. safensis</i> 2F	-	4,0±0,0	4,7±0,1	-	-	-	-	-	-
<i>B. safensis</i> 5P	-	3,0±0,0	2,0±0,0	-	-	-	-	-	-
<i>B. safensis</i> 5	-	3,7±0,1	3,0±0,0	-	-	-	-	-	-
<i>B. safensis</i> 6P	-	3,3±0,1	3,5±0,0	-	-	-	-	-	-
<i>B. safensis</i> 6	8,5±0,3	7,0±0,2	11,0±0,5	7,5±0,2	8,1±0,4	10,0±0,5	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 1/8	1,0±0,0	3,7±0,1	3,0±0,0	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 3F	2,7±0,1	5,0±0,0	4,0±0,0	-	-	-	2,0±0,0	2,0±0,0	-
<i>B. subtilis</i> 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. toyonensis</i> 15	-	4,0±0,0	5,7±0,2	2,0±0,1	-	-	-	-	-

*: «-» – антагонизм не зафиксирован.

Подавление роста грамотрицательных бактерий может быть связано с продукцией рибосомальных и нерибосомальных пептидов. Такие соединения обнаруживаются в культуральной жидкости *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. velezensis*, *B. mojavensis* [162–164]. Однако продукция бактерицидных метаболитов, активных в отношении грамотрицательных микроорганизмов, по литературным данным, зафиксирована не для всех видов рода *Bacillus*. В частности, гены бацилизина – пептида, подавляющего рост *E. coli*, обнаружены только у видов группы *Bacillus subtilis*. При этом штаммы видов *B. pumilus* и *B. licheniformis* лишены одного или нескольких генов необходимых для продукции данного соединения [162, 165].

Помимо этого, проявление антагонизма в отношении грамотрицательных бактерий не всеми штаммами бацилл может быть связано со сложными механизмами регуляции продукции антимикробных соединений. Синтез таких соединений зависит от влияния внешних факторов [162, 166], межклеточных взаимодействий [166] и возникновения мутаций при одомашнивании природных штаммов [167, 168]. В связи с чем условия культивирования и метод определения антагонистической активности могли существенно повлиять на полученные результаты.

К широко распространенным в сельскохозяйственных комплексах бактериям также относятся бактерии рода *Staphylococcus*, которые являются возбудителями инфекционных заболеваний животных. Например, виды *St. aureus*, *St. xylosus*, *St. epidermidis*, *St. gallinarum*, *St. intermedius*, *St. saprophyticus*, *St. lentus*, *St. cohnii*, *St. simulans* выделяются от больных животных и птиц при пододерматите, септическом артрите, мастите, эндометрите, ортопедических патологиях и раневых инфекциях [169–173]. Серьезную опасность представляют антибиотикоустойчивые штаммы стафилококков и особенно метициллин резистентный *St. aureus* (methicillin-resistant *St. aureus* – MRSA). Для штаммов MRSA установлена возможность передачи от животных или продуктов животноводства к человеку и дальнейшему распространению патогена среди людей [173, 174]. Исходя из этого при разработке биопрепарата проводили отбор штаммов, обладающих высокой антагонистической активностью к разным видам вирулентных стафилококков.

Согласно полученным данным антагонистическую активность в отношении тест-культур стафилококков проявляли все исследуемые штаммы *Bacillus* spp. Угнетение роста всех культур *Staphylococcus* spp. отмечено для 88% штаммов бацилл (таблица 5).

Таблица 5 – Антагонистическая активность штаммов *Bacillus* spp. в отношении бактерий *Staphylococcus* spp. (M±m)

Исследуемый штамм	Тест-культура				
	<i>St. xylosus</i> 3	<i>St. lentus</i> 1T	<i>St. aureus</i> 2T	<i>St. gallinarum</i> 3T	<i>St. epidermidis</i> 1
	Зона угнетения роста, мм				
<i>B. atrophaeus</i> 1	3,3±0,1	2,0±0,0	3,5±0,3	2,0±0,0	5,5±0,2
<i>B. atrophaeus</i> 7	10,0±0,3	10,3±0,5	11,0±0,0	18,5±0,7	13,0±0,4
<i>B. atrophaeus</i> 8	4,3±0,1	2,3±0,2	4,3±0,1	4,7±0,1	5,0±0,0
<i>B. mojaviensis</i> 9	10,2±0,3	3,0±0,0	9,7±0,3	5,5±0,2	7,3±0,2
<i>B. pumilus</i> 4	13,0±0,4	3,3±0,2	9,0±0,0	3,5±0,1	20,0±0,6
<i>B. pumilus</i> 7	13,0±0,3	4,7±0,2	9,1±0,4	4,3±0,2	15,0±0,0
<i>B. pumilus</i> 16	13,3±0,6	4,3±0,1	7,0±0,0	5,0±0,0	15,3±0,6
<i>B. safensis</i> 1F	12,5±0,2	-*	15,7±0,7	-	16,0±0,0
<i>B. safensis</i> 2F	15,0±0,5	6,0±0,0	10±0,3	5,0±0,0	23,1±1,1
<i>B. safensis</i> 5P	13,0±0,0	5,7±0,1	10,7±0,3	5,0±0,0	18,0±0,5
<i>B. safensis</i> 5	14,0±0,5	4,3±0,2	8,0±0,2	4,5±0,0	14,0±0,6
<i>B. safensis</i> 6P	10,3±0,4	7,0±0,0	9,7±0,3	4,0±0,0	14,0±0,3
<i>B. safensis</i> 6	16,5±0,7	7,5±0,3	19,0±0,5	10,3±0,5	17,5±0,7
<i>B. subtilis</i> 1/8	19,7±0,6	8,0±0,0	20,4±0,6	8,0±0,0	19,5±0,7
<i>B. subtilis</i> 3F	13,3±0,2	3,5±0,2	5,7±0,1	7,0±0,5	4,0±0,0
<i>B. subtilis</i> 10	5,5±0,2	-	5,0±0,0	7,0±0,0	6,0±0,0
<i>B. toyonensis</i> 15	8,0±0,0	4,0±0,0	9,5±0,4	10,5±0,5	8,0±0,0

*: «-» – антагонизм не зафиксирован

Исследуемые штаммы бацилл показали разную степень антагонизма в отношении культур *Staphylococcus* spp. Высокая антагонистическая активность (зоны ингибирования более 10 мм) ко всем штаммам стафилококков установлена только для *B. atrophaeus* 7 (6%). Для 76% штаммов высокая степень антагонизма отмечена при действии как минимум на 1 тест-культуру. Остальные 18% штаммов показали зоны угнетения роста менее 10 мм для всех исследуемых тест-культур *Staphylococcus* spp.

Антагонистическая активность бактерий рода *Bacillus* в отношении *Staphylococcus* spp. может реализовываться различными механизмами. Вторичные метаболиты *Bacillus* spp. способны снижать адгезию клеток стафилококков на среде, блокируя межклеточную коммуникацию и нарушая синтез полисахаридов биопленки [92, 175]. Помимо этого, продуцируемые бациллами пептиды могут воздействовать на клеточную мембрану стафилококков, образуя в ней поры и вызывая разрушение клеток [176].

Среди патогенных культур грибов в качестве тест-культур использовали штаммы *C. albicans* и *Geotrichum* spp. Грибы рода *Candida* вызывают микозы пищеварительной и мочеполовой систем у человека и животных. Наиболее распространённым видом

является полиморфный вид *C. albicans*. Изменение морфологии с дрожжевой на гифальную ведет к повышению вирулентности и устойчивости штамма к факторам среды [177, 178].

Род *Geotrichum* относится к 4 группе патогенности и способен вызывать грибковые инфекции у растений, животных и человека. В литературе описаны случаи поражения кожи и легких у сельскохозяйственных и домашних животных, а также аборт у КРС по причине геотрихоза [179–181]. В связи с чем исследуемые штаммы *Bacillus* spp. также проверяли на антагонизм к грибковым инфекционным агентам.

В отношении дрожжей *Candida* антагонистической активностью обладали не все выделенные штаммы *Bacillus* spp. Угнетение роста обеих тест-культур установлено для 41% штаммов. При этом высокий уровень антагонизма отмечен только у 18% исследуемых штаммов *Bacillus* spp. (таблица 6) [182].

Таблица 6 – Антагонистическая активность штаммов *Bacillus* spp. в отношении дрожжей *Candida* spp. (M±m)

Исследуемый штамм	Тест-культура	
	<i>C. albicans</i> 1	<i>C. albicans</i> 2
	Зона угнетения роста, мм	
<i>B. atrophaeus</i> 1	-*	-
<i>B. atrophaeus</i> 7	15,0±0,0	16,0±0,6
<i>B. atrophaeus</i> 8	-	-
<i>B. mojavensis</i> 9	2,0±0,0	-
<i>B. pumilus</i> 4	8,0±0,4	1,0±0,0
<i>B. pumilus</i> 7	5,0±0,0	1,0±0,0
<i>B. pumilus</i> 16	5,0±0,0	-
<i>B. safensis</i> 1F	-	-
<i>B. safensis</i> 2F	-	-
<i>B. safensis</i> 5P	7,0±0,0	2,3±0,1
<i>B. safensis</i> 5	-	-
<i>B. safensis</i> 6P	-	1,0±0,0
<i>B. safensis</i> 6	9,3±0,2	5,7±0,2
<i>B. subtilis</i> 1/8	13,5±0,3	11,0±0,0
<i>B. subtilis</i> 3F	18,0±0,7	10,7±0,3
<i>B. subtilis</i> 10	-	-
<i>B. toyonensis</i> 15	-	-

*: «-» – антагонизм не зафиксирован

Вероятно, подавление роста *C. albicans* бациллами связано с продукцией метаболитов, обладающих антифунгальной активностью. Так для многих видов *Bacillus* spp., принадлежащих к группе *B. subtilis*, установлен синтез липопептидов, летучих

соединений и ферментов, обеспечивающих их антагонизм в отношении штаммов *Candida* spp. [183–186].

По результатам исследований антагонистическую активность в отношении тест-культур *Geotrichum* spp проявляли все штаммы бацилл. Наибольшее ингибирование грибов отмечено для штамма *B. toyonensis* 15. Результаты исследования антагонизма штаммов *Bacillus* spp. представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Антагонистическая активность штаммов *Bacillus* spp. в отношении грибов *Geotrichum* spp. (M±m)

Штамм	Тест-культура				
	<i>Geotrichum</i> sp. 1	<i>Geotrichum</i> sp. 2	<i>Geotrichum</i> sp. 4	<i>Geotrichum</i> sp. 5	<i>Geotrichum</i> sp. 6
	Ингибирующая активность, %				
<i>B. atrophaeus</i> 1	33,5±5,2	30,3±2,8	49,6±3,4	31,9±8,1	32,7±5,2
<i>B. atrophaeus</i> 7	48,2±1,6	52,3±0,4	56,2±2,9	57,8±0,7	44,3±1,1
<i>B. atrophaeus</i> 8	47,6±0,4	42,4±2,1	55,6±4,6	47,6±5,6	51,4±1,4
<i>B. mojavensis</i> 9	32,5±2,1	22,1±0,3	15,1±4,1	21,3±3,3	10,5±2,6
<i>B. pumilus</i> 4	38,2±1,9	42,9±1,2	43,6±0,3	47,5±3,5	37,3±0,1
<i>B. pumilus</i> 7	43,5±0,2	26,2±1,8	23,2±1,2	34,1±1,8	46,9±4,5
<i>B. pumilus</i> 16	20,2±3,0	30,1±3,9	11,8±0,2	8,1±1,6	27,9±0,8
<i>B. safensis</i> 1F	45,2±1,2	27,9±0,6	20,2±1,2	22,1±4,7	29,2±5,1
<i>B. safensis</i> 2F	39,5±5,4	40,9±7,4	5,8±1,1	46,8±0,0	48,4±0,1
<i>B. safensis</i> 5P	46,4±1,9	28,1±6,5	35,8±4,8	43,3±2,4	46,1±0,0
<i>B. safensis</i> 5	43,9±0,5	33,9±7,9	-8,3±1,9	37,2±3,5	37,9±1,9
<i>B. safensis</i> 6P	45,8±0,4	41,4±3,6	29,6±1,1	43,9±1,2	35,6±1,9
<i>B. safensis</i> 6	9,6±2,8	23,8±0,8	18,9±2,3	25,4±2,0	36,9±3,3
<i>B. subtilis</i> 1/8	39,8±0,5	58,6±1,1	51,9±0,7	57,8±1,6	41,1±4,1
<i>B. subtilis</i> 3F	15,6±2,6	19,8±2,9	31,0±5,1	15,0±2,2	39,2±6,8
<i>B. subtilis</i> 10	45,9±0,2	-7,6±0,3	9,9±1,4	11,1±3,1	24,1±3,9
<i>B. toyonensis</i> 15	77,2±2,4	72,8±1,8	81,4±0,9	80,3±0,8	85,4±1,7

Механизм антифунгальной активности исследуемых штаммов вероятно связан с продукцией гидролитических ферментов и вторичных метаболитов, подавляющих рост мицелия. В частности, ингибирование грибных культур может быть опосредовано действием протеаз и хитиназ бацилл [187]. Помимо этого, биологический контроль патогенных грибов может осуществляться штаммами *Bacillus* spp. путем синтеза липопептидов [188].

При определении антагонизма к грибам *Geotrichum* spp. для ряда штаммов *Bacillus* spp. было установлено ответное угнетение тест-культурами. Так на чашках со штаммами *B. atrophaeus* 7, *B. atrophaeus* 8, *B. atrophaeus* 1, *B. subtilis* 3F и *B. subtilis* 1/8 на границе

их контакта с грибной культурой формировалась зона, где отсутствовал рост бацилл. Такую зону отмечали через 7 дней культивирования (рисунок 4).

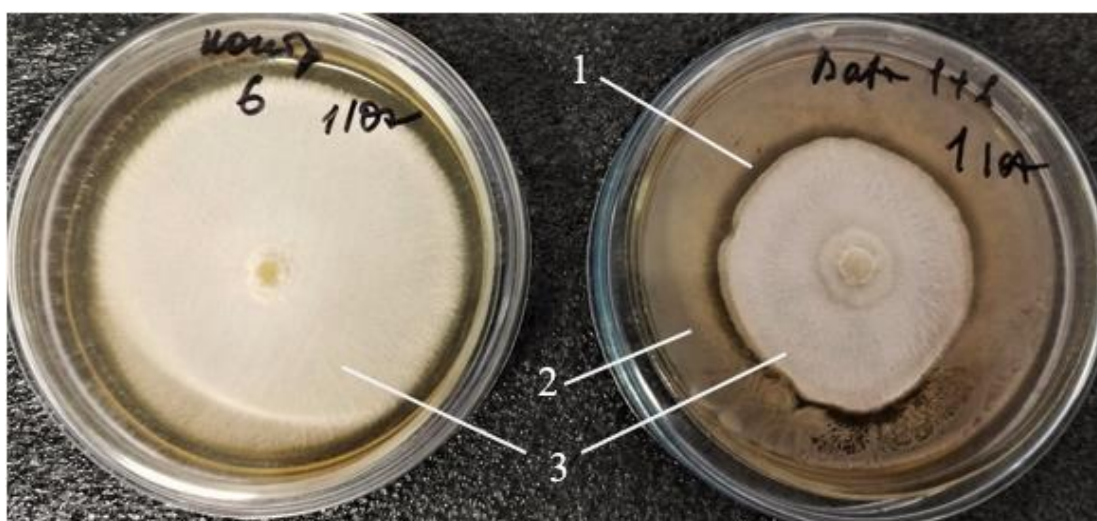


Рисунок 4 – Подавление роста бациллярного штамма тест-культурой: 1 – зона угнетения роста штамма *B. atrophaeus* 1; 2 – газон *B. atrophaeus* 1; 3 – колония *Geotrichum* sp. 6

Образование зоны лизиса на границе контакта штаммов бацилл со штаммами *Geotrichum* указывает на продукцию тест-культурами соединений, активных в отношении грамположительных бактерий. Другие исследователи также отмечают синтез антимикробных метаболитов штаммами рода *Geotrichum*. Так Omeike et al. (2021) выделили пептид из культуральной жидкости штамма *Geotrichum candidum* OMON-1, проявляющий активность в отношении *St. aureus* и *Enterococcus faecalis* [189]. Помимо этого, штаммы *Geotrichum* способны к продукции фенилмолочной кислоты, ингибирующей рост некоторых бактерий и грибов [190, 191].

Результаты скрининга штаммов *Bacillus* spp. по критерию антимикробной активности в отношении широко распространенных инфекционных агентов представляли в виде балльной системы. Высокий уровень антагонизма оценивали в 3 балла, средний – в 2 балла, низкий – в 1 балл. Уровень антагонизма определяли по размеру зон задержки роста тест-культуры или по величине индекса ингибирования. Полученные результаты балльной оценки представлены на рисунке 5.

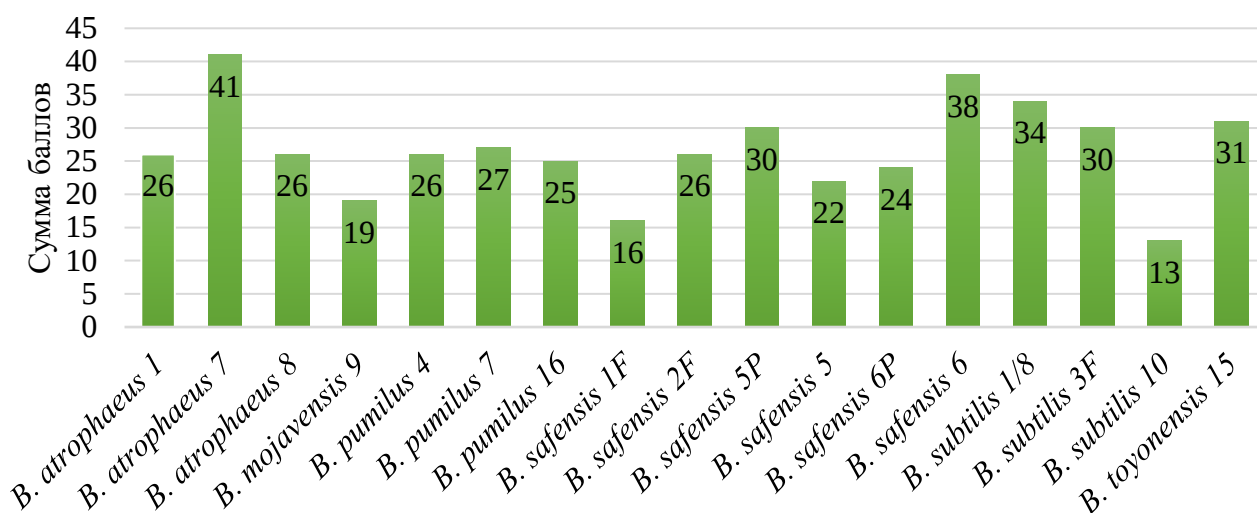


Рисунок 5 – Баллы штаммов *Bacillus* spp. по результатам скрининга антимикробной активности

В соответствии с данными, представленными на рисунке 5, наибольшие баллы получили штаммы *B. atrophaeus* 7 (41 балл), *B. safensis* 6 (38 баллов) и *B. subtilis* 1/8 (34 балла). Именно эти штаммы были использованы для разработки биологического препарата как обладающие выраженной антагонистической активностью.

Морфология клеток выбранных штаммов была схожей: грамположительные подвижные палочки размером 0,7–1,0×2,0–3,0 мкм, располагаются одиночно или парами, редко образуют короткие цепочки (рисунок 6). При культивировании более 24–48 ч на L бульоне образуют споры.

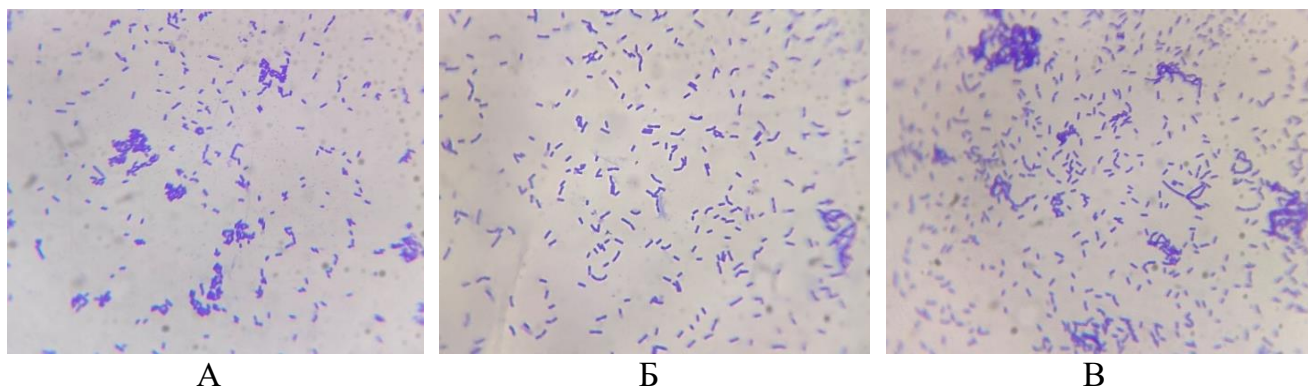


Рисунок 6 – Морфология клеток штаммов *Bacillus* spp., окрашивание по Граму (×1000):

А – штамм *B. atrophaeus* 7; Б – штамм *B. safensis* 6; В – *B. subtilis* 1/8

Колонии штаммов на L агаре, напротив, имели существенные различия между штаммами и были отнесены к разным морфотипам. Так для штамма *B. atrophaeus* 7 были характерны округлые колонии, от средних 3–4 мм до крупных 12–14 мм, белого цвета с

волнистым краем и матовой шероховатой поверхностью. Штамм *B. safensis* 6 на L агаре давал круглые концентрические колонии, белого цвета, размером 3–10 мм с гладкой блестящей поверхностью. Колонии штамма *B. subtilis* 1/8 амёбовидные, размером 5–10 мм, белые с матовой поверхностью (рисунок 2).

Штаммы *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 были идентифицированы в ВКСМ с использованием тест-системы Biolog Gen III Microplate и секвенирования гена 16S рРНК. Штамм *B. atrophaeus* 7 был идентифицирован на основе анализа его фенотипического профиля с помощью тест-системы Biolog Gen III Microplate. Согласно полученным результатам штамм был отнесен к виду *B. atrophaeus* и вероятность верного определения составил 90,1%. Использование микропланшетов GEN III позволяет идентифицировать штаммы микроорганизмов на основании 96 биохимических тестов. По литературным данным точность идентификации данной тест-системой составляет 71–85% и часто совпадает по результату определения вида с результатами анализа последовательностей 16S рРНК [192, 193].

Для штамма *B. subtilis* 1/8 была проведена идентификация с помощью секвенирования переменных участков гена кодирующих 16S рРНК. В результате штамм был определен как вид *B. subtilis* с вероятностью 100%.

Штамм *B. safensis* 6 был идентифицирован в ВКПМ на основе анализа 16S рРНК. По результатам исследования штамм оказался наиболее близок к виду *B. safensis* (99%).

После идентификации штаммы *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 были депонированы в ВКСМ как штаммы, обладающие выраженной антагонистической активностью в отношении бактерий группы кишечных палочек, бактериям рода *Staphylococcus* и грибам *C. albicans*. А штамм *B. safensis* 6 был депонирован в ВКПМ как перспективный для разработки биологических препаратов (приложение В). На штаммы *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 получены патенты (приложение В).

Таким образом, для разработки биологического препарата из различных источников было выделено 17 штаммов *Bacillus* spp. Выделенные штаммы были исследованы на способность проявлять антагонистическую активность в отношении наиболее распространенных в сельском хозяйстве патогенных микроорганизмов. По результатам скрининга были отобраны штаммы *B. safensis* 6, *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 как перспективные для включения их в микробный препарат.

3.1.2 Выделение и скрининг антагонистической активности штаммов *Lactobacillus* spp.

Род *Lactobacillus* был предложен в начале XX в М. Бейеринком. Данный род включал более 250 видов, гетерогенных по своим свойствам. В связи с чем в 2020 году была предложена реклассификация рода на 25 новых родов в соответствии с их фенотипическими и генетическими признаками [194]. В данном исследовании новые штаммы были идентифицированы на основании их характеристик, описанных в руководстве Берджи, где представлен более ранний вариант классификации. В связи с этим для обозначения штаммов, не получивших генетическую идентификацию, в исследовании применяли родовое название в соответствии с последним изданием справочника Берджи [134].

Выделение и отбор штаммов лактобацилл проводили по схеме, представленной на рисунке 7.

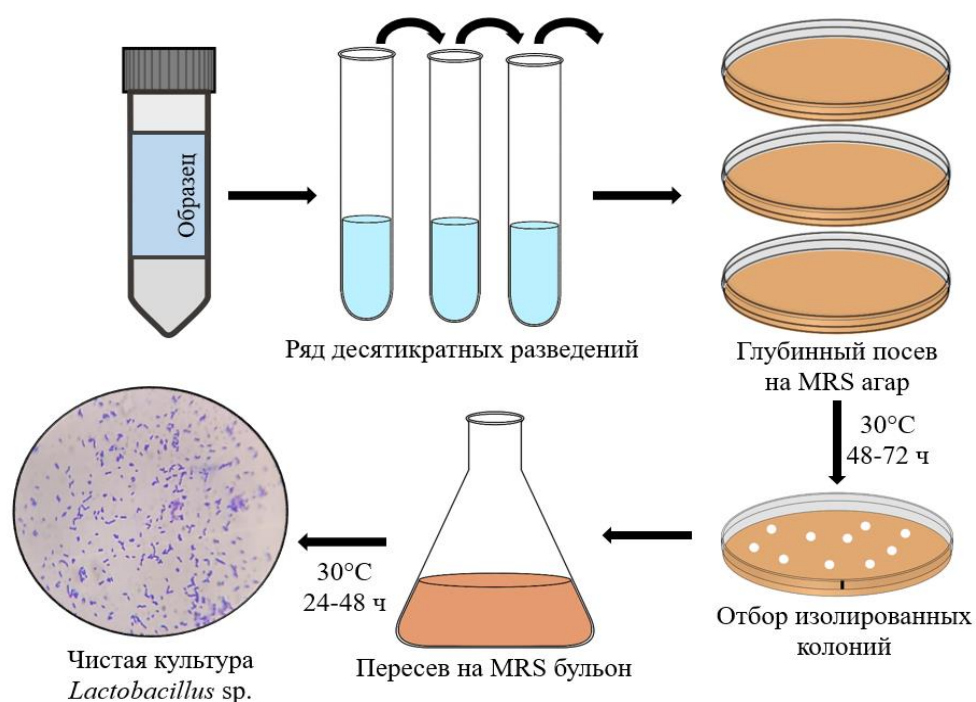


Рисунок 7 – Схема выделения и отбора штаммов *Lactobacillus* spp.

По данной схеме было выделено и доведено до чистой культуры 8 штаммов лактобактерий. Все штаммы по морфолого-культуральным признакам в соответствии с определителем Берджи были определены как представители рода *Lactobacillus* [134]. Видовая идентификация штаммов методами классической микробиологии и биохимии затруднительна ввиду высокой вариативности признаков лактобацилл [194].

Морфологические признаки у большинства штаммов *Lactobacillus* spp. были схожими. Все штаммы при росте на MRS агаре формировали поверхностные и глубинные колонии. На поверхности плотной среды за 48 ч формировали небольшие, 1–2 мм в диаметре, округлые колонии белого или кремового цвета с ровным краем и блестящей поверхностью. Глубинные колонии у ряда штаммов различались: для штаммов *Lactobacillus* 3М и *Lactobacillus* 9 были характерны колонии 1–3 мм в диаметре в виде дисков или зерен гречихи, остальные штаммы формировали в толще среды колонии только в виде дисков (рисунок 8).



А



Б

Рисунок 8 – Морфология колоний новых штаммов *Lactobacillus* spp. на среде MRS: А – *Lactobacillus* 8Б; Б – *Lactobacillus* 3М

Согласно полученным данным антагонистической активностью в отношении тест-культур энтеробактерий обладали 75% штаммов *Lactobacillus* spp. При этом подавление роста всех тест-культур отмечено для 37,5% штаммов. Отсутствие антагонизма к БГКП зафиксировано у 25% штаммов. Результаты данного исследования представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Антагонистическая активность штаммов *Lactobacillus* spp. в отношении энтеробактерий (М±m)

Исследуемый штамм	Тест-культура								
	<i>E. coli</i> Pr4	<i>E. coli</i> 6T	<i>E. coli</i> 9T	<i>E. coli</i> 10T	<i>E. coli</i> 11T	<i>E. coli</i> 12T	<i>C. freundii</i> 1	<i>C. freundii</i> 4	<i>S. marcescens</i> 1
	Зона угнетения роста, мм								
<i>Lactobacillus</i> sp. ЛВ	12,5±0,7	14,0±1,0	10,0±0,0	12,0±0,0	12,5±0,6	13,3±0,7	13,8±0,9	12,0±0,0	12,0±0,6
<i>Lactobacillus</i> sp. М	10,0±0,0	14,5±0,7	9,0±0,0	10,0±0,0	12,5±0,7	11,5±0,6	12,3±0,7	9,0±0,8	10,5±0,6
<i>Lactobacillus</i> sp. 2	-*	-	-	12,5±0,7	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 3М	10,0±0,0	10,5±0,7	11,0±0,0	10,5±0,7	11,5±0,7	10,5±0,7	9,5±0,3	-	10,5±0,6
<i>Lactobacillus</i> sp. 4М	-	-	-	-	-	10,0±0,0	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 5М	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 8Б	11,0±0,3	10,5±0,7	10,0±0,0	12,3±0,6	12,0±0,0	11,5±0,7	12,5±0,7	10,0±0,3	9,5±0,3
<i>Lactobacillus</i> sp. 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: «-» – антагонизм не зафиксирован

Вероятно, антагонизм исследуемых штаммов *Lactobacillus* spp. основан на продукции низкомолекулярных антимикробных метаболитов – бактериоцинов. В частности, активностью в отношении грамотрицательных микроорганизмов обладают гассерицин, плантарицин и курвацин, синтезируемые лактобактериями [195–197].

Органические кислоты также считают одним из основных механизмов подавления патогенной микрофлоры у бактерий рода *Lactobacillus*. У штаммов лактобактерий отмечают продукцию молочной, уксусной, лимонной и янтарной кислот [198]. Однако в отношении энтеробактерий закисление среды может быть неэффективным, в связи с наличием у родов *Escherichia*, *Citrobacter* и *Serratia* ферментных систем, позволяющим им существовать в условиях низких значений pH [199].

Активностью в отношении бактерий *Staphylococcus* spp. обладали все исследуемые штаммы лактобацилл. При этом 62,5% штаммов *Lactobacillus* spp. ингибировали рост всех тест-культур (таблица 9).

Таблица 9 – Антагонистическая активность штаммов *Lactobacillus* spp.
в отношении бактерий *Staphylococcus* spp. (M±m)

Исследуемый штамм	Тест-культура				
	<i>St. xylosus</i> 3	<i>St. lentus</i> 1Т	<i>St. aureus</i> 2Т	<i>St. gallinarum</i> 3Т	<i>St. epidermidis</i> 1
	Зона угнетения роста, мм				
<i>Lactobacillus</i> sp. ЛВ	20,7±0,6	31,0±1,2	19,5±0,7	26,8±1,5	16,7±0,6
<i>Lactobacillus</i> sp. М	18,0±0,7	30,7±1,2	19,5±0,6	26,7±2,8	14,5±0,7
<i>Lactobacillus</i> sp. 2	-*	23,3±0,6	-	21,8±1,3	13,5±0,7
<i>Lactobacillus</i> sp. 3М	17,5±0,7	29,3±0,9	15,5±0,7	28,0±1,2	19,0±1,0
<i>Lactobacillus</i> sp. 4М	-	26,0±1,4	-	22,8±0,9	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 5М	-	22,5±0,7	-	23,8±0,5	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 8Б	15,0±0,3	28,3±0,6	15,0±0,3	25,0±0,7	12,5±0,6
<i>Lactobacillus</i> sp. 9	12,3±0,2	25,5±0,6	8,3±0,2	21,8±1,3	14,3±0,9

*: «-» – антагонизм не зафиксирован

По результатам, представленным в таблице 9 видно, что все исследуемые лактобациллы подавляют рост штаммов *St. lentus* 1Т и *St. gallinarum* 3Т более интенсивно, чем других тест-культур стафилококков. Возможно данные штаммы *Staphylococcus* spp. не имеют систем, предотвращающих пагубное действие антимикробных метаболитов на клетки.

Полученные нами результаты указывают на большее подавление штаммами *Lactobacillus* spp. грамположительных бактерий по сравнению с грамотрицательными.

Аналогичную корреляцию отмечают и другие исследователи [195, 200, 201]. Большая распространенность антагонизма к грамположительным бактериям может быть связана с выработкой бактериоцинов, которые часто нацелены на виды микроорганизмов с тем же типом клеточной стенки [200,201].

В результате проведенных исследований не было установлено антагонизма штаммов *Lactobacillus* spp. к дрожжам *Candida*. В исследованиях других ученых были получены аналогичные данные [202]. Причиной этого может являться не подходящий метод оценки антагонистической активности в отношении данного патогена. Метод диффузии в агар имеет свои ограничения и не позволяет отслеживать действие летучих или слаборастворимых метаболитов на рост тест-культуры [203].

Согласно данным, полученным при оценке антагонистической активности *Lactobacillus* spp. в отношении плесневых грибов р. *Geotrichum*, 87,5% штаммов угнетали рост как минимум 1 тест-культуры. При этом 37,5% штаммов лактобактерий ингибировали рост мицелия всех тест-культур. Не зафиксирован антагонизм к культурам *Geotrichum* spp. только для 1 штамма (12,5%) (таблица 10).

Таблица 10 – Антагонистическая активность штаммов *Lactobacillus* spp. в отношении грибов *Geotrichum* spp. (M $\pm$ m)

Исследуемый штамм	Тест-культура				
	<i>Geotrichum</i> sp. 1	<i>Geotrichum</i> sp. 2	<i>Geotrichum</i> sp. 4	<i>Geotrichum</i> sp. 5	<i>Geotrichum</i> sp. 6
	Индекс блокирования роста, %				
<i>Lactobacillus</i> sp. ЛВ	19,90 $\pm$ 1,12	22,62 $\pm$ 2,03	14,13 $\pm$ 2,18	22,47 $\pm$ 3,29	19,69 $\pm$ 0,02
<i>Lactobacillus</i> sp. М	23,58 $\pm$ 2,35	23,20 $\pm$ 1,94	17,74 $\pm$ 2,24	17,89 $\pm$ 1,20	17,86 $\pm$ 3,53
<i>Lactobacillus</i> sp. 2	7,23 $\pm$ 0,46	11,62 $\pm$ 0,33	8,13 $\pm$ 2,09	13,87 $\pm$ 0,23	9,70 $\pm$ 1,57
<i>Lactobacillus</i> sp. 3М	-*	6,84 $\pm$ 2,09	7,99 $\pm$ 0,89	7,43 $\pm$ 0,93	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 4М	-	-	-7,39 $\pm$ 0,64	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 5М	-	3,82 $\pm$ 0,61	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 8Б	19,90 $\pm$ 1,12	15,18 $\pm$ 2,33	15,95 $\pm$ 3,40	15,02 $\pm$ 0,18	19,70 $\pm$ 0,02
<i>Lactobacillus</i> sp. 9	-	-	-	-	-

*: «-» – нет статистически значимых различий между ростом тест-культуры в опыте и контроле, $p > 0,05$

Подавление роста мицелия культур *Geotrichum* spp. можно объяснить продукцией органических кислот и летучих соединений. Так молочную, фенилмолочную и бензойную кислоты, а также такие летучие соединения как диацетил, связывают с антифунгальной активностью лактобацилл в отношении плесневых грибов [204, 205].

Итоговую оценку штаммов *Lactobacillus* spp. по критерию антагонистической активности в отношении распространенных патогенов животных проводили с помощью балльной системы. Итоговая сумма баллов всех штаммов лактобацилл представлена на рисунке 9.

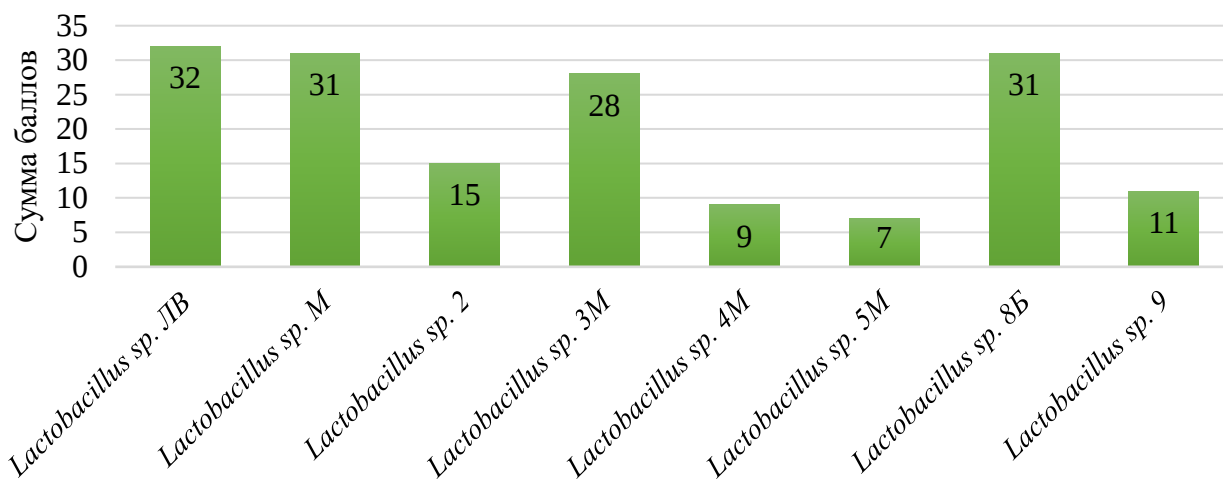


Рисунок 9 – Баллы штаммов *Lactobacillus* spp. по результатам скрининга антимикробной активности

По результатам расчетов наибольшее количество баллов получил штамм *Lactobacillus* ЛВ (32 балла). Для штаммов *Lactobacillus* М и *Lactobacillus* sp. 8Б сумма баллов оказалась на 1 балл меньше максимального результата. Остальные штаммы *Lactobacillus* spp набрали меньшее количество баллов.

Отобранные штаммы *Lactobacillus* spp. обладали морфолого-культуральными признаками типичными для лактобацилл. Клетки штаммов грамположительные неподвижные короткие палочки размером $0,9\text{--}1,2 \times 3\text{--}8$ мкм, располагаются одиночно или парами (рисунок 10).

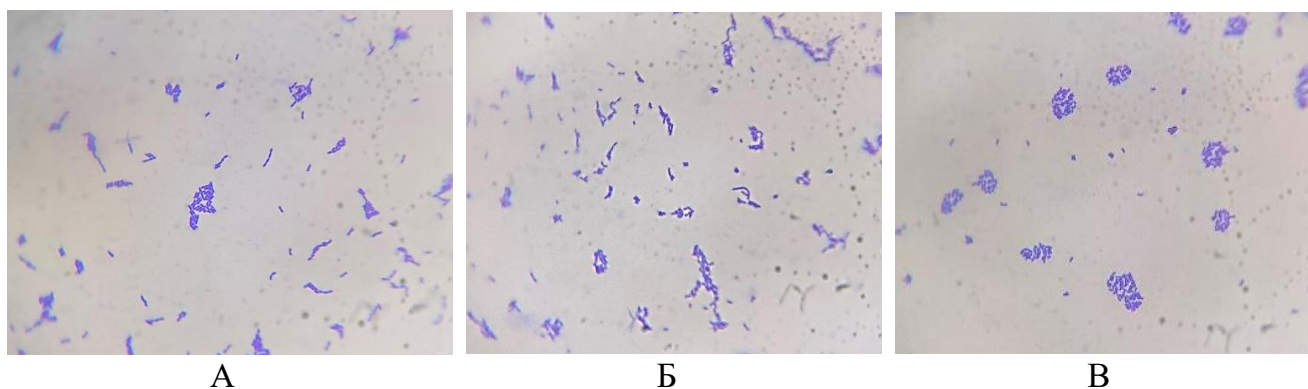


Рисунок 10 – Морфология клеток *Lactobacillus* spp., окраска по Граму ($\times 1000$): А – штамм *Lactobacillus* sp. ЛВ; Б – штамм *Lactobacillus* sp. М; В – штамм *Lactobacillus* sp. 8Б

На жидких средах, при статическом выращивании, штаммы дают преимущественно придонный рост, среда на границе контакта с воздухом остается прозрачной. При глубинном культивировании на агаризованных средах данные штаммы образуют колонии размером 1–3 мм в виде дисков (рисунок 8).

Идентификация штаммов *Lactobacillus* до вида была проведена в ВКПМ. Определение видовой принадлежности было проведено с использованием секвенирования 16S рРНК и видоспецифичных праймеров. В результате штаммы *Lactobacillus* sp. М и *Lactobacillus* sp. ЛВ были идентифицированы как *Lactiplantibacillus plantarum*, а штамм *Lactobacillus* sp. 8Б как *Lactiplantibacillus paraplantarum*. Все отобранные штаммы были депонированы в ВКПМ (приложение Г).

Таким образом, в ходе исследования было выделено 8 новых штаммов *Lactobacillus* spp. из разных естественных сред. По результатам экспериментов широкий спектр антагонистической активности установлен для штаммов *L. plantarum* ЛВ, *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б. Поэтому эти штаммы были выбраны как потенциальные компоненты многоштаммового биологического препарата.

3.1.3 Биосовместимость штаммов

В результате скрининга штаммов, обладающих антагонистической активностью в отношении распространенных возбудителей заболеваний животных, для дальнейших исследований были выбраны штаммы *B. safensis* 6, *B. atrophaeus* 7, *B. subtilis* 1/8, *L. plantarum* ЛВ, *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б. Эти штаммы как действующие компоненты многоштаммового препарата не должны оказывать угнетающего действия на рост друг друга, так как это может существенно снизить его эффективность.

Согласно полученным данным штаммы *Lactiplantibacillus* spp. оказались биосовместимыми между собой. При их совместном культивировании на твердых средах не было зафиксировано зон с ослаблением роста или его полным отсутствием.

Среди штаммов бацилл биосовместимость установлена для штаммов *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 [206]. Рост штамма *B. safensis* 6, при подсеве его к другим штаммам в качестве тест-культуры, подавлялся. При этом на чашках были хорошо заметны зоны угнетения (рисунок 11).



Рисунок 11 – Биосовместимость штаммов *Bacillus* spp.: 1 – штрих штамма *B. atrophaeus* 7; 2 – штрих штамма *B. safensis* 6; 3 – штрих штамма *B. subtilis* 1/8

Антагонизм штаммов *Bacillus* spp друг к другу может связан с выделением в среду соединений, активных к грамположительным бактериям [207, 208]. Например, бактериоцины некоторых штаммов бацилл могут угнетающе действовать на других представителей рода *Bacillus*. Так, бактериоцин туцин обладает антимикробной активностью к *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus* и *B. simplex* [209].

В результате экспериментов установлено, что штамм *B. safensis* 6 также не совместим с лактобациллами. Все штаммы *Lactiplantibacillus* обладали антагонистической активностью в отношении этого бациллярного штамма. При этом для *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 зон угнетения не зафиксировано (рисунок 12).

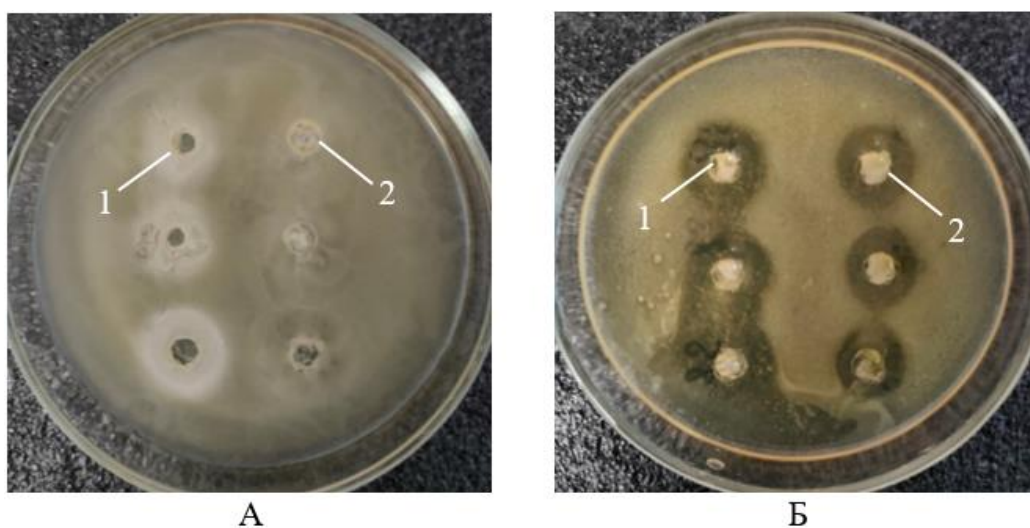


Рисунок 12 – Биосовместимость штаммов *Lactiplantibacillus* spp. и *Bacillus* spp.: А – Штамм *B. atrophaeus* 7 (газон) с штаммами *L. paraplantarum* 8Б (1) и *L. plantarum* ЛВ (2); Б – Штамм *B. safensis* 6 (газон) с штаммами *L. paraplantarum* 8Б (1) и *L. plantarum* ЛВ (2)

Подавление роста *B. safensis* 6 молочнокислыми бактериями помимо производства ими бактериоцинов может быть вызвано закислением среды. Штаммы лактобацилл при культивировании способны продуцировать значительное количество органических кислот, что вызывает снижение pH среды до 3,5–4. Для большинства бацилл минимальное значение pH, при котором возможен рост, находится в пределах 4,5–5 [134]. Возможно *B. safensis* 6 не обладает биохимическими механизмами, позволяющими существовать в условиях пониженного pH.

Исходя из полученных данных для разработки биологического препарата были выбраны 5 штаммов: *B. atrophaeus* 7, *B. subtilis* 1/8, *L. plantarum* ЛВ, *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б. Эти штаммы оказались совместимыми, что позволяет рассматривать их в качестве основы многоштаммового препарата.

3.2 Ценные биотехнологические свойства штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp.

3.2.1 Биохимическая характеристика

В результате изучения антагонистической активности и биосовместимости для дальнейших исследований были выбраны штаммы *B. atrophaeus* 7, *B. subtilis* 1/8, *L. plantarum* ЛВ, *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б. Для представленных штаммов был проведен многофункциональный биотехнологический скрининг.

При анализе биохимического профиля было установлено, что оба штамма *Bacillus* spp. способны метаболизировать арабинозу, целлобиозу, маннит, маннозу, сорбит, трегалозу, цитрат и ортонитрофенил-β-D-галактопиранозид. Помимо этого, штамм *B. subtilis* 1/8 также утилизировал инозит, рафинозу и салицин, а штамм *B. atrophaeus* 7 – инулин и аргинин. Также штаммы восстанавливали нитраты до нитритов. Полученные результаты не противоречат данным других исследований [134, 210–214]. Результаты исследования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Биохимический профиль штаммов *Bacillus* spp.

Субстрат	Штаммы	
	<i>B. atrophaeus</i> 7	<i>B. subtilis</i> 1/8
1	2	3
Арабиноза	+	+
Целлобиоза	+	+
Инозит	-	+
Маннит	+	+

Окончание таблицы 11

1	2	3
Манноза	+	+
Рафиноза	-	+
Рамноза	-	-
Салицин	-	+
Сорбит	+	+
Сахароза	-	-
Трегалоза	+	+
Ксилоза	-	-
Адонитол	-	-
Галактоза	-	-
Метил-D-маннозид	-	-
Метил-D-гликозид	-	-
Инулин	+	-
Мелезитоза	-	-
Индол	-	-
Цитрат	+	+
Ортонитрофенил-β-D-галактопиранозид	+	+
Аргинин	+	-
Восстановление нитрата до нитрита	+	+
Реакция Фогес-Проскауэра	+	-

Однако штамм *B. atrophaeus* 7 обладал свойствами не характерными для штаммов *B. atrophaeus* [214]: в процессе роста он мог использовать сахарозу в качестве единственного источника углерода. При этом данный штамм не метаболизировал маннит.

При изучении биохимического профиля было установлено, что все штаммы *Lactiplantibacillus* spp. метаболизируют арабинозу, галактозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, маннит, сорбит, целлобиозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу и рафинозу (таблица 12). При этом способность к утилизации рамнозы зафиксирована только для штамма *L. plantarum* ЛВ. Согласно литературным данным не все штаммы лактобацилл обладают ферментными системами для метаболизма рамнозы [215–218]. Продукция таких ферментов является ценным признаком штамма и позволяет его использовать для переработки растительного сырья с целью повышения биодоступности флавоноидов [219].

Таблица 12 – Биохимическая характеристика штаммов *Lactiplantibacillus* spp.

Субстрат	Штаммы		
	<i>L. plantarum</i> ЛВ	<i>L. plantarum</i> М	<i>L. paraplantarum</i> 8Б
1	2	3	4
Глицерин	-	-	-
L-арабиноза	+	+	+

Окончание таблицы 12

1	2	3	4
D-ксилоза	+	+	-
D-галактоза	+	+	+
D-глюкоза	+	+	+
D-фруктоза	+	+	+
D-манноза	+	+	+
L-рамноза	+	-	-
D-маннит	+	+	+
D-сорбит	+	+	+
Эскулин железа цитрат	+	+	+
салицин	+	+	+
D-целлобиоза	+	+	+
D-мальтоза	+	+	+
D-лактоза	+	+	+
D-сахароза	+	+	+
D- трегалоза	+	+	+
D- мелецитоза	+	+	+
D- раффиноза	+	+	+
Крахмал	-	-	-

Штамм *L. paraplantarum* 8Б продемонстрировал биохимический профиль аналогичный штаммам *L. plantarum*. Исключение составили неспособность ферментировать рамнозу и ксилозу. В целом, полученный профиль утилизации различных субстратов согласуется с данными представленными в определителе Берджи [134].

Все исследуемые штаммы проявляли антагонистическую активность в отношении широкого спектра патогенов, что косвенно указывает на продукцию ими метаболитов с антимикробными свойствами. К таким соединениям могут быть отнесены некоторые гидролитические ферменты, разрушающие клеточные стенки бактерий и грибов, а также матрикс биопленок. С продукцией таких ферментов как амилазы, протеазы, β -глюконазы и хитиназы связывают антибактериальную и антифунгальную активность бактерий [220–222]. В связи с чем для каждого штамма проверяли продукцию протеолитических, амилалитических, целлюлолитических и хитинолитических ферментов как потенциального механизма их антагонизма к патогенным микроорганизмам.

Для обоих штаммов *Bacillus* spp. была установлена продукция протеазы, амилазы и целлюлазы. При этом размер зон гидролиза, при качественном определении ферментативной активности, имел существенные различия между штаммами (рисунок 13).

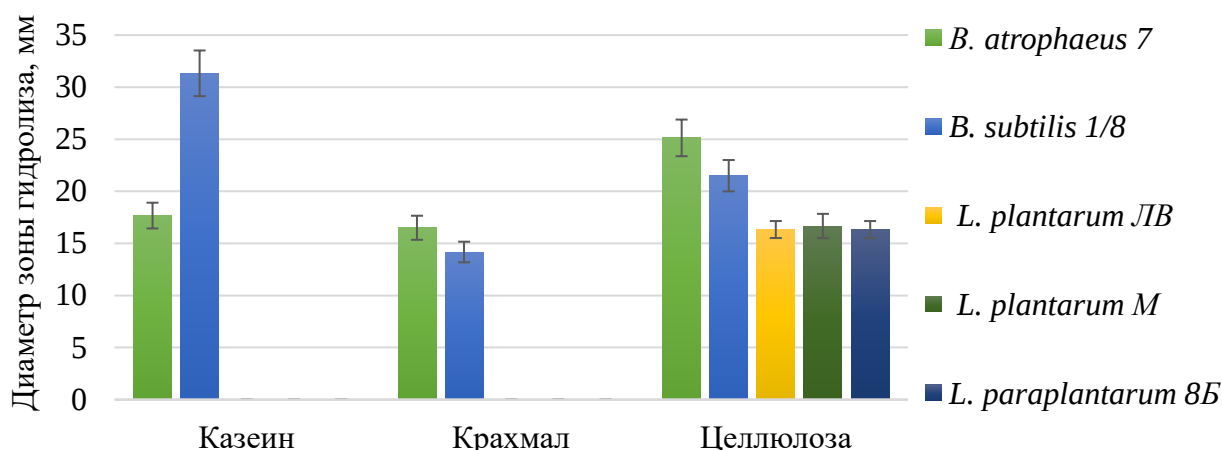


Рисунок 13 – Диаметр зон гидролиза на средах с казеином, крахмалом и целлюлозой при культивировании штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp.

Зоны гидролиза казеина у штамма *B. subtilis* 1/8 были на 43,6% больше чем у штамма *B. atrophaeus* 7. Напротив большая зона разложения целлюлозы отмечена для штамма *B. atrophaeus* 7 (на 16,88%). При это размер зон гидролиза крахмала не имел достоверных различий между штаммами. Вероятно, такая вариативность связана с разной активностью или количеством ферментов, продуцируемых исследуемых штаммами.

Для лактобацилл установлена продукция только целлюлозолитических ферментов. При этом зоны гидролиза субстрата не имели существенных различий между штаммами. По литературным данным, напротив, для штаммов *Lactiplantibacillus* отмечают амилолитическую, целлюлолитическую и протеолитическую активности [223–226]. Вероятно, такое расхождение между полученными и литературными данными определяется гетерогенностью штаммов.

Помимо этого, для штаммов бацилл установлена хитинолитическая активность. Оба штамма показали способность к росту на среде, содержащей коллоидный хитин в качестве единственного источника энергии.

В результате исследования было установлено, что штаммы *Bacillus* spp. синтезируют внеклеточные амилазы, целюлазы, протеазы и хитиназы, а штаммы *Lactiplantibacillus* spp. – целлюлазы. Таким образом скрининг природных штаммов может быть перспективным способом поиска новых продуцентов промышленно значимых ферментов [227].

Биоконтрольные свойства штаммов, зафиксированные в результате исследований в пунктах 3.1.1 и 3.1.2, могут быть опосредованы продукцией биосурфактантов.

Биосурфактанты – поверхностно-активные соединения, обнаруживаемые в культуральной жидкости некоторых видов бактерий и дрожжей. Эти вторичные метаболиты обладают широким спектром функций, включающим антимикробную активность [228]. По результатам исследования все штаммы продуцировали внеклеточные ПАВ на что указывает тест на растекание капли на гидрофобной поверхности (парафильме М). Помимо этого, супернатанты штаммов показали способность к образованию стойкой эмульсии с керосином (рисунок 14).

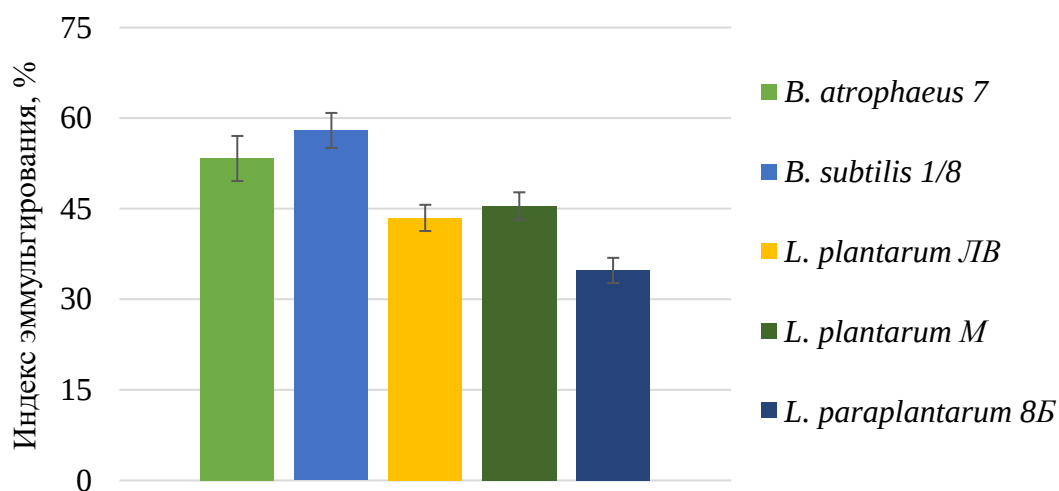


Рисунок 14 – Индекс эмульгирования керосина штаммами

Полученные в нашем исследовании данные согласуются с современными литературными данными. Так синтез биосурфактантов отмечают как у штаммов *Bacillus* spp., так и у штаммов *Lactiplantibacillus* spp. [229, 230]. Способность к продукции внеклеточных ПАВ исследуемыми штаммами вероятно усилит антимикробные свойства прототипа биологического препарата.

Важным свойством молочнокислых бактерий является производство молочной кислоты. Преимущественно с синтезом этого метаболита связывают антимикробную активность лактобактерий [231]. Согласно полученным данным все штаммы *Lactiplantibacillus* spp. образуют молочную кислоту в результате сбраживания глюкозы в MRS бульоне. При этом штамм *L. plantarum* LB продуцировал наибольшее количество кислоты. Результаты исследования представлены на рисунке 15.

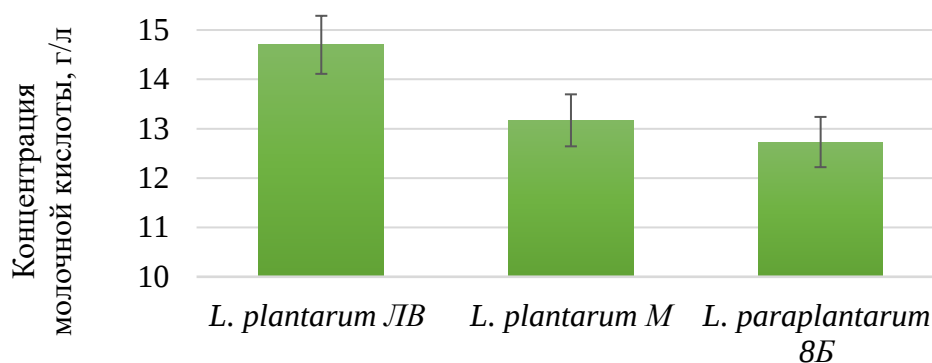


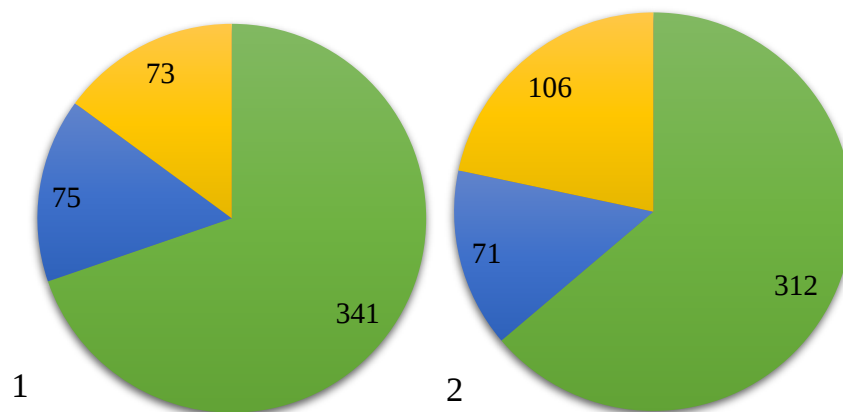
Рисунок 15 – Концентрация молочной кислоты в культуральной жидкости штаммов *Lactiplantibacillus* spp.

По литературным данным продукция молочной кислоты у штаммов *Lactiplantibacillus* spp. существенно варьирует. Так при культивировании на MRS бульоне в течение 24 ч исследователи отмечали концентрацию кислоты от 2 до 30 г/л [231, 232]. На модифицированных средах аналогично наблюдается большая межштаммовая изменчивость (от 16 до 42 г/л) [232–235]. Исследуемые штаммы также различались по уровню продукции молочной кислоты, при этом штаммы *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б не имели достоверных различий по количеству кислоты после 24 ч ферментации. Напротив, штамм *L. plantarum* ЛВ продемонстрировал самую высокую продукцию молочной кислоты ($14,70 \pm 0,93$ г/л). Эти результаты указывают на возможность использования штамма *L. plantarum* ЛВ в качестве наиболее перспективного продуцента молочной кислоты.

3.2.2 Метаболомные профили

Скрининг метаболитов штаммов *Bacillus* spp. проводили по 489 соединениям. В результате было установлено, что супернатант штамма *B. atrophaeus* 7 имеет достоверные отличия от контрольного L бульона по 148 соединениям, а штамм *B. subtilis* 1/8 – по 176. Продуцируемые метаболиты составляли 50,68% и 39,77% для штаммов *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 соответственно (рисунок 16).

А



■ Нет достоверных отличий от контрольного L бульона ■ Продуцируемые ■ Потребляемые

Б

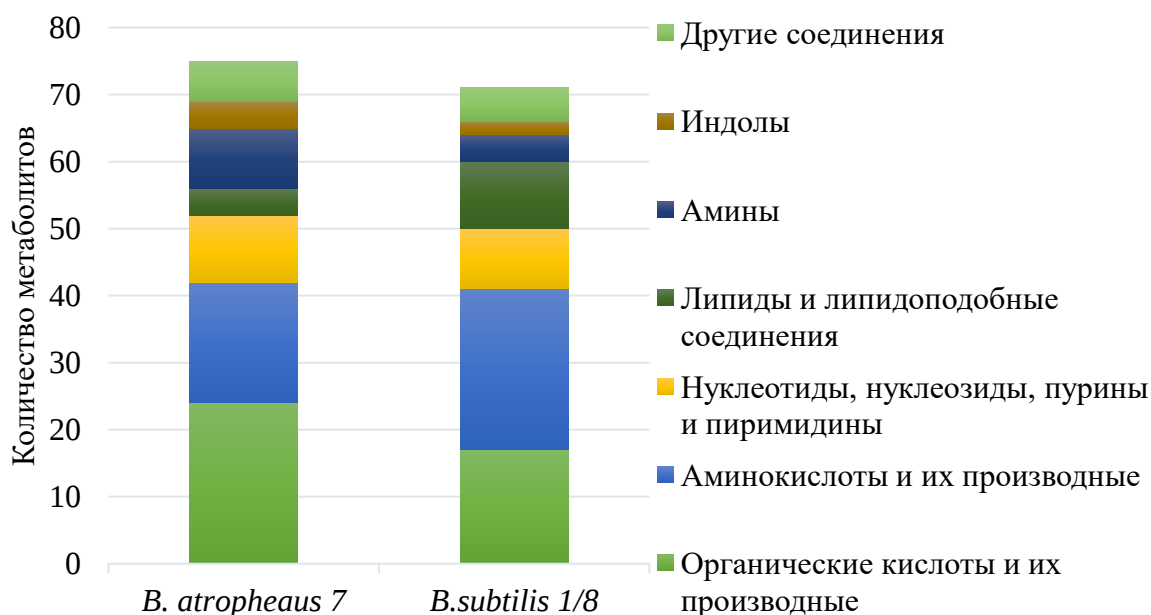


Рисунок 16 – Качественная и количественная характеристика метаболитов *Bacillus* spp.: А – количество потребляемых и продуцируемых соединений штаммами: 1 – *B. atropheaus* 7; 2 – *B. subtilis* 1/8; Б – основные классы соединений, продуцируемые бациллами

Метаболиты штаммов бацилл существенно различались по классам химических соединений. Самыми многочисленными классами метаболитов у обоих штаммов стали органические кислоты и аминокислоты. Однако у штамма *B. atropheaus* 7 преобладали органические кислоты и их производные, которые составили 32,00% от всех синтезируемых веществ. На долю аминокислот и их производных в культуральной жидкости штамма *B. atropheaus* 7 приходилось 24,00%. Напротив, для штамма *B. subtilis* 1/8 кислоты и их производные составляли 23,94%, а аминокислоты и их производные – 33,80% от всех метаболитов. Меньшую часть экзометаболитов штаммов составляли структурные компоненты нуклеиновых кислот. Так в культуральной жидкости штамма *B.*

atrophaeus 7 они составляли 13,33%, а у штамма *B. subtilis* 1/8 – 12,68%. Липиды и липидоподобные молекулы были наиболее многочисленными метаболитами штамма *B. subtilis* 1/8 (14,08%). Напротив, для штамма *B. atrophaeus* 7 на долю липидов приходилось только 5,33%. Производные аммиака составляли 12,00% от всех метаболитов штамма *B. atrophaeus* 7 и 5,63% от метаболитов штамма *B. subtilis* 1/8. На индол и его производные приходилось 5,33% соединений штамма *B. atrophaeus* 7 и 2,81% - для штамма *B. subtilis* 1/8.

Ряд метаболитов были обнаружены в культуральной жидкости обоих штаммов. К таким соединениям относятся 4-гидроксibenзойная кислота, гидроксипролин, S-аденозил-L-метионин, фенилпируват, 1-метиладенин, гуанин, ацетиллизин, агматин, этаноламин, бета-аланин, пантотеновая кислота, N-альфа-ацетиларгинин, N-ацетилсерин, N-ацетилглутамин, дофамин, гуанидиноуксусная кислота, индол-3-карбоновая кислота, 4-гидроксифенилмолочная кислота, 2-кетогексановая кислота, цитрамаловая кислота, L-кинуренин, цитидин трифосфат, S-рибозил-L-гомоцистеин, гиппуровая кислота, N-ацетилсерин, 7-метилгуанин, индол, гомоцистеиновая кислота, 2,3-дигидроксibenзойная кислота, гомованилиновая кислота, гомоаргинин, 2-гидроксиглутарат, 1-метилникотинамид, аминокадипиновая кислота. Остальные экзометаболиты были уникальными для каждого штамма (приложение Д).

В культуральной жидкости штаммов *Bacillus* spp. отмечены метаболиты с терапевтическими свойствами. Штаммы продуцировали витамины группы В (пиридоксаль, пантотеновая кислота, никотинамид), а также соединения с установленными противовоспалительными (1-метилникотинамид, метилцистеин, дезоксиинозин, простагландин J2) [236–240], противоопухолевыми (акадезин) [241], гепатопротекторными (S-аденозил-L-метионин, метилцистеин) [237, 238, 242] действиями. Помимо этого, некоторые экзометаболиты обладали пробиотическими свойствами (таблица 13).

Таблица 13 – Метаболиты штаммов *Bacillus* spp. с антимикробными, пробиотическими и терапевтическими свойствами

№	Соединение	Штамм-продуцент	Свойства	Ссылка
1	2	3	4	5
1.	Гуанидоуксусная кислота	<i>B. atrophaeus</i> 7 <i>B. subtilis</i> 1/8	Оказывает моделирующие действие на микрофлору кишечника и энергетический обмен	[243]

Окончание таблицы 13

1	2	3	4	5
2.	2-Гидрокси-3-метилмасляная кислота	<i>B. atrophaeus</i> 7	Улучшает пролиферацию клеток эпителия кишечника	[244]
3.	N-ацетилсерин	<i>B. atrophaeus</i> 7 <i>B. subtilis</i> 1/8	Антиоксидант, антибоплечные свойства	[245, 246]
4.	Дофамин	<i>B. atrophaeus</i> 7 <i>B. subtilis</i> 1/8	Нейропротекторные и иммуномодулирующие свойства	[247]
5.	4-Гидроксифенилуксусная кислота	<i>B. atrophaeus</i> 7	Антиоксидант, антибактериальные свойства	[248]
6.	Антранилат	<i>B. atrophaeus</i> 7	Антибиопленочные свойства	[249]
7.	Салициловая кислота	<i>B. atrophaeus</i> 7	Антибактериальные свойства	[250]
8.	4-Гидроксифенилмолочная кислота	<i>B. atrophaeus</i> 7 <i>B. subtilis</i> 1/8	Антибактериальные и антифунгальные свойства	[251]
9.	Фенилмолочная кислота	<i>B. atrophaeus</i> 7	Антибактериальные и антифунгальные свойства	[251, 252]
10.	N-ацетил спермидин	<i>B. atrophaeus</i> 7	Усиливает барьерную функцию кишечника, подавляет воспаление	[253]
11.	Ацетилхолин	<i>B. atrophaeus</i> 7	Нейропротекторные свойства	[254]
12.	2-Изопропилмалоновая кислота	<i>B. atrophaeus</i> 7	Антиоксидант, антибактериальные свойства	[255]
13.	Гомованилиновая кислота	<i>B. atrophaeus</i> 7 <i>B. subtilis</i> 1/8	Нейропротекторные свойства	[256]
14.	Азелаиновая кислота	<i>B. subtilis</i> 1/8	Антиоксидант, антибактериальные свойства	[257]
15.	Метилцистеин	<i>B. subtilis</i> 1/8	Антиоксидант	[236, 237]

Штаммы также синтезировали промышленно ценные соединения. В частности, в фармацевтической промышленности используются 4-гидроксифенилуксусная кислота для производства противовоспалительных препаратов [249], аминокислоты – для производства антибиотиков [258], а L-тирозин, L-триптофан и L-фенилаланин – для производства инфузионных растворов [259, 260]. Глюконовая и 4-гидроксibenзойная кислоты необходимы в химической промышленности для выпуска бытовой химии и парабенов [261, 262].

Анализ экзометаболитов из супернатантов *Lactiplantibacillus* spp. проводили по 489 соединениям. Достоверные различия с контрольным образцом (MRS среда) были установлены по 167 соединениям для штамма *L. plantarum* ЛВ, 165 соединениям для

штамма *L. plantarum* М и по 113 для *L. paraplantarum* 8Б. При этом только 23,95%, 36,36% и 48,67% приходилось на синтезируемые метаболиты штаммов *L. plantarum* ЛВ, *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б соответственно (рисунок 17).

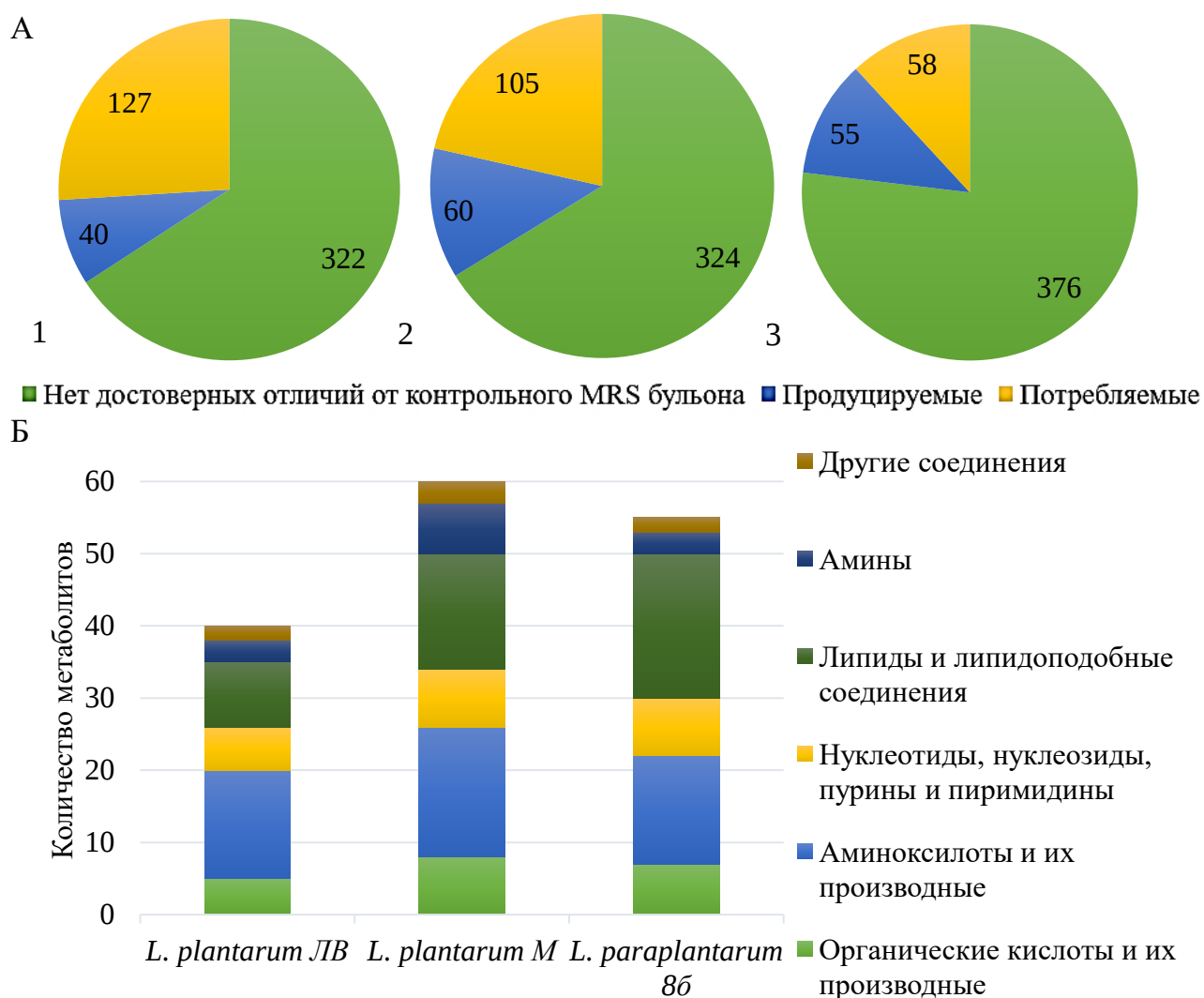


Рисунок 17 – Качественная и количественная характеристика метаболитов штаммов *Lactiplantibacillus* spp.: А – количество потребляемых и продуцируемых соединений штаммами в процессе роста: 1 – *L. plantarum* ЛВ; 2 – *L. plantarum* М; 3 – *L. paraplantarum* 8Б; Б – основные классы соединений, продуцируемые штаммами

Согласно полученным данным штаммы *L. plantarum* ЛВ и *L. plantarum* М имели значительное сходство в химическом составе продуцируемых метаболитов [263, 264]. Большая часть соединений (80%), продуцируемых *L. plantarum* ЛВ, была обнаружена также в культуральной жидкости штамма *L. plantarum* М. Напротив, штамм *L. paraplantarum* 8Б синтезировал больше уникальных экзометаболитов. При этом часть метаболитов были характерны для всех штаммов *Lactiplantibacillus* spp. Среди общих

экзометаболитов штаммов *Lactiplantibacillus* spp. были такие вещества как молочная кислота, фенилмолочная кислота, ацетилхолин, 3-аминоизомасляная кислота, 4-гидроксифенилмолочная кислота, S-рибозил-L-гомоцистеин, S-аденозил-L-метионин, 2-гидроксиглутарат, фосфатидилхолины (34:1), О-ацетилсерин, N-ацетил сперимидин, ацетилфосфат, глицерол-3-фосфат, аденозин монофосфат, глицин, уридин-5-монофосфат, N-альфа-ацетиларгинин, мочева кислота, этаноламин, гуанозин монофосфат, N-ацетил-глутамин, ацетиллизин (приложение Е)

Среди экзометаболитов штаммов *Lactiplantibacillus* spp. отмечены аминокислоты, органические кислоты, нуклеотиды, липиды, амины, ацилфосфаты и кобаламины. При этом аминокислоты и их производные составляли наибольшую группу соединений у штаммов *L. plantarum*. На них приходилось 37,50% метаболитов *L. plantarum* ЛВ и 30,00% метаболитов *L. plantarum* М. Второй по распространенности группой соединений в культуральных жидкостях штаммов *L. plantarum* были липиды. Они составляли по 22,50% и 26,67% соединений штаммов *L. plantarum* ЛВ и *L. plantarum* М соответственно. Доля остальных групп соединений в супернатантах была меньше. На органические кислоты приходилось 12,50% и 13,33% метаболитов *L. plantarum* ЛВ и *L. plantarum* М соответственно. Структурные компоненты нуклеиновых кислот составляли 15,00% метаболитов штамма *L. plantarum* ЛВ и 13,33% - штамма *L. plantarum* М. На долю аминов приходилось 7,5% и 11,67% продуцируемых соединений штаммов *L. plantarum* ЛВ и *L. plantarum* М. Ацилфосфаты были представлены в равном количестве в супернатантах обоих штаммов и составляли по 5% от всех метаболитов.

Метаболомный профиль штамма *L. paraplantarum* 8Б имел существенные отличия от профилей штаммов *L. plantarum*. Наиболее распространенной группой соединений были липиды. Они составляли 36,36% всех экзометаболитов штамма. Аминокислоты и их производные также были представлены значительным числом соединений. На их долю приходилось 27,27% метаболитов, обнаруженных в супернатанте. В культуральной жидкости штамма *L. paraplantarum* 8Б нуклеотиды и нуклеозиды составляли 14,55%, а органические кислоты 12,73% всех синтезируемых соединений. Амины и прочие соединения (ацилфосфаты, кобаламины) были в наименьшем количестве представлены в метаболоме штамма. Их доли от общего количества синтезируемых метаболитов составляли 5,45% и 3,64% соответственно.

За время культивирования штаммы *Lactiplantibacillus* spp. продуцировали множество соединений, обеспечивающих их пробиотический потенциал. Так среди метаболитов обнаружены антимикробные соединения, соединения с нейропротекторными, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами (таблица 14).

Таблица 14 – Метаболиты штаммов *Lactiplantibacillus* spp. с антимикробными и пробиотическими свойствами

№	Соединение	Штамм-продуцент	Свойства	Ссылка
1.	Молочная кислота	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М, <i>L. paraplantarum</i> 8Б	Антибактериальные и антифунгальные свойства	[265]
2.	Фенилмолочная кислота	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М, <i>L. paraplantarum</i> 8Б	Антибактериальные и антифунгальные свойства	[251, 252]
3.	Ацетилхолин	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М, <i>L. paraplantarum</i> 8Б	Нейропротекторные свойства	[254]
4.	4- Гидроксифенилмолочная кислота	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М, <i>L. paraplantarum</i> 8Б	Антибактериальные и антифунгальные свойства	[251]
5.	2-Гидрокси-3- метилмасляная кислота	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М	Улучшает пролиферацию клеток эпителия кишечника	[244]
6.	N-ацетил спермидин	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М, <i>L. paraplantarum</i> 8Б	Усиливает барьерную функцию кишечника, подавляет воспаление	[253]
7.	Аргинин	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М	Иммуномодулирующие свойства	[266]
8.	N-ацетилсерин	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М, <i>L. paraplantarum</i> 8Б	Антиоксидант, антибиопленочные свойства	[245, 246]
9.	2-Изопропилмалоновая кислота	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М	Антиоксидант, антибактериальные свойства	[255]
10.	Глицин	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М, <i>L. paraplantarum</i> 8Б	Антибактериальные свойства, усиливает бактерицидный эффект антибиотиков	[267]
11.	Гуанидоуксусная кислота	<i>L. plantarum</i> ЛВ, <i>L. plantarum</i> М	Оказывает моделирующие действие на микрофлору кишечника и энергетический обмен	[243]
12.	Арахидоновая кислота	<i>L. plantarum</i> М	Антибактериальные свойства	[268]
13.	Докозагексаеновая кислота	<i>L. plantarum</i> М	Антибактериальные и антибиопленочные свойства	[269]

Помимо метаболитов с функциональными свойствами, в культуральных жидкостях штаммов *Lactiplantibacillus* spp., обнаружены соединения, имеющие важное значение в

пищевой и фармацевтической промышленности. Так гипоксантин, тирамин, 3-аминоизомаслянная и пиперидиновая кислоты используются в производстве лекарственных препаратов [270–274], а яблочная и янтарная кислоты являются пищевыми добавками [275, 276]. В связи с этим штаммы *Lactiplantibacillus* spp. могут рассматриваться как продуценты или источники генов синтеза данных соединений.

Таким образом, штаммы *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. имеют высокий биотехнологический потенциал и обладают свойствами, ценными и для производства биологических препаратов сельскохозяйственного назначения, а также для пищевой, химической и фармацевтической промышленности.

3.2.3 Биобезопасность

Оценка безопасности штаммов согласно протоколу Qualified presumption of safety (QPS), помимо точной идентификации и анализа научных данных об экологии, промышленном применении и клинических аспектах, включает определение вирулентности, токсичности и антибиотикорезистентности [277]. Виды бацилл, за исключением видов клады *Cereus*, в целом считаются безопасными и включены в списки QPS [278] и Generally Recognized as Safe (GRAS) [279], как микроорганизмы, разрешённые для использования в качестве пищевых и кормовых добавок. Однако в ряде источников подчеркивается, что патогенные свойства неравномерно распределены по роду и могут встречаться даже у признанных безопасными видов [280].

В соответствие с этими критериями штаммы *Bacillus* spp. были исследованы на продукцию факторов патогенности, антибиотикорезистентность и острую токсичность. Согласно полученным данным оба штамма не обладают лецитиназной и фосфатазной активностями. Для штамма *B. atrophaeus* 7 также не была зафиксирована и гемолитическая активность (таблица 15) [281].

Таблица 15 – Продукция факторов патогенности штаммами *Bacillus* spp.

Фактор патогенности	<i>B. atrophaeus</i> 7	<i>B. subtilis</i> 1/8
Лецитиназа	-*	-
Щелочная фосфатаза	-	-
Рибонуклеаза	+	+-
Гемолитическая активность	-	+

*: «-» – продукция не обнаружена, «+» – установлена продукция фактора патогенности, «+-» – слабая положительная реакция

Гемолитическая активность была отмечена у штамма *B. subtilis* 1/8. Вероятно, это является следствием продукции штаммом биосурфактантов, что было установлено в нашем исследовании [282]. Более того способность к гемолизу у штаммов *Bacillus* spp. используют как критерий оценки продукции липопептидов [283].

Оба штамма проявляли способность к гидролизу дрожжевой РНК. Внеклеточные нуклеазы бактерий обнаруживаются как у патогенных, так и непатогенных бактерий. У патогенных бактерий, например, рода *Staphylococcus*, нуклеазы участвуют в подавлении защитных механизмов макроорганизма [284]. Напротив, рибонуклеазы бацилл обладают противовирусным и противоопухолевыми свойствами, вследствие чего перспективны для использования в биотехнологии [285, 286].

При исследовании токсичности супернатантов штаммов на мышинной модели не было зафиксировано летальности в опытных группах. При этом инфицирование группы контрольным штаммом *B. cereus* Gnz1 B-8163, продуцирующим токсины, вызывало 100% гибель животных (таблица 16).

Таблица 16 – Исследование токсичности супернатантов *Bacillus* spp. при однократной внутрибрюшинной инъекций

Группа	Продуцируемые токсины				Летальность животных
	CytK	NHE	HBL	EntFM	
<i>B. subtilis</i> 1/8 (опыт)	-*	-	-	-	0/3
<i>B. atrophaeus</i> 7 (опыт)	-	-	-	-	0/3
<i>B. cereus</i> Gnz1 B-8163 (положительный контроль)	+	+	+	+	3/3
Стерильная среда ВНИ (отрицательный контроль)	-	-	-	-	0/3

*: «-» - токсин не обнаружен, «+» - установлена продукция токсина

Анализ антибиотикорезистентности бацилл не выявил множественной устойчивости к противомикробным препаратам. Резистентность у штаммов *Bacillus* spp. была зафиксирована только в отношении бензилпенициллина (таблица 17).

Таблица 17 – Устойчивость штаммов *Bacillus* spp. к основным группам антибиотиков (M±m)

Группа антибиотиков	Антибиотик	Исследуемые штаммы	
		<i>B. atrophaeus</i> 7	<i>B. subtilis</i> 1/8
		Диаметр зоны ингибирования роста, мм	
1	2	3	4
Тетрациклины	Тетрациклин	16,67±0,58**	15,66±0,58**
	Доксицилин	22,67±0,58*	22,33±0,58*

Окончание таблицы 17

1	2	3	4
Пенициллины	Бензилпенициллин	13,50±3,54***	_***
	Ампициллин	17,33±2,08*	20,33±0,58*
Аминогликозиды	Канамицин	23,00±1,00*	18,00±2,00*
	Стрептомицин	16,00±2,00*	11,33±0,58*
	Неомицин	14,67±1,53**	14,33±1,52**
Амфениколы	Левомецетин	27,67±0,58*	23,33±2,08*
Макролиды	Тилозин	20,67±0,58**	22,00±1,73*
Хинолоны	Энрофлоксацин	26,00±1,00*	32,00±2,65*

* – чувствительный штамм, ** – штамм с промежуточной устойчивостью, *** – резистентный штамм

Промежуточная устойчивость отмечена у обоих штаммов к тетрациклину и неомицину, а у штамма *B. atrophaeus* 7 еще к тилозину. В отношении остальных исследуемых антибиотиков штаммы были чувствительными.

Резистентность бактерий рода *Bacillus* к антимикробным препаратам по литературным данным варьирует. Результаты, полученные в нашем исследовании, не противоречат данным других ученых. Например, в ряде работ авторы также отмечают устойчивость штаммов бацилл к пенициллинам и макролидам [287–291]. Резистентность к пенициллину бацилл связана с продукцией β-лактамаз. Гены, связанные с синтезом этих ферментов, были обнаружены в том числе и у видов *B. subtilis* и *B. atrophaeus*. Однако, было установлено, что некоторые гены кодируют низкоэффективные лактамазы, неактивные в отношении ампициллина и не вызывающие резистентности при экспрессии в *E. coli* [292]. Вероятно, в данном случае β-лактамазы исследуемых штаммов также каталитически неэффективны.

Устойчивость к пенициллину и промежуточная устойчивость к тилозину у штаммов может быть следствием природного происхождения этих антибиотиков. Продуценты бензилпенициллина и тилозина распространены в природе, вследствие чего многие бактерии могли развить механизмы устойчивости к выделяемым ими антимикробным соединениям [293, 294].

По литературным данным для штаммов бацилл характерна чувствительность или промежуточная устойчивость к тетрациклину [288, 289]. По мнению Agersø et al. (2018), гены, обуславливающие резистентность к этому антибиотику, являются внутренними в хромосоме бацилл группы *Bacillus subtilis* [295].

Лактобациллы исторически считаются безопасными. Они аналогично, штаммам бацилл группы *Bacillus subtilis*, внесены в списки QPS и GRAS как бактерии, не представляющие угрозу для человека, животных и окружающей среды. В настоящее время основной опасностью исходящей от этой группы микроорганизмов считается их участие в распространении генов антибиотикорезистентности [296]. В связи с чем для штаммов *Lactiplantibacillus* spp. также определяли профиль устойчивости к основным группам антимикробных препаратов.

Согласно полученным данным штаммы *Lactiplantibacillus* spp. были чувствительны к действию ампициллина и левомицетина. Штаммы *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б также показали восприимчивость к доксицилину (таблица 18).

Таблица 18 – Устойчивость штаммов *Lactiplantibacillus* spp. к основным группам антибиотиков (М±m)

Группа антибиотиков	Антибиотик	Исследуемые штаммы		
		<i>L. plantarum</i> М	<i>L. plantarum</i> ЛВ	<i>L. paraplantarum</i> 8Б
		Диаметр зоны ингибирования роста, мм		
Тетрациклины	Тетрациклин	17,40±0,55**	16,67±0,82**	17,50±1,04**
	Доксицилин	19,80±0,45*	17,17±0,75**	19,50±0,55*
Пенициллины	Бензилпенициллин	15,00±0,00***	14,50±0,84***	9,50±0,55***
	Ампициллин	21,33±1,37*	20,17±1,33*	22,17±0,98*
Аминогликозиды	Канамицин	_***	_***	_***
	Стрептомицин	_***	_***	_***
	Неомицин	_***	_***	_***
Амфениколы	Левомицетин	20,17±0,98*	20,33±0,52*	22,80±0,45*
Макролиды	Тилозин	16,33±0,52**	17,33±0,52**	16,33±0,52**
Хинолоны	Энрофлоксацин	_***	_***	_***

* – чувствительный штамм, ** – штамм с промежуточной устойчивостью, *** – резистентный штамм

У всех штаммов была отмечена промежуточная устойчивость к тилозину и тетрациклину, а у штамма *L. plantarum* ЛВ и к доксицилину. Помимо этого, все штаммы оказались резистентными в отношении бензилпенициллина, канамицина, стрептомицина, неомицина и энрофлоксацина.

Устойчивость лактобацилл к некоторым антимикробным препаратам считается естественной и не связанной с мобильными генетическими элементами. В частности, природной считают резистентность к аминогликозидам и хинолонам, широко распространенной среди изолятов лактобактерий из различных источников [297–299].

Резистентность к бензилпенициллину может быть следствием природного происхождения этого антибиотика.

Таким образом, штаммы *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. являются безопасными и не несут угрозы для животных и человека.

3.3 Разработка технологии получения биологического препарата

3.3.1 Подбор условий культивирования

Подбор условий культивирования является важным этапом при разработке биологического препарата. В зависимости от выбранных параметров эффективность производства может сильно варьировать. При этом параметры культивирования являются штаммоспецифичными. В связи с чем для исследуемых штаммов были определены оптимальные температура и продолжительность культивирования на средах, перспективных для промышленного получения препарата.

В качестве ферментационной среды для культивирования штаммов *Bacillus* spp. в биореакторе была выбрана среда на основе побочных продуктов сельскохозяйственного производства (мелассы и кукурузного экстракта) (ФБ). Эта среда по результатам исследований была оптимальной для культивирования бацилл при разработке других биопрепаратов [118]. Для лактобактерий также была выбрана среда на основе мелассы и кукурузного экстракта (ФЛ).

Температурный оптимум для штаммов *Bacillus* spp. лежит в диапазоне 30–40 °С [300]. Высокий выход биомассы по литературным данным для разных штаммов отмечают как при 30 °С [301–303], так и при 37 °С [304, 305], реже при 40 °С [306]. В данном эксперименте для штамма *B. atrophaeus* 7 в качестве оптимальных температур подтвердились 30 °С и 37 °С, при которых численность клеток составляла $9,05 \pm 0,12$ и $8,87 \pm 0,13$ lg КОЕ/мл соответственно и достоверно не различались ($p > 0,05$). При использовании температуры культивирования 40 °С для штамма *B. atrophaeus* 7 были отмечены более низкие значения численности. Напротив, при суточном культивировании штамма *B. subtilis* 1/8 достоверно большая численность клеток была получена при температуре 30 °С. Однако через 48 и 72 ч разница сглаживается и при обоих значениях температуры численность микроорганизма не имела существенных различий. Возможной

причиной этого является более высокая скорость роста и размножения культуры при 30 °С. Увеличение температуры культивирования негативно сказалось на численности штамма *B. subtilis* 1/8 – количество жизнеспособных клеток после 24 ч роста снизилось на 14,98 и 9,75% по сравнению с вариантами культивирования при 30 °С и 37 °С (рисунок 18).

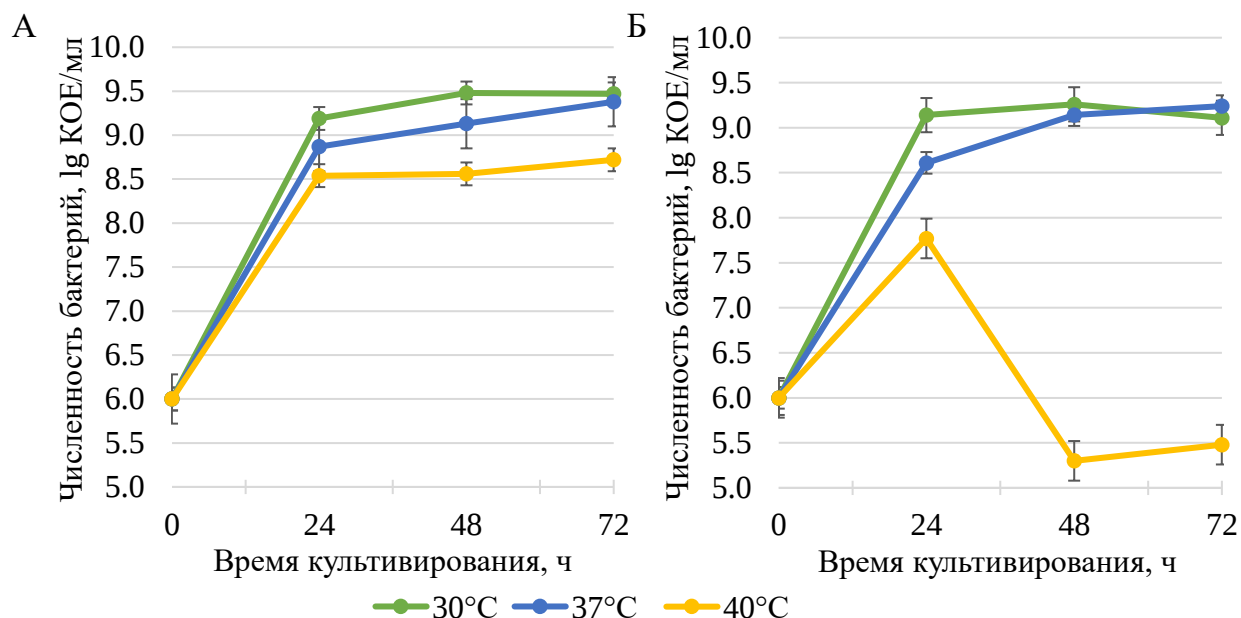


Рисунок 18 – Динамика роста штаммов *Bacillus* spp при культивировании на среде ФБ:

А – штамм *B. atrophaeus* 7; Б – штамм *B. subtilis* 1/8

Лактобациллы более требовательны к условиям культивирования и составу питательных сред. В литературных данных в качестве оптимальных условий для роста *L. plantarum* чаще всего определяют статическое культивирование в течение 24–72 ч при температуре 30 °С или 37 °С [307–309]. При этом только немногие авторы предлагают альтернативные, более дешевые, среды для получения микробной биомассы. Однако зачастую штаммы при культивировании на таких средах показывают меньшую численность, чем при использовании классической среды MRS [310, 311]. Таким образом для исследуемых штаммов оценивали рост на промышленной среде при разных условиях культивирования.

По результатам исследования было установлено, что температура не оказывала значимого влияния на численность штаммов при культивировании в течение 24 ч. А для штамма *L. plantarum* М и после 48 ч роста не наблюдалось достоверных различий в количестве жизнеспособных клеток при использовании разных температур (рисунок 19).

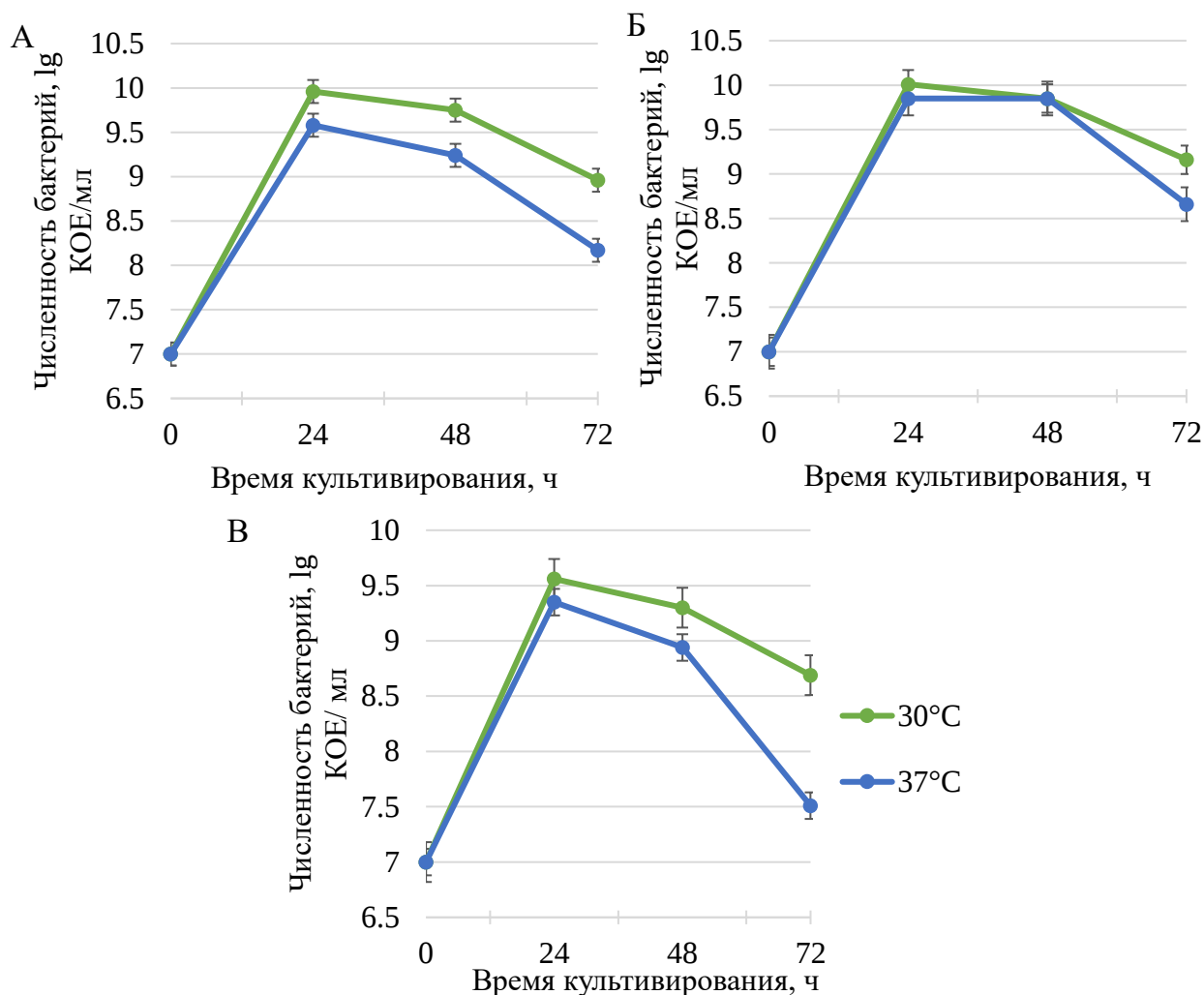


Рисунок 19 – Динамика численности штаммов *Lactiplantibacillus* spp. при культивировании на среде ФЛ:

А – штамм *L. plantarum* ЛВ; Б – штамм *L. plantarum* М; В – штамм *L. paraplantarum* 8Б

Увеличение продолжительности культивирования негативно сказывалось на численности штаммов не зависимо от выбранной температуры. Количество жизнеспособных клеток после 72 ч роста сократилось на 8,49–19,68% по сравнению с численностью суточных культур. Вероятно, это является следствием снижения активной кислотности среды. Несмотря на толерантность лактобактерий к низким значениям pH, закисление среды негативно влияет на жизнеспособность клеток [313].

Итак, было установлено, что оптимальной температурой культивирования для всех исследуемых штаммов является 30 °С при продолжительности инкубации 24 ч. Данные параметры в дальнейшем использовали при выращивании культур в ферментерах.

3.3.2 Совместное культивирование

Производство биологических препаратов на основе консорциума микроорганизмов может быть нерентабельным в связи с их высокой себестоимостью, обусловленной повторением циклов культивирования кратно числу штаммов. Снизить затраты возможно путем использования в технологической цепочке совместного культивирования микроорганизмов. При этом несколько штаммов выращиваются за один цикл культивирования в одном ферментере [314]. Такой способ получения микроорганизмов, в отличие от классического способа отдельного выращивания культур, помимо сокращения себестоимости продукта позволяет уменьшить влияние на окружающую среду за счет меньшего сброса сточных вод.

Оценку возможности совместного культивирования исследуемых штаммов проводили в колбах. В качестве посевного материала использовали суточные культуры штаммов.

Эксперимент проводили в 8 вариантах: каждый штамм в монокультуре (варианты 1–5), совместный рост штаммов *Bacillus* spp. (вариант 6), совместный рост штаммов *Lactiplantibacillus* spp. (вариант 7), совместный рост штаммов *Lactiplantibacillus* spp. и *Bacillus* spp. (вариант 8). Отбор проб осуществляли по завершении культивирования через 24 ч. Согласно полученным данным штаммы бацилл не оказывали отрицательного влияния друг на друга. В колбах по завершению культивирования зафиксирован рост обоих штаммов. Максимальный титр споровых микроорганизмов был достигнут при совместном культивировании штаммов (таблица 19).

Таблица 19 – Итоговые показатели культивирования штаммов *Lactiplantibacillus* spp. и *Bacillus* spp. при совместном и отдельном культивировании ($M \pm m$)

Вариант эксперимента	Культивируемые штаммы	Итоговое значение pH	Численность <i>Lactiplantibacillus</i> spp., lg КОЕ/мл	Численность <i>Bacillus</i> spp., lg КОЕ/мл
1	2	3	4	5
1.	<i>B. atrophaeus</i> 7	6,86±0,38	-	8,79±0,10
2.	<i>B. subtilis</i> 1/8	7,24±0,26	-	9,17±0,48
3.	<i>L. paraplantarum</i> 8Б	4,26±0,04	9,73±0,37	-
4.	<i>L. plantarum</i> М	4,41±0,05	9,65±0,38	-
5.	<i>L. plantarum</i> ЛВ	4,44±0,04	9,61±0,36	-
6.	<i>B. atrophaeus</i> 7 <i>B. subtilis</i> 1/8	7,00±0,23	-	9,58±0,52

Окончание таблицы 19

1	2	3	4	5
7.	<i>L. paraplantarum</i> 8Б <i>L. plantarum</i> М <i>L. plantarum</i> ЛВ	4,43±0,04	9,26±0,19	-
8.	<i>B. atrophaeus</i> 7 <i>B. subtilis</i> 1/8 <i>L. paraplantarum</i> 8Б <i>L. plantarum</i> М <i>L. plantarum</i> ЛВ	6,80±0,13	9,61±0,51	7,87±0,23

Между штаммами *Lactiplantibacillus* spp. также не было установлено антагонистического действия. Значения pH, оптической плотности и численности микроорганизмов не имеют существенных различий между вариантами раздельного и совместного культивирования.

Совместное культивирование всех штаммов (вариант 8) отрицательно сказалось на росте бацилл. Отмечено снижение титра как минимум на порядок по сравнению с вариантами эксперимента 1, 2 и 6. Это может быть связано с использованием питательной среды оптимальной для роста штаммов *Lactiplantibacillus* spp., а не штаммов *Bacillus* spp. Еще одной причиной может быть подавление штаммов *Bacillus* spp. штаммами *Lactiplantibacillus* spp. Данные других исследователей по влиянию молочнокислых бактерий на рост бацилл противоречивы. Так, Yang et al. (2015) также отмечают снижение роста *B. subtilis* в ко-культуре с *Lactobacillus reuteri* [315]. Напротив, в исследованиях Kimelman et al. (2019) не было зафиксировано негативного влияния молочнокислых бактерий на рост *B. subtilis* [316]. Такие различия могут быть обусловлены физиолого-биохимическими особенностями конкретных штаммов.

Таким образом, для глубинного культивирования в ферментере как наиболее оптимальные были выбраны два варианта ко-культур: из двух штаммов *Bacillus* spp. и трёх штаммов *Lactiplantibacillus* spp.

3.3.3 Культивирование в лабораторном ферментере

Исследование параметров глубинного культивирования совместных культур проводили в лабораторных ферментерах объемом 3 л. Культивирование штаммов осуществляли согласно условиям, выбранным в пункте 3.3.1.

Культивирование штаммов *Bacillus* spp. проводили на среде ФБ при 30 °С с постоянным перемешиванием при 250 об/мин., контроль уровня растворенного кислорода в среде статировали на отметке 50% путем подачи сжатого воздуха в течение 24 ч (0,5-2,0 л/мин./1 л среды). Ферментацию *Lactiplantibacillus* spp. вели на среде ФЛ при 30°С и перемешивании 250 об/мин в анаэробных условиях в течение 24 ч.

Для получения посевного материала все штаммы выращивались отдельно. Штаммы бацилл культивировали в шейкере инкубаторе в течение 24 ч при 30 °С на L бульоне, который является оптимальной средой для наработки инокулята [317, 318]. Получение посевного материала лактобактерий осуществляли путем статического культивирования в термостате на MRS бульоне в течение 24 ч при 30 °С. Перед засевом ферментёров культуральные жидкости двух (для *Bacillus* spp.) или трёх (для *Lactiplantibacillus* spp.) штаммов смешивались в равных объёмах. Посевной материал составлял 10% от объёма ферментационной среды. Параметры посевного материала представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Характеристика посевного материала штаммов *Lactiplantibacillus* spp. и *Bacillus* spp. (M±m)

Штамм	Оптическая плотность	pH	Численность, lg КОЕ/мл
<i>B. atrophaeus</i> 7	0,498±0,046	7,47±0,17	8,85±0,28
<i>B. subtilis</i> 1/8	0,433±0,042	7,29±0,21	9,05±0,15
<i>L. plantarum</i> М	1,305±0,120	3,81±0,09	10,19±0,28
<i>L. plantarum</i> ЛВ	0,915±0,106	3,86±0,16	9,88±0,42
<i>L. paraplantarum</i> 8Б	1,087±0,138	3,74±0,14	9,66±0,29

Предварительно до засева ферментера проводили отбор проб питательной среды для контроля стерильности. Чистоту пробы оценивали по результатам микроскопии. После внесения посевного материала в ферментёр первые 6 ч культивирования с периодичностью 2 ч осуществляли отбор проб для контроля физиологического состояния штаммов. Для этого измеряли оптическую плотность и активную кислотность среды, а также проводили микроскопический анализ. Завершали культивирование лактобацилл через 24±2 ч. Окончание ферментации ко-культуры *Bacillus* spp. проводили после завершения процесса спорообразования, что также происходило через 24±2 ч культивирования. Динамика роста культур в 3 л ферментёрах представлена на рисунке 20.

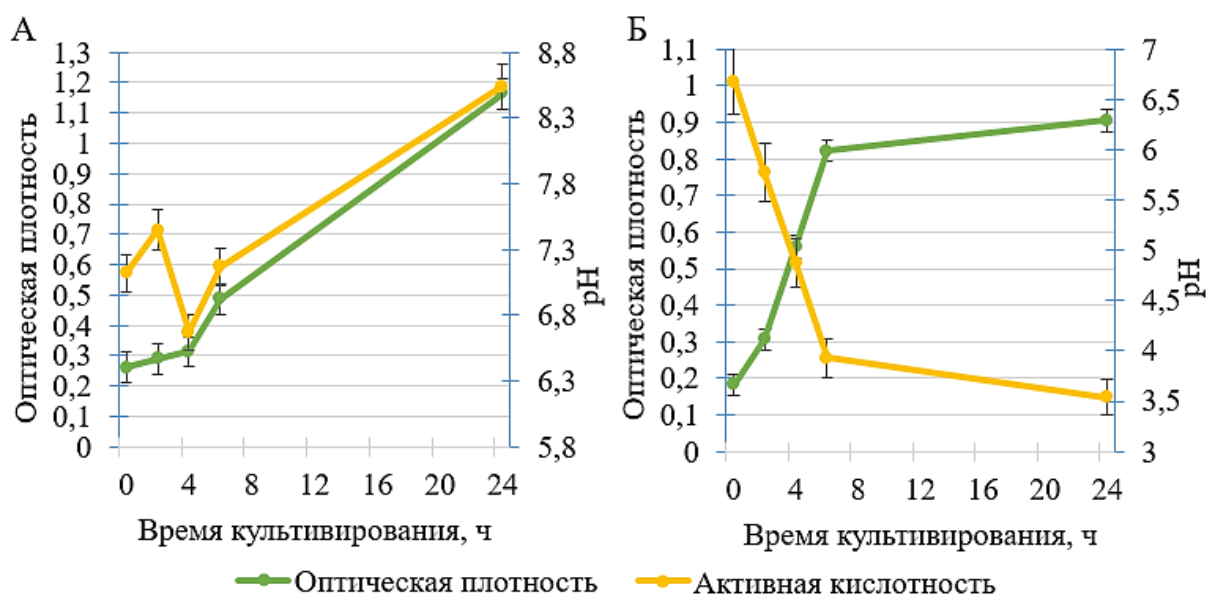


Рисунок 20 – Динамика оптической плотности и активной кислотности среды в процессе ферментации ко-культур в 3 л биореакторе: А – ко-культура штаммов *Bacillus* spp.; Б – ко-культура штаммов *Lactiplantibacillus* spp.

Согласно полученным данным лаг-фаза культуры бацилл продолжалась 4–6 ч. Начиная с 6 ч ферментации отмечали интенсивный рост оптической плотности. В то же время наблюдалось снижение pH среды, что указывает на активное размножение бактерии и начало логарифмической фазы роста. После завершения роста культуры pH среды возрастал до 8,5–9 и к 22–24 ч роста по результатам микроскопии фиксировали преобладание спор над вегетативными клетками. Титр бактерий *Bacillus* spp. на конец ферментации составлял $9,26 \pm 0,19 \lg \text{КОЕ/мл}$.

Штаммы *Lactiplantibacillus* spp. в процессе ферментации демонстрировали более короткую лаг-фазу. Активный рост концентрации клеток был отмечен уже в первые 2 ч культивирования. Одновременно с этим происходило снижение уровня активной кислотности среды, указывающие на продукцию молочной кислоты штаммами. Через 6–8 ч культивирования начиналась стационарная фаза роста. Оптическая плотность и pH среды все последующее время культивирования существенно не изменялись. По завершению ферментации численность лактобактерий составляла $9,29 \pm 0,45 \lg \text{КОЕ/мл}$.

В целом динамика роста штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp., зафиксированная в нашем исследовании, согласуется с литературными данными [319–323].

Культуральные жидкости штаммов *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. смешивали в соотношении 1:1 для получения прототипа биологического препарата.

Концентрация клеток бацилл в готовом препарате составила $9,23 \pm 0,22$ lg КОЕ/мл и лактобактерий $9,55 \pm 0,13$ lg КОЕ/мл. Полученный прототип биологического препарата использовали для лабораторных испытаний.

3.3.4 Культивирование в ферментере 15 л

Для получения опытной партии биологического препарата проводили культивирование штаммов в 15 л ферментере. Глубинное культивирование штаммов *Bacillus* spp. осуществляли при следующих условиях: ферментационная среда ФБ, температура 30 °С, концентрация растворенного кислорода 50%, перемешивание 250 об/мин. Ко-культуру *Lactiplantibacillus* spp. выращивали на среде ФЛ, при температуре 30 °С и перемешивании 250 об/мин. в анаэробных условиях.

Посевной материал получали аналогично посевному материалу для ферментёров объёмом 3 л. Доля инокулята составляла 10% от объёма среды. Параметры посевного материала указаны в таблице 20.

Отбор проб с ферментера проводили до засева и, затем, с интервалом 2 ч первые 8–10 ч культивирования. Для всех проб фиксировали значение оптической плотности и pH. Помимо этого, рост культур отслеживали по результатам микроскопии. Продолжительность ферментации, как и в 3 л биореакторах, составляла 24 ± 2 ч. Динамика роста культур *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. представлена на рисунке 21.

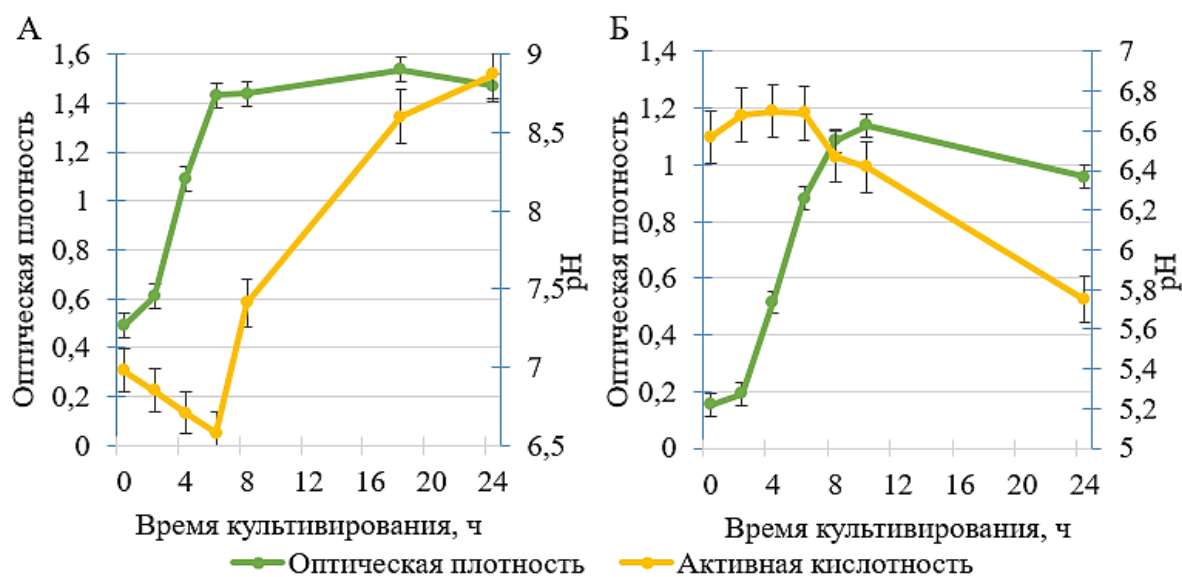


Рисунок 21 – Динамика оптической плотности и активной кислотности среды в процессе ферментации ко-культур в 15 л биореакторе: А – ко-культура штаммов *Bacillus* spp.; Б – ко-культура штаммов *Lactiplantibacillus* spp.

Характер роста штаммов *Bacillus* spp. при культивировании в 15 л ферментере несколько отличался от роста штаммов в биореакторе меньшего объёма. Активный рост оптической плотности фиксировали, начиная с 2 ч культивирования. Параллельно в первые 6 ч культивирования происходило падение pH среды. Напротив, в 3 л ферментёре значительный рост оптической плотности отмечали не раньше 4–6 ч ферментации, а снижение активной кислотности среды – с 4 ч. Численность бацилл на конец культивирования в 15 л аппарате составила $9,21 \pm 0,24 \lg \text{КОЕ/мл}$.

Динамика роста штаммов *Lactiplantibacillus* spp. в 15 л ферментёре оказалась аналогичной динамике роста в 3 л аппарате. После короткой лаг-фазы (около 2 ч) наступала фаза экспоненциального роста, которая продолжалась 8–10 ч. До перехода в стационарную фазу pH культуральной жидкости поддерживали на уровне 6,5–6,8, чтобы избежать чрезмерного закисления среды и замедления роста штаммов. Тем не менее к концу ферментации наблюдалось снижение активной кислотности среды до 5,6–5,8. Итоговая численность лактобацилл составила $9,27 \pm 0,23 \lg \text{КОЕ/мл}$.

Получение опытной партии биологического препарата осуществляли аналогично указанному в пункте 3.3.3. Готовый препарат представлял собой мутную жидкость темно-коричневого цвета, при отстаивании с осадком. Численность споровых бактерий в препарате составила $9,06 \pm 0,28 \lg \text{КОЕ/мл}$, а лактобактерий $9,57 \pm 0,51 \lg \text{КОЕ/мл}$.

3.3.5 Определение сроков хранения прототипа биологического препарата

Для прототипа биопрепарата проводили оценку сохранности численности бактерий в течение 6 месяцев при разных условиях хранения: температура +4 °C и +25 °C; с добавлением консервантов (0,3% аскорбиновой кислоты, 10% NaCl или 10% глицерина) или без них.

Согласно полученным данным, температура оказывала значительное влияние на численность бактерий в процессе хранения. Для бактерий *Bacillus* spp. при хранении в холодильнике (+4 °C) титр жизнеспособных клеток снизился на 6,91, 16,65, 16,19 и 2,52% в контрольном образце и образцах с консервантами (аскорбиновая кислота, NaCl, глицерин) соответственно. При хранении в комнатных условиях (+25 °C) отмечено значительное падение количества клеток не зависимо от применения стабилизаторов. Численность споровых бактерий при этом снизилась на 17,22, 25,66, 52,95 и 2,49% в

образцах препарата без консервантов, с внесением аскорбиновой кислоты, NaCl и глицерина соответственно (рисунок 22).

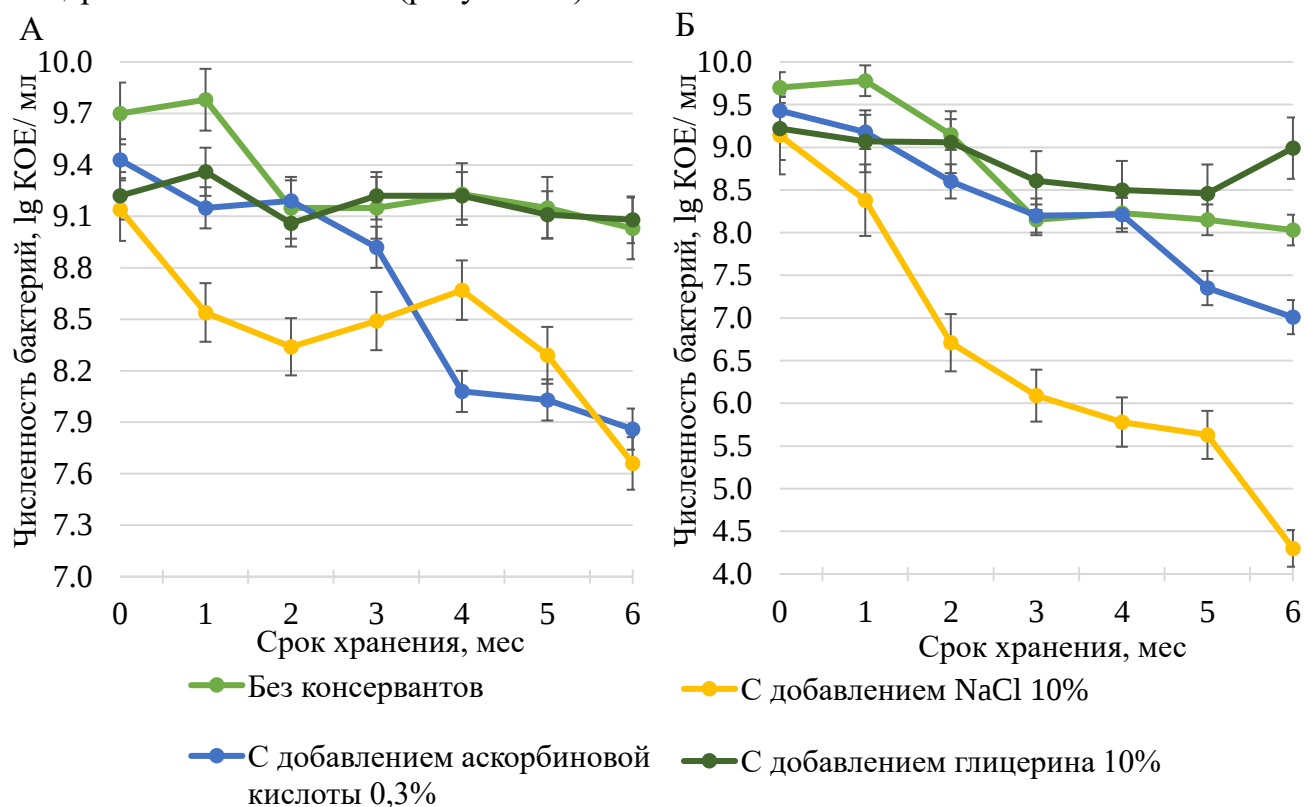


Рисунок 22 – Динамика численности бактерий *Bacillus* spp. в процессе хранения прототипа биопрепарата: А – при температуре +4 °С; Б – при температуре +25 °С

Существенное сокращение численности в процессе хранения выявлено для штаммов *Lactiplantibacillus* spp. Снижение численности на порядок с первого месяца зафиксировано для всех вариантов, за исключением образца без консервантов, хранящегося в условиях холодильника (+4 °С). К концу срока хранения для образцов, в которые вносили NaCl в качестве консерванта, отмечено полное отсутствие лактобактерий. Для прототипов биопрепарата с температурой хранения +4 °С титр бактерий *Lactiplantibacillus* spp. за 6 месяцев снизился на 12,96% в образце без добавления консервантов и на 18,18 и 14,99% – для образцов с аскорбиновой кислотой и глицерином. При хранении в комнатных условиях (+25 °С) зафиксировано падение численности на 31,87, 26,86 и 25,15% для образцов без консервантов и с добавлением аскорбиновой кислоты и глицерина соответственно (рисунок 23).

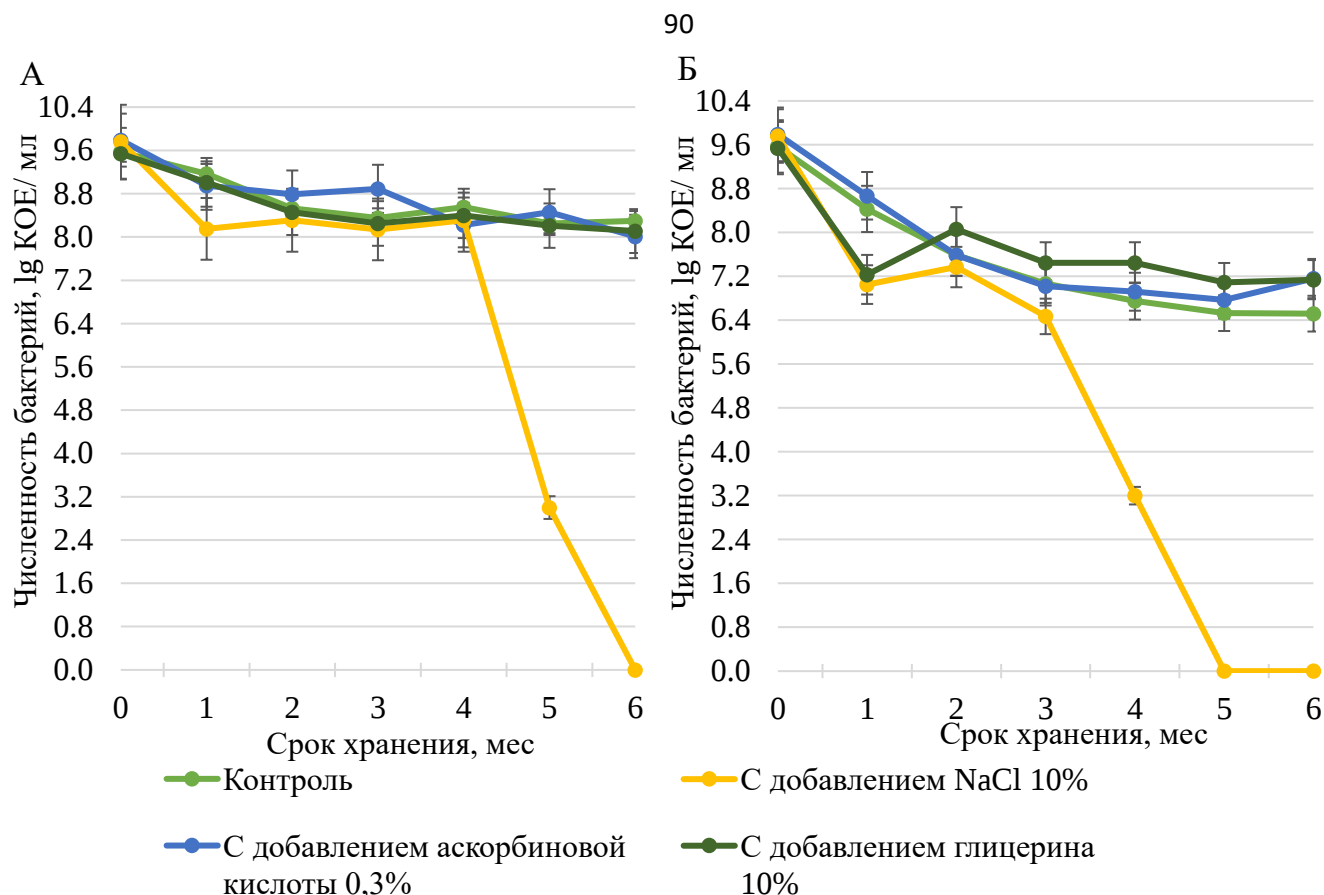


Рисунок 23 – Динамика численности бактерий *Lactiplantibacillus* spp. в процессе хранения прототипа биопрепарата: А – при температуре +4°C; Б – при температуре +25°C

В итоге на конец срока хранения максимальная численность штаммов *Bacillus* spp. установлена при температуре хранения +4 °C в образцах без консервантов ($9,03 \pm 0,18$ lg КОЕ/мл) и с добавлением консерванта глицерина ($9,08 \pm 0,12$ lg КОЕ/мл). Максимальный титр *Lactiplantibacillus* spp. через 6 месяцев составил $8,30 \pm 0,08$ lg КОЕ/мл в контрольном образце при температуре хранения +4 °C.

Для лактобактерий характерно значительное снижение численности жизнеспособных клеток в процессе хранения, что отмечают и другие исследователи. Так, количество жизнеспособных бактерий *Lactobacillus paracasei* в пробиотике сократилось на 2–3 порядка за 35 дней независимо от использования стабилизирующих добавок [324].

Бактерии рода *Bacillus*, напротив, благодаря способности к спорообразованию, более устойчивы к факторам окружающей среды и соответственно должны долгое время сохранять высокую численность при хранении биопрепарата. Например, для препарата на основе *B. subtilis* EPCO16 показано сохранение исходного титра микроорганизмов в течение года при использовании консервантов или в течение 2 месяцев в случае хранения без дополнительного внесения стабилизаторов [325].

Таким образом, для жидкого прототипа биопрепарата установлен срок и условия хранения – 6 месяцев при температуре +4 °С без внесения стабилизаторов. Для дальнейших исследований необходим подбор других консервантов, увеличивающих срок хранения готовой формы прототипа данного препарата. Характеристика разработанного прототипа биологического препарата для санации животноводческих помещений и подстилки представлена в таблице 21.

Таблица 21 – Основные показатели прототипа биологического препарата

Наименование показателя	Значение показателя
Форма препарата	Жидкая
Консистенция	Текучая, мутная, допускается образование осадка при длительном хранении, растворяющегося при взбалтывании перед применением
Цвет	От темно-желтого до темно-коричневого
Запах и вкус	Специфический для входящих в состав компонентов питательных сред: меласса, кукурузный экстракт; не гнилостный и не затхлый, вкус солоноватый, иногда с горчинкой
Количество жизнеспособных клеток <i>Bacillus atrophaeus</i> RCAM06423, <i>Bacillus subtilis</i> RCAM06733, <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> B-14828, <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> B-14829, <i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> B-14830	не менее 9,00 lg КОЕ/мл
Посторонние микроорганизмы	Не допускается

На производство опытных партий препарата была сформирована нормативно-техническая документация: Технические условия (ТУ 10.89.19.290-008-02067818-2026, приказ ректора «Алтайский государственный университет» №123/П от 04.02.2026); Технологическая инструкция (приказ ректора «Алтайский государственный университет» №122/П от 04.02.2026) (приложение Ж).

3.4 Определение эффективности прототипа биологического препарата

3.4.1 Лабораторные испытания прототипа биологического препарата

Эффективность полученного прототипа препарата как средства биоконтроля патогенных микроорганизмов оценивали на тест-поверхностях из бетона, оцинкованной стали и облицовочной плитки. В результате было установлено достоверное ($p \leq 0,05$)

снижение количества жизнеспособных клеток патогенных микроорганизмов на всех поверхностях, обработанных биопрепаратом, по сравнению с контрольными поверхностями.

В отношении *E. coli* 6Т наиболее выраженный биоконтрольный эффект препарат показал на поверхности из облицовочной плитки. Максимальное снижение численности тест-культуры составило 24,96% через 24 ч после обработки. Через 48 ч на обработанных поверхностях количество жизнеспособных клеток *E. coli* 6Т было на 24,61% ниже, чем на контрольных (рисунок 24).

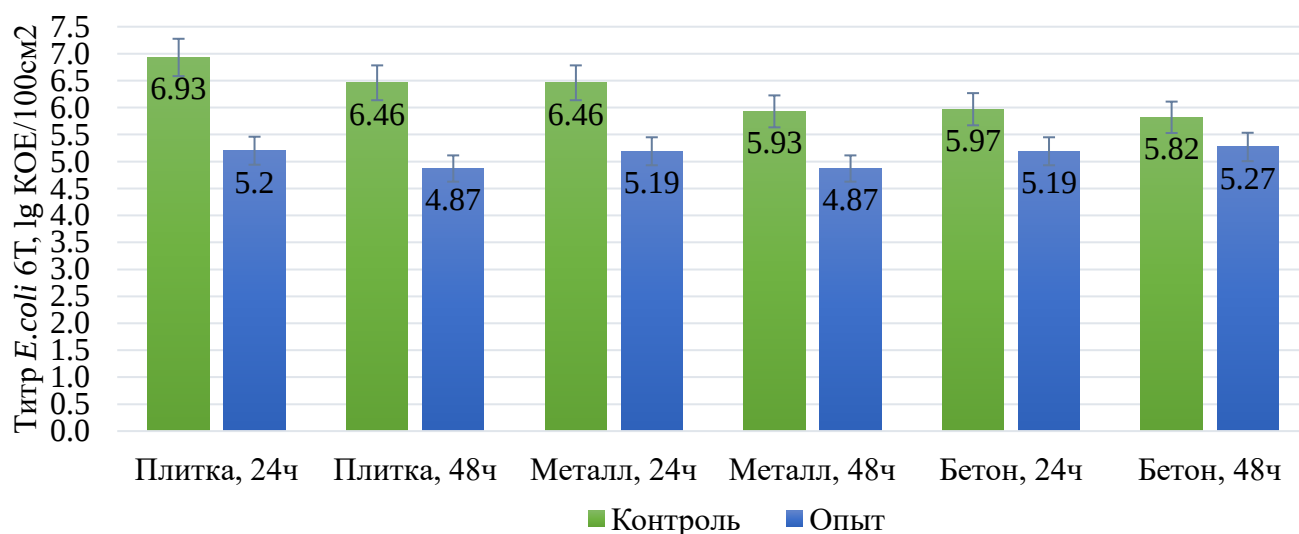


Рисунок 24 – Численность тест-культуры *E. coli* 6Т на поверхностях из облицовочной плитки, оцинкованной стали и бетона при обработке прототипом препарата

На поверхностях из металла и бетона зафиксировано снижение эффекта биологического препарата через 48 ч. Количество бактерий *E. coli* 6Т на стальных и бетонных поверхностях после экспозиции 24 ч было ниже, чем на контрольных поверхностях на 19,66 и 13,07% соответственно. Однако через 48 ч отмечали, что численность тест-культуры в опыте снижена относительно контроля на 17,88% на поверхностях из металла и на 9,45% на поверхностях из бетона.

Ингибирование тест-культуры золотистого стафилококка прототипом биологического препарата было более выражено на металлических поверхностях. На этом материале удалось снизить численность *St. aureus* 2Т на 19,96 % после экспозиции 24 ч и на 24,08% – после 48 ч (рисунок 25).

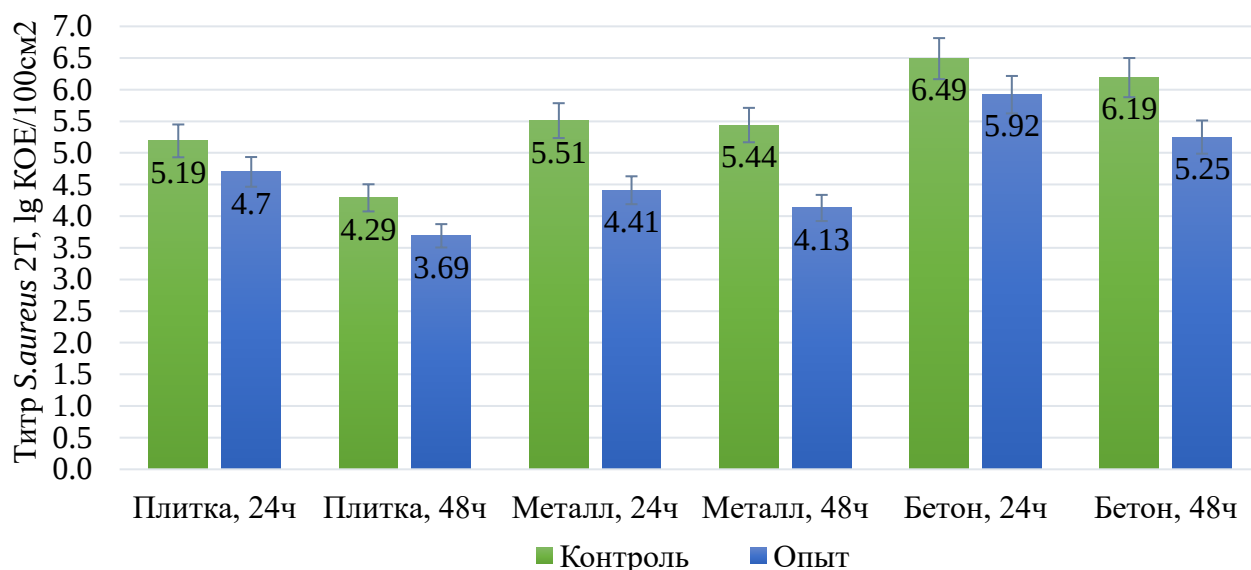


Рисунок 25 – Численность тест-культуры *St. aureus* 2Т на поверхностях из облицовочной плитки, оцинкованной стали и бетона при обработке прототипом препарата

Обработка поверхностей из плитки и бетона показала аналогичные результаты. Так на поверхности плитки численность стафилококков за 24 ч снизилась на 9,62%, а на бетоне на 8,64% относительно контрольных поверхностей. Через 48 ч титр *St. aureus* 2Т на обработанной плитке и бетоне был ниже на 13,98 и 15,19% соответственно.

Наибольшую эффективность прототип биопрепарата продемонстрировал в отношении тест-культуры *C. albicans* 1. В течении 24 ч после обработки зафиксировано снижение количества жизнеспособных клеток патогена на 19,13, 22,71 и 32,50% на поверхностях из плитки, металла и бетона соответственно. По истечению 48 ч численность дрожжей *C. albicans* 1 на обработанных образцах из плитки и металла снизилась еще 30,84 и 45,42% по сравнению с контролем. Для поверхности из бетона напротив отмечено снижение действия бактериальной композиции. Численность тест-культуры через 48 ч был ниже на обработанном бетоне на 25,08% (рисунок 26).

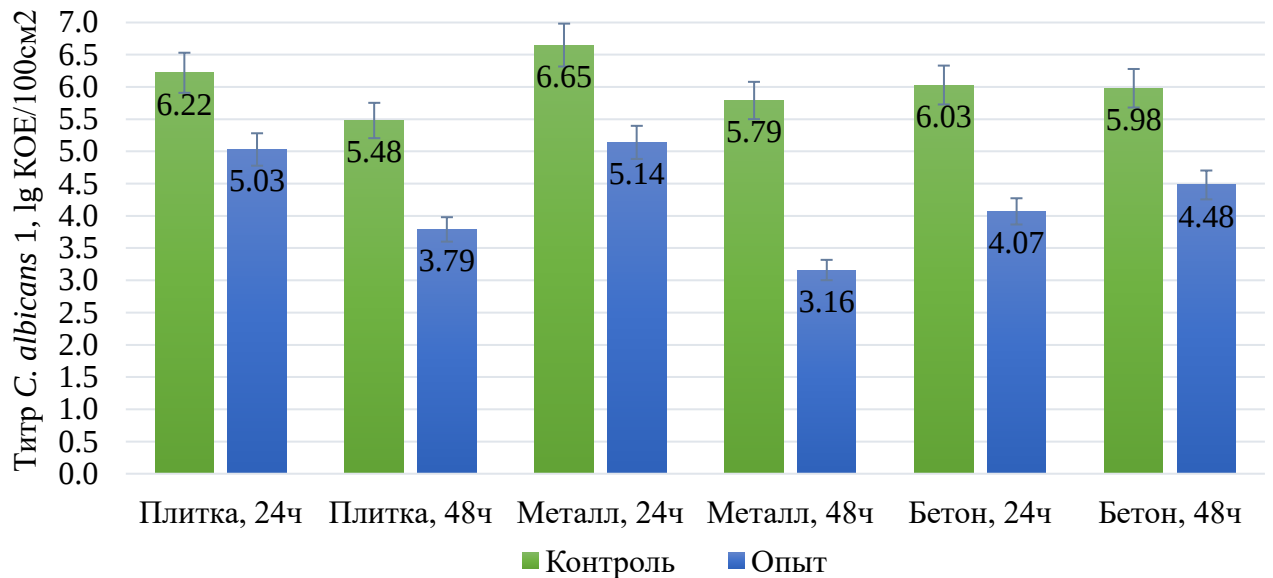


Рисунок 26 – Численность тест-культуры *C. albicans* 1 на поверхностях из облицовочной плитки, оцинкованной стали и бетона при обработке прототипом препарата

По результатам эксперимента было показано, что эффективность прототипа биопрепарата зависела от материала поверхности. В исследованиях Gallandat et al. (2017) и Medina et al. (2020) был сделан вывод о том, что шероховатость поверхности являлась фактором, оказывающим значительное влияние на эффективность инактивации микроорганизмов дезинфицирующими средствами [326, 327]. Полученные в нашем исследовании данные также согласуются с таким выводом. На поверхности из бетона эффективность препарата в отношении *E. coli* 6Т была ниже, чем на других поверхностях. Помимо этого, на данном типе поверхности фунгицидное действие препарата снижалось при более длительной экспозиции. Это может быть связано с влиянием топологии поверхности на адгезию микроорганизмов, а также влагопоглощающей способности материала [328, 329].

Таким образом, было установлено, что прототип биологического препарата позволяет снижать численность санитарно-показательных микроорганизмов на разных типах поверхностей. Дальнейшие исследования были направлены на оценку эффективности прототипа биологического препарата в условиях *in vivo*.

3.4.2 Испытания прототипа биологического препарата в условиях животноводческого комплекса

Определение эффективности прототипа биологического препарата в животноводческом комплексе проводилось в период с августа по ноябрь 2025 г в ПЗ «Комсомольское» – филиале ФГБНУ ФАНЦА в поселке Урожайный Павловского района Алтайского края. Животные поступали в телятник на вторые сутки после рождения и помещались в индивидуальные клетки, где содержались последующие 2 месяца. Отбор смывов с пола и клеток, а также образцов подстилки в ходе эксперимента проводили до заселения телят и, затем, каждые 2 недели. Точки отбора проб представлены на рисунке 27.



Рисунок 27 – Точки отбора проб для определения микробиологических показателей в животноводческом комплексе при содержании телят: 1 – точка взятия смывов с клеток, 2 – точка взятия смывов с пола, 3 – точка отбора образцов подстилки

Согласно полученным данным исходно общая микробная численность не имела статистически достоверных различий между образцами, взятыми с контрольного и опытного участка. Заселение помещения животными не оказало существенного влияния на количество микроорганизмов на поверхностях клеток и пола. Рост численности мезофильных микроорганизмов в опытном участке относительно контрольного отмечен на 6-8 неделе содержания телят для прутьев клеток и на 8 неделе – для поверхности пола (таблица 22).

Таблица 22 – Динамика численности мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в телятнике ($M \pm m$)

Период содержания, недели	Клетки		Пол		Подстилка	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
	Численность микроорганизмов, lg КОЕ/м ²				Численность микроорганизмов, lg КОЕ/г	
0	4,93±0,49	4,82±0,47	4,62±0,77	4,20±0,32	6,93±0,11	6,93±0,11
2	4,58±0,15	4,57±0,76	4,78±0,34	4,53±0,48	8,38±0,59	9,21±0,56*
4	4,51±0,39	4,45±0,29	5,06±0,22	4,83±0,32	9,37±0,32	9,19±0,54
6	4,71±0,19	5,43±0,28*	5,05±0,09	4,99±0,30	9,59±0,35	9,77±0,28
8	4,48±0,27	4,82±0,07*	4,53±0,28	4,95±0,28*	9,77±0,28	9,73±0,24

* - статистически достоверное различие численности микроорганизмов между опытным и контрольным участками, $p < 0,05$

Для подстилки была характерна другая динамика численности мезофильных микроорганизмов. По истечении 2 недель содержания телят микробная обсемененность подстилки выросла на 2–3 порядка. При этом численность микроорганизмов в подстилке опытного участка превышала численность в подстилке контрольного участка на 9,90%. Вероятно, это связано с обработкой подстилки в этот период прототипом препарата. Начиная с 4 недели содержания телят этот показатель стабилизируется и не имеет достоверных различий как в опытном, так и в контрольном участке.

После заселения телят также наблюдалось увеличение численности бактерий группы кишечных палочек на поверхностях клеток и в подстилке. При этом количество энтеробактерий выросло на 5–6 порядков в подстилке и на 1 порядок на клетках, независимо от использования прототипа биологического препарата (таблица 23).

Таблица 23 – Динамика численности бактерий группы кишечных палочек в телятнике ($M \pm m$)

Период содержания, недели	Клетки		Пол		Подстилка	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
	Численность микроорганизмов, lg КОЕ/м ²				Численность микроорганизмов, lg КОЕ/г	
0	2,18±0,37	2,10±0,28	2,48±0,65	2,49±0,26	2,69±0,56	2,69±0,56
2	3,59±0,29	2,68±0,11*	2,33±0,58	2,48±0,19	8,03±0,35	7,54±0,46*
4	3,53±0,29	2,18±0,27*	2,62±0,72	2,80±0,28	8,16±0,41	7,99±0,49
6	2,05±0,78	2,00±0,13	2,65±0,47	2,24±0,34*	7,99±0,03	7,62±0,45
8	2,81±0,74	2,20±0,56*	2,42±0,42	1,65±0,30*	7,81±0,39	7,33±0,28*

* - статистически достоверное различие численности микроорганизмов между опытным и контрольным участками, $p < 0,05$

По результатам, представленным в таблице 22, видно, что обработка прототипом препарата позволила снизить численность БГКП на прутьях клеток на 19,82–29,80% и на 8,82–17,42% на поверхности пола. При этом, на поверхностях клеток положительная динамика отмечена с первого использования препарата. При этом на поверхности пола снижение численности энтеробактерий зафиксировано только после трёхкратной обработки.

Прототип препарата не оказал значимого влияния на количество БГКП в подстилке. Сниженная, относительно контрольного участка, численность бактерий отмечена только на второй и 8-й неделях содержания телят.

Численность бактерий р. *Staphylococcus* на поверхностях клеток в течение всего периода эксперимента не имела достоверных различий между опытным и контрольным участками. При этом также не было зафиксировано значительного влияния появления животных в помещении на этот показатель для поверхностей клеток. Увеличение численности стафилококков на 0,5 порядка отмечено после 4 недель содержания телят. В последующие недели количество бактерий этой группы оставалось стабильным (таблица 24).

Таблица 24 – Динамика численности стафилококков в телятнике ($M \pm m$)

Период содержания, недели	Клетки		Пол		Подстилка	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
	Численность микроорганизмов, lg КОЕ/м ²				Численность микроорганизмов, lg КОЕ/г	
0	3,43±0,21	3,01±0,33	3,58±0,33	3,15±0,56	3,40±0,05	3,40±0,05
2	3,19±0,06	3,12±0,38	3,66±0,34	3,70±0,42	6,51±0,04	6,48±0,49
4	3,58±0,15	3,55±0,24	4,06±0,18	3,42±0,46*	7,76±0,21	7,66±0,34
6	3,64±0,22	3,69±0,17	4,03±0,28	3,40±0,18*	8,14±0,26	7,89±0,44
8	3,87±0,13	3,54±0,21	4,25±0,32	3,27±0,22*	8,24±0,18	7,32±0,34*

* - статистически достоверное различие численности микроорганизмов между опытным и контрольным участками, $p < 0,05$

Согласно полученным результатам, численность стафилококков на поверхности пола также стабилизируется к 4 неделе содержания телят. Однако установленное количество бактерий р. *Staphylococcus* в опытном участке начиная с 4-й недели эксперимента на 10,45–15,68% ниже чем в контрольном, что указывает на биоконтрольное действие прототипа препарата.

Для подстилки наблюдалась тенденция к значительному росту численности микроорганизмов (на 3 порядка) спустя две недели содержания телят. Начиная с 4-й

недели численность стафилококков в подстилке стабилизируется. При этом достоверное различие численности бактерий между опытным и контрольным участками отмечено только в конце эксперимента.

Рост количества дрожжевых и плесневых грибов на поверхностях клеток и пола начинается со второй недели содержания телят. На контрольном участке численность данных микроорганизмов стабилизируется к 4-й неделе. На опытном участке, напротив, наблюдалось снижение количества жизнеспособных клеток грибов. Так на 6-й неделе эксперимента численность дрожжей и плесеней на поверхностях клеток и пола в опыте была ниже контроля на 27,83 и 9,89% соответственно. На 8-й неделе также было отмечено снижение этого показателя на опытном участке на 22,65% на прутьях клеток и на 8,84% на полу (таблица 25). Такая динамика указывает на положительное влияние прототипа биопрепарата на санитарный фон помещения.

Таблица 25 – Динамика численности дрожжей и плесеней в телятнике ($M \pm m$)

Период содержания, недели	Клетки		Пол		Подстилка	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
	Численность микроорганизмов, lg КОЕ/м ²				Численность микроорганизмов, lg КОЕ/г	
0	2,74±0,25	2,74±0,23	2,72±0,26	2,68±0,28	5,54±0,17	5,54±0,17
2	2,78±0,12	2,69±0,17	3,09±0,18	3,09±0,19	6,08±0,29	5,75±0,21
4	3,39±0,29	3,67±0,15	3,59±0,18	3,39±0,35	6,09±0,52	6,09±0,16
6	3,95±0,38	3,09±0,21*	3,66±0,45	3,10±0,19*	7,19±0,21	6,40±0,29*
8	3,43±0,43	2,20±0,20*	3,09±0,28	2,64±0,28*	6,77±0,29	5,92±0,29*

* - статистически достоверное различие численности микроорганизмов между опытным и контрольным участками, $p < 0,05$

В подстилке зафиксирован рост численности дрожжей и плесневых грибов с момента заселения телят в боксы. При этом для подстилки, обработанной прототипом биологического препарата, отмечен более медленный рост количества грибов относительно необработанной подстилки. В соответствии с полученными данными было установлено, что на 6-й и 8-й неделях численность дрожжей и плесеней в подстилке опытного участка было на 10,99 и 12,56% ниже численности этих микроорганизмов в подстилке контрольного участка.

Результаты испытания прототипа биологического препарата в условиях телятника коррелируют с выводами, полученными нами в ходе лабораторных испытаний. Так, на эффективность препарата повлияла структура материала поверхности. На металлических прутьях клеток использование препарата позволяло снижать количество санитарно-

показательных микроорганизмов на 19–29%. При этом на бетонном полу численность патогенных микроорганизмов была на уровне контроля или же снижена на 8–17%.

Эффективность действия прототипа биологического препарата также в значительной мере определялась целевой группой микроорганизмов. Наиболее успешным отмечено биоконтрольное действие разработанного препарата на БГКП, а также дрожжей и плесневых грибов. Напротив, на бактерий р. *Staphylococcus* на решетках клетки препарат не оказал значимого влияния. Это противоречит результатам лабораторных исследований. Так выбранные штаммы демонстрировали высокий уровень антагонизма в отношении стафилококков при тестировании их чашечными методами. Также и лабораторные испытания прототипа препарата указывали на угнетение стафилококков бактериями препарата на всех исследуемых типах поверхностей, включая металл. Несоответствие результатов экспериментов, проведенных в лаборатории и в хозяйстве, объясняется тем, что свойства микроорганизма в «упрощенной» лабораторной среде может существенно отличаться от его свойств в естественных условиях обитания. В естественных условиях микроорганизмы существуют в сложно организованных микробиоценозах, где на них воздействует одновременно множество не только абиотических, но и биотических факторов. Вследствие чего проведение лабораторных исследований является важным этапом для оценки целевых признаков, но не является гарантией такого же результата в многовидовом сообществе в условиях *in vivo*.

Согласно полученным результатам биоконтрольный эффект прототипа препарата проявлялся преимущественно с 4–6 недели содержания телят, что указывает на его отсроченное действие. Вероятно, бактериям из препарата необходимо время, чтобы закрепиться в формирующемся микробном сообществе и начать конкурировать с патогенными бактериями и грибами за питательный субстрат и пространство.

Помимо исследования влияния биологического препарата на микрофлору помещения важно также учитывать его влияние на животных. Ценным критерием состояния животных являются их показатели продуктивности. В данном исследовании для телят в контрольной и опытной группах оценивали среднесуточный привес за время проведения эксперимента.

В результате было установлено, что среднесуточные привесы телят в октябре и ноябре в опытной группе превышали привесы контрольной группы на 10,34 и 18,75% соответственно. Однако в сентябре и декабре этот показатель не имел значимых различий

у телят в обеих группах. Вероятно, это связано со стрессом, вызванным сменой условий содержания в эти периоды (рисунок 28).

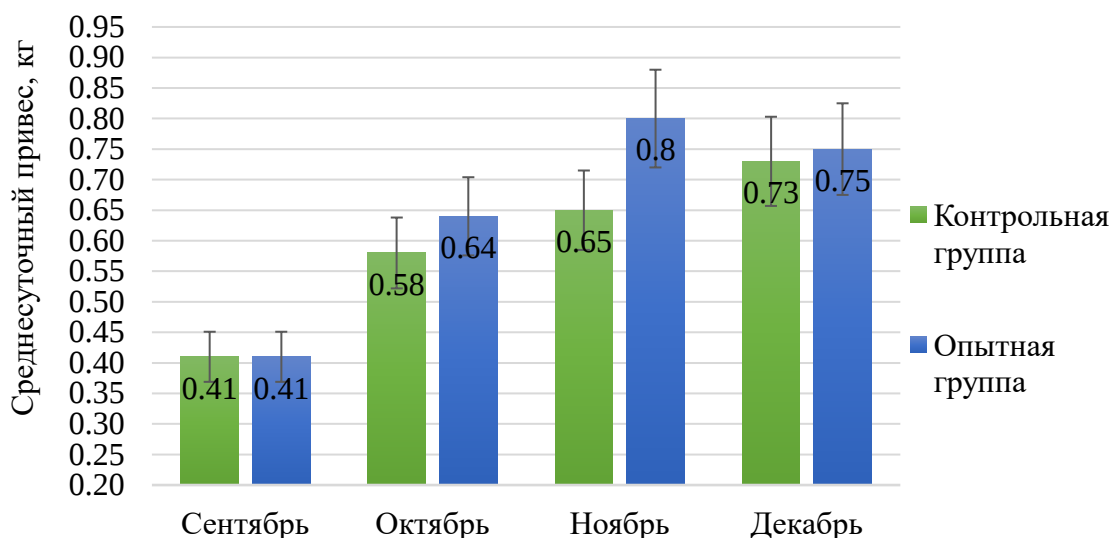


Рисунок 28 – Среднесуточные привесы телят в течение эксперимента

Согласно полученным результатам обработка помещения препаратом не повлияла на процессы адаптации телят к новым условиям. Как известно, новорожденные телята подвергаются стрессовым факторам, связанным с рождением, отъёмом, транспортировкой и сменой условий содержания [330]. Поэтому активный набор массы начинается с задержкой. В данном случае телята поступали в телятник на 2 сутки после рождения и к моменту первого взвешивания находились там около 2–3 недель. Следовательно, препарат не оказал положительного или отрицательного влияния на телят в первые недели жизни.

Дальнейшее содержание телят в помещении, обрабатываемом биологическим препаратом, положительно сказалось на их среднесуточных привесах. Это может косвенно свидетельствовать о позитивном влиянии разработанного биологического препарата на процессы жизнедеятельности животных. Возможно такой эффект связан с улучшением санитарного фона на предприятии, а также модулирующим действием на формирующуюся микрофлору кишечника.

Положительную динамику показателей продуктивности при использовании биологических препаратов для обработки животноводческих помещений отмечают также и другие исследователи. Так использование препаратов «Энатин» и «Виросан» для санации помещений при выращивании поросят благоприятно сказывалось на показателях

продуктивности и иммунном статусе поросят-отъемышей. Среднесуточный прирост при этом увеличился на 18,20–19,50% [19, 20].

Также следует отметить, что в течение эксперимента ни в одной из групп не было зафиксировано падежа или вспышек инфекционных заболеваний. В возрасте 4 месяцев для всех телят было проведено серологическое исследование на бруцеллез, по результатам которого случаев заболевания выявлено не было. Протоколы испытаний представлены в приложении 3.

Таким образом, была показана эффективность прототипа биологического препарата как средства биоконтроля патогенной микрофлоры в условиях животноводческого предприятия. Зафиксировано снижение численности БГКП, бактерий р. *Staphylococcus*, дрожжей и плесеней на поверхностях помещения и в подстилке. Также, установлено увеличение среднесуточных привесов в опытной группе на 10,34–18,75%.

ВЫВОДЫ

1. Из природных и антропогенных источников выделено 17 новых штаммов *Bacillus* spp. и 8 штаммов бактерий семейства *Lactobacillaceae*. Штаммы *B. atrophaeus* 7 (RCAM06423, Пат. РФ № 2821008) и *B. subtilis* 1/8 (RCAM06733, Пат. РФ № 2859479) депонированы в Коллекции культур сельскохозяйственных микроорганизмов и запатентованы Федеральном институте промышленной собственности. Штаммы *L. plantarum* ЛВ (В-14828), *L. plantarum* М (В-14829) и *L. paraplantarum* 8Б (В-14830) депонированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

2. Штаммы *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 обладают выраженной антагонистической активностью по отношению к *E. coli*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *St. aureus*, *St. xylosus*, *St. epidermidis*, *St. gallinarum*, *St. lentus* и грибов *C. albicans*, *Geotrichum* sp., а штаммы *L. plantarum* ЛВ, *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б ингибируют рост *E. coli*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *St. aureus*, *St. xylosus*, *St. epidermidis*, *St. gallinarum*, *St. lentus* и грибов *Geotrichum* sp.

3. Штаммы *B. atrophaeus* 7, *B. subtilis* 1/8, *L. plantarum* ЛВ, *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б биосовместимы.

4. Охарактеризован биотехнологический потенциал штаммов:

а) все отобранные штаммы продуцируют внеклеточные соединения с антимикробной активностью: штаммы *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 – амилазы, протеазы, целлюлазы, хитиназы и бисурфактанты, а штаммы *L. plantarum* ЛВ, *L. plantarum* М и *L. paraplantarum* 8Б – целлюлазы, бисурфактанты и молочную кислоту;

б) метаболомный профиль штамма *B. atrophaeus* 7 включает 75 соединений, а для штамма *B. subtilis* 1/8 – 71, из которых 34 метаболита обнаружены в культуральной жидкости обоих штаммов; штамм *L. plantarum* ЛВ продуцировали 40 соединений, штамм *L. plantarum* М – 60 соединений, штамм *L. paraplantarum* 8Б – 55 соединений, при этом 23 экзометаболита были общими для всех штаммов *Lactiplantibacillus* spp;

в) все штаммы выделяют экзометаболиты с терапевтическими и пробиотическими свойствами: метаболитный профиль штаммов *Bacillus* spp. включает 1-метилникотинамид, N-ацетилсерин, дофамин, пантотеновую, гуанидоуксусную, 4-гидроксифенилмолочную и гомованилиновую кислоты, при этом уникальными метаболитами штамма *B. atrophaeus* 7 являются пиридоксаль, дезоксиинозин,

простагландин J2, антранилат, N-ацетил спермидин, ацетилхолин, 2-гидрокси-3-метилмасляная, 4-гидроксифенилуксусная, салицилуровая, фенилмолочная и 2-изопропилмалоновая кислоты, а уникальными метаболитами штамма *B. subtilis* 1/8 – никотинамид, метилцистеин и азелаиновая кислота; штаммы *Lactiplantibacillus* spp. продуцировали ацетилхолин, N-ацетил спермидин, глицин, молочную, фенилмолочную и 4-гидроксифенилмолочную кислоты, при этом уникальными для метаболомов штаммов *L. plantarum* были аргинин, гидрокси-3-метилмасляная, 2-изопропилмалоновая и гуанидоуксусная кислоты, а для штамма *L. plantarum* М – арахидоновая и докозагексаеновая кислоты;

г) штаммы *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. безопасны и нетоксичны: при однократном введении супернатантов штаммов *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8 мышам не выявлено летальных случаев; штаммы *Bacillus* spp. чувствительны к действию доксициллина, ампициллина, канамицина, стрептомицина, левомицетина, тилозина, энрофлоксацина, а штаммы *Lactiplantibacillus* spp. к действию доксициллина, ампициллина и левомицетина.

5. Разработана технология и оптимальные условия производства биологического препарата для коррекции микрофлоры животноводческих помещений в жидкой форме: посевная среда – L бульон, основная ферментационная среда – ФБ, температура культивирования – 30 °С; продолжительность роста 24 ч, совместное культивирование в виде ко-культуры из 2 штаммов *Bacillus* spp.; посевная среда – MRS бульон, основная ферментационная среда – ФЛ, температура культивирования – 30 °С; продолжительность роста 24 ч, совместное культивирование в виде ко-культуры из 3 штаммов *Lactiplantibacillus* spp. Готовый препарат представляет собой жидкость темно-коричневого цвета, численность бактерий *Bacillus* spp. не менее 9,00 lg КОЕ/мл и не менее 9,00 lg КОЕ/мл лактобактерий.

6. Определена эффективность прототипа биологического препарата в лабораторных и промышленных условиях:

а) в лабораторных условиях обработка препаратом тест-поверхностей, контаминированных условно-патогенными микроорганизмами, позволила снизить численность *E. coli* на 9,45–24,61%, численность *St. aureus* на 13,98–24,08% и численность *C. albicans* на 25,08–45,42% за 48 ч;

б) в условиях телятника разработанный прототип препарата улучшал санитарный фон: численность БГКП на поверхностях клеток и пола уменьшилась на 19,06–29,80%, в подстилке на 6,10–6,15%; количество бактерий р. *Staphylococcus* сократилось на 10,45–15,68% на полу и на 11,17% в подстилке; численность дрожжей и плесневых грибов снизилась на 10,99–12,56% в подстилке и на 22,65% и 8,84–9,89% на поверхностях клеток и пола соответственно.

7. Санация помещения и подстилки прототипом биологического препарата положительно повлияла на среднесуточный привес телят: установлено его повышение на 10,34–18,75% по сравнению с контрольной группой.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Новые штаммы *Bacillus* spp. и *Lactiplantibacillus* spp. могут стать типовыми для практикующих микробиологов и биотехнологов, а также использоваться в других фундаментальных и прикладных исследованиях, в том числе при разработке других биологических препаратов для сельского хозяйства и пищевой промышленности.

2. Разработанный прототип препарата для санации помещений и подстилки рекомендован для использования при проведении профилактической дезинфекции в животноводческих комплексах. Обработка должна проводиться после механической очистки помещения, расход препарата составляет 70–80 мл/м², кратность применения не менее трёх с интервалом 1–2 недели.

3. Опытный образец препарата может быть использован в дальнейших исследованиях по изучению его эффективности на других объектах животноводства.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БГКП – бактерии группы кишечных палочек

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

ВКСМ – Коллекция культур сельскохозяйственных микроорганизмов

ВЭЖХ МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

ГКПМ-Оболенск – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур

ИБР – индекс блокирования роста

ИЦ – инжиниринговый центр

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов

КРС – крупный рогатый скот

ПАВ – поверхностно активные вещества

Пат. – патент

РФ – Российская Федерация

ФБ – ферментационная среда для бактерий р. *Bacillus*

ФЛ – ферментационная среда для лактобактерий

ФГБНУ ФАНЦА – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный Алтайский научный центр агrobiотехнологий»

ФБУН ГНУ ПМБ – Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

ЧАС – четвертичные аммониевые соединения

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.б.н. Иркитовой А.Н. за помощь и поддержку при проведении исследований. Также автор выражает благодарность сотрудникам ИЦ «Промбиотех» к.б.н. Малковой А.В., к.б.н. Евдокимову И.Ю., Ширманову М.В., Кожевниковой Е.Н. и Лапшиной Н.В. за помощь в осуществлении экспериментов. Автор выражает благодарность Басову Н.В. за помощь в проведении метаболомного анализа штаммов и Хлоповой К.В. за помощь в исследовании безопасности штаммов. Автор признателен главному ветеринарному врачу ПЗ «Комсомольское» Корсык Л.Н. за возможность проведения промышленных испытаний разработанного прототипа биологического препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новиков, А.Н. Изучение видового состава микроорганизмов производственной среды животноводческих помещений / А.Н. Новиков, П.В. Аржаков, Т.С. Дудолодова, Е.А. Кособоков // Ветеринария сегодня. – 2025. – Т. 14. – № 4. – С. 426–432. DOI: 10.29326/2304-196X-2025-14-4-426-432.
2. González-Ortiz, G. Evaluation of xylanase and a fermentable xylo-oligosaccharide on performance and ileal digestibility of broiler chickens fed energy and amino acid deficient diets / G. González-Ortiz, T.T. Dos Santos, M.R. Bedford // Anim Nutr. – 2021. – Vol. 7. №. 2. – P. 488–495. DOI: 10.1016/j.aninu.2020.07.008.
3. De Cesare, A. Impact of a probiotic-based cleaning product on the microbiological profile of broiler litters and chicken caeca microbiota / A. De Cesare, E. Caselli, A. Lucchi [et al.] // Poult Sci. – 2019. – Vol. 98. – №. 9. – P. 3602–3610. DOI: 10.3382/ps/pez148.
4. Смирнов, С. Л. Применение современных методов и средств дезинфекции в системе профилактических мероприятий в животноводстве и птицеводстве / С. Л. Смирнов // Развитие науки и практики в контексте глобальных вызовов: Сборник статей по материалам 76-й Международной научно-практической конференции, п. Караваево, 06 февраля 2025 года. – п. Караваево: Костромская государственная сельскохозяйственная академия. – 2025. – С. 114–124.
5. Chatelet, A. Impact of hygiene of housing conditions on performance and health of two pig genetic lines divergent for residual feed intake / A. Chatelet, F. Gondret, E. Merlot [et al.] // Animal. – 2018. – Vol. 12. – № 2. – P. 350–358. DOI: 10.1017/S1751731117001379.
6. Томских, О.Г. Неблагоприятные параметры микроклимата как факторы, способствующие развитию заболеваний копыт у коров / О.Г. Томских, А.С. Красноперов, С.В. Малков [и др.] // Инновации и продовольственная безопасность. – 2023. – № 3(41). – С. 18–24. DOI: 10.31677/2311-0651-2023-41-3-18-24.
7. Плотников, И.В. Влияние дезинфекции на количественный и качественный состав микрофлоры животноводческих помещений / И.В. Плотников, Л.А. Глазунова // Ветеринария и кормление. – 2020. – № 1. – С. 40–42. DOI: 10.30917/АТТ-VK-1814-9588-2020-1-10.

8. Великанов В.И. Эколого-биологические факторы, обуславливающие острые расстройства пищеварения у телят / В.И. Великанов, А.И. Молев, О.В. Вавина // Ветеринарная патология. – 2005. – № 4(15). – С. 57–60.
9. Peyneau, M. Quaternary ammonium compounds in hypersensitivity reactions / M. Peyneau, L. de Chaisemartin, N. Gigant [et al.] // Front. Toxicol. – 2022. – Vol. 4. DOI: 10.3389/ftox.2022.973680.
10. Bakht, M. Phenotype and genetic determination of resistance to common disinfectants among biofilm-producing and non-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical specimens in Iran / M. Bakht, S.A. Alizadeh, S. Rahimi [et al.] // BMC Microbiol. – 2022. – Vol. 22. – № 1. DOI: 10.1186/s12866-022-02524-y.
11. Kim, M. Widely Used Benzalkonium Chloride Disinfectants Can Promote Antibiotic Resistance / M. Kim, M.R. Weigand, S. Oh [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2018. – Vol. 84. – № 17. DOI: 10.1128/AEM.01201-18.
12. Megahed, A. Comparative study on the efficacy of sodium hypochlorite, aqueous ozone, and peracetic acid in the elimination of Salmonella from cattle manure contaminated various surfaces supported by Bayesian analysis / A. Megahed, B. Aldridge, J. Lowe // PLoS One. – 2019. – Vol. 14. – № 5. DOI: 10.1371/journal.pone.0217428.
13. Arnold, W.A. Quaternary Ammonium Compounds: A Chemical Class of Emerging Concern / W.A. Arnold, A. Blum, J. Branyan [et al.] // Environ Sci Technol. – 2023. – Vol. 57. – № 20. – P. 7645–7665. DOI: 10.1021/acs.est.2c08244.
14. Hora, P.I. Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications / P.I. Hora, S.G. Pati, P.J. McNamara, W.A. Arnold // Environ Sci Technol Lett. – 2020. – Vol. 7. – № 9. – P. 622–631. DOI: 10.1021/acs.estlett.0c00437.
15. Leistner, R. Environmental cleaning to prevent hospital-acquired infections on non-intensive care units: a pragmatic, single-centre, cluster randomized controlled, crossover trial comparing soap-based, disinfection and probiotic cleaning / R. Leistner, B. Kohlmorgen, A. Brodzinski [et al.] // EClinicalMedicine. – 2023. – Vol. 59. DOI: 10.1016/j.eclinm.2023.101958.
16. Guéneau, V. Positive biofilms to guide surface microbial ecology in livestock buildings / V. Guéneau, J. Plateau-Gonthier, L. Arnaud [et al.] // Biofilm. – 2022. – Vol. 4. DOI: 10.1016/j.biofilm.2022.100075.

17. D'Accolti, M. Potential of an Eco-Sustainable Probiotic-Cleaning Formulation in Reducing Infectivity of Enveloped Viruses / M. D'Accolti, I. Soffritti, F. Bonfante [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 11. DOI: 10.3390/v13112227.
18. Guéneau, V. Positive biofilms to control surface-associated microbial communities in a broiler chicken production system - a field study / V. Guéneau, A. Rodiles, B. Frayssinet [et al.] // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. DOI: 10.3389/fmicb.2022.981747.
19. Беззубов, В.И. Продуктивность и сохранность поросят-отъемышей в зависимости от особенностей дезинфекции свиноводческих помещений / В.И. Беззубов, А.С. Петрушко, Д.Н. Ходосовский, И.И. Рудаковская // *Зоотехническая наука Беларуси*. – 2012. – Т. 47. – № 1. – С. 215–221.
20. Беззубов, В.И. Использование микробного препарата «Энатин» в качестве дезинфектанта свиноводческих помещений / В.И. Беззубов, А.С. Петрушко, Э.И. Коломиец [и др.] // *Зоотехническая наука Беларуси*. – 2009. – Т. 44. – № 1. – С. 189–194.
21. Reynolds, C.A. A multi-strain, biofilm-forming cocktail of *Bacillus* spp. and *Pediococcus* spp. alters the microbial composition on polyethylene calf housing surfaces / C.A. Reynolds, R.A. Scuderi, A.L. Skidmore [et al.] // *Microbiol Spectr.* – 2025. – Vol. 13. DOI: 10.1128/spectrum.03302-24.
22. Правительство российской федерации. Об утверждении Стратегии развития производства органической продукции в РФ до 2030 г. Распоряжение № 1788-р: [утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 4 июля 2023 года]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1302171516>.
23. Функ, И.А. Антагонистическая активность штаммов *Bacillus pumilus*, перспективных для включения в состав пробиотического препарата для животных / И.А. Функ, А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова, Д.Е. Дудник // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. – 2019. – № 12(182). – С. 126–130.
24. Дудник, Д.Е. Изучение свойств новых штаммов *Bacillus* sp., перспективных для использования в сельском хозяйстве / Д.Е. Дудник // *Актуальная биотехнология*. – 2022. – № 1. – С. 177–178.
25. Davis, M.A. *Escherichia coli* O157:H7 in environments of culture-positive cattle / M.A. Davis, K.A. Cloud-Hansen, J. Carpenter, C.J. Hovde // *Appl Environ Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – № 11. – P. 6816–6822. DOI: 10.1128/AEM.71.11.6816-6822.2005.

26. Beauchemin, J. Comparison of microbiota of recycled manure solids and straw bedding used in dairy farms in eastern Canada / J. Beauchemin, A. Fréchette, W. Thériault [et al.] // J. Dairy Sci. 2022. – Vol. 105. – № 1. – P. 389–408. DOI: 10.3168/jds.2021-20523.
27. Савина И.В. Влияние препарата PIP AHS на микрофлору животноводческих помещений / И.В. Савина, М.С. Сеитов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2013. – № 4(42). – С. 95-98.
28. Khan, I. Comparison of Bacterial Community Structure in PM2.5 within Broiler Houses under Different Rearing Systems in China / I. Khan, W. Wang, X. Ye [et al.] // Sustainability – 2022. – Vol. 14. DOI:10.3390/su14031357.
29. Jiang, L. Analyses of Aerosol Concentrations and Bacterial Community Structures for Closed Cage Broiler Houses at Different Broiler Growth Stages in Winter / L. Jiang, J. Zhang, J. Tang [et al.] // J. Food Prot. – 2018. – Vol. 81. – № 9. – P.1557–1564. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-524.
30. Chen, G. Aerosol Concentrations and Fungal Communities Within Broiler Houses in Different Broiler Growth Stages in Summer / G. Chen, D. Ma, Q. Huang [et al.] // Front Vet Sci. – 2021. – Vol. 13. – № 8. DOI: 10.3389/fvets.2021.775502.
31. Hill, T.M. Comparisons of housing, bedding, and cooling options for dairy calves / T.M. Hill, H.G. Bateman, J.M. Aldrich, R.L. Schlotterbeck // J. Dairy Sci. – 2011. – Vol. 94. – № 4. – P. 2138–2146. DOI: 10.3168/jds.2010-3841.
32. Godden, S. Ability of organic and inorganic bedding materials to promote growth of environmental bacteria / S. Godden, R. Bey, K. Lorch [et al.] // J. Dairy Sci. – 2008. – Vol. 91. – № 1. – P.151–159. DOI: 10.3168/jds.2007-0415.
33. Bradley, A.J. The impact of dairy cows' bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk - A cross sectional study of UK farms / A.J. Bradley, K.A. Leach, M.J. Green [et al.] // Int J. Food Microbiol. – 2018. Vol. 269. – P. 36–45. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.022.
34. Robles, I. Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality / I. Robles, D.F. Kelton, H.W. Barkema [et al.] // Animal. – 2020. – Vol. 14. – № 5. – P. 1052–1066. DOI: 10.1017/S1751731119002787.
35. Lejeune, J.T. Effect of sand and sawdust bedding materials on the fecal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cows / J.T. Lejeune, M.D. Kauffman // Appl. Environ Microbiol. – 2005. – Vol. 71. № 1. P.326–330. DOI: 10.1128/AEM.71.1.326-330.2005.

36. Bell, J. Survival of bovine digital dermatitis treponemes in conditions relevant to the host and farm environment / J. Bell, H.E. Crosby-Durrani, R.W. Blowey [et al.] // *Anaerobe*. – 2023. – Vol. 82. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2023.102766.
37. Pilch, H. Survival of bovine-associated serotypes of *Salmonella enterica* in bedding sand / H. Pilch, N. Aulik, D. Sockett, C.J. Czuprynski // *JDS Commun*. – 2022. – Vol. 4. – № 2. – P.86–90. DOI: 10.3168/jdsc.2022-0305.
38. Leach, K.A. Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms / K.A. Leach, S.C. Archer, J.E. Breen [et al.] // *Vet J*. – 2015. – Vol. 206. – № 2. – P. 123-130. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.08.013.
39. Zhou, J.Y. Dung treated by high-temperature composting is an optimal bedding material for suckling calves according to analyses of microbial composition, growth performance, health status, and behavior / J.Y. Zhou, H.M. Zhong, Z.G. An [et al.] // *J. Dairy Sci*. – 2023. – Vol. 106. – № 7. – P. 4785–4798. DOI: 10.3168/jds.2022-22485.
40. Jeppsson, K.H. Comparisons of recycled manure solids and wood shavings/sawdust as bedding material-Implications for animal welfare, herd health, milk quality, and bedding costs in Swedish dairy herds / K.H. Jeppsson, M. Magnusson, S. Bergström Nilsson [et al.] // *J. Dairy Sci*. – 2024. – Vol. 107. – № 8. – P. 5779–5793. DOI: 10.3168/jds.2023-24192.
41. Beauchemin, J. Comparison of microbiota of recycled manure solids and straw bedding used in dairy farms in eastern Canada / J. Beauchemin, A. Fréchette, W. Thériault [et al.] // *J. Dairy Sci*. – 2022. – Vol. 105. – № 1. – P. 389–408. DOI: 10.3168/jds.2021-20523.
42. Wang L. Intestinal Microbiota of Broiler Chickens As Affected by Litter Management Regimens / L. Wang, M. Lilburn, Z. Yu // *Front Microbiol*. – 2016. – Vol. 7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00593.
43. Kubasova, T. Succession, Replacement, and Modification of Chicken Litter Microbiota / T. Kubasova, M. Faldynova, M. Crhanova [et al.] // *Appl Environ Microbiol*. – 2022. – Vol. 88. DOI: 10.1128/aem.01809-22.
44. Patel, K. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds / K. Patel, S.M. Godden, E. Royster [et al.] // *J. Dairy Sci*. – 2019. – Vol. 102. – P. 10213–10234. DOI: 10.3168/jds.2019-16692.
45. Ray, T. The microbiome of common bedding materials before and after use on commercial dairy farms / T. Ray, T.N. Gaire, C.J. Dean [et al.] // *Anim microbiome*. – 2022. – Vol. 4. – №. 18. DOI:10.1186/s42523-022-00171-2.

46. Torok, V.A. Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens / V.A. Torok, R.J. Hughes, K. Ophel-Keller [et al.] // *Poult Sci.* – 2009. – Vol. 88. – № 12. – P. 2474–2481. DOI: 10.3382/ps.2008-00381.
47. Khattak, F. Re-used litter impacts on post-hatch broiler performance, litter quality and caecal morphology / F. Khattak, G. Kanbur, J. Houdijk // *Br Poult Abstr.* – 2019. – Vol. 15. – P. 40–41.
48. Zhao, X. Effects of Atmospheric Ammonia on Skeletal Muscle Growth in Broilers / X. Zhao, G. Wang, H. Han [et al.] // *Animals (Basel)*. – 2023. – Vol. 13. – № 12. DOI: 10.3390/ani13121926.
49. Han, H. Effects of Ammonia on Gut Microbiota and Growth Performance of Broiler Chickens / H. Han, Y. Zhou, Q. Liu [et al.] // *Animals (Basel)*. – 2021. – Vol. 11. – № 6. DOI: 10.3390/ani11061716.
50. Miles, D.M. Atmospheric ammonia is detrimental to the performance of modern commercial broilers / D.M. Miles, S.L. Branton, B.D. Lott // *Poult Sci.* – 2004. – Vol. 83. – № 10. – P. 1650–1654. DOI: 10.1093/ps/83.10.1650.
51. Murphy, S.I. Bedding and bedding management practices are associated with mesophilic and thermophilic spore levels in bulk tank raw milk / S.I. Murphy, D. Kent, N.H. Martin [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2019. – Vol. 102. – № 8. – P. 6885–6900. DOI: 10.3168/jds.2018-16022.
52. Hong, P.Y. Monitoring airborne biotic contaminants in the indoor environment of pig and poultry confinement buildings / P.Y. Hong, X. Li, X. Yang [et al.] // *Environ Microbiol.* – 2012. – Vol. 14. – № 6. – P. 1420–1431. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02726.x.
53. Dai, P. PM_{2.5} from a broiler breeding production system: The characteristics and microbial community analysis / P. Dai, D. Shen, Q. Tang [et al.] // *Environ. Pollut.* – 2020. – Vol. 256.
54. Guo, Y. Analysis of microbial aerosols diversity in cattle farms in Ningxia / Y. Guo, Y. Mao, S. Zhao [et al.] // *Front Vet Sci.* – 2025. – Vol. 12. DOI: 10.3389/fvets.2025.1542971.
55. Blais Lecours, P. Characterization of bioaerosols from dairy barns: reconstructing the puzzle of occupational respiratory diseases by using molecular approaches / P. Blais Lecours, M. Veillette, D. Marsolais, C. Duchaine // *Appl Environ Microbiol.* – 2012. – Vol. 78. – № 9. – P. 3242–3248. DOI: 10.1128/AEM.07661-11.

56. Zhang, Q. Third-generation sequencing reveals the spatial variation of microbial composition of airborne bacteria in an intensive dairy farm / Q. Zhang, L. Ding, X. Xie [et al.] // *Front Microbiol.* – 2025. – Vol. 16. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1688472.
57. Schaeffer, J.W. Size, Composition, and Source Profiles of Inhalable Bioaerosols from Colorado Dairies / J.W. Schaeffer, S. Reynolds, S. Magzamen [et al.] // *Environ Sci Technol.* – 2017. – Vol. 51. – № 11. – P. 6430–6440. DOI: 10.1021/acs.est.7b00882.
58. Szulc, J. Assessment of Microbiological Indoor Air quality in cattle breeding farms / J. Szulc, M. Okrasa, K. Dybka-Stępień [et al.] // *Aerosol Air Qual. Res.* – 2020. – Vol. 20. – P.1353–1373.
59. Поломошнова, И. А. Борьба с микробной загрязненностью в птичнике / И. А. Поломошнова // *Вестник Донского государственного аграрного университета.* – 2015. – № 2-1(16). – С. 14-20.
60. Law, K. Disinfection of Maternal Environments Is Associated with Piglet Microbiome Composition from Birth to Weaning / K. Law, B. Lozinski, I. Torres [et al.] // *mSphere.* – 2021. – Vol. 6. – № 5. DOI: 10.1128/mSphere.00663-21.
61. Chen, X. Co-occurrence of early gut colonization in neonatal piglets with microbiota in the maternal and surrounding delivery environments / X. Chen, J. Xu, E. Ren [et al.] // *Anaerobe.* – 2018. – Vol. 49. – P. 30–40. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2017.12.002.
62. Rowe, S.M. Cross-sectional study of the relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, and intramammary infection in late-lactation dairy cows / S.M. Rowe, S.M. Godden, E. Royster [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2019. – Vol. 102. – №. 12. – P. 11384–11400. DOI: 10.3168/jds.2019-17074.
63. Fréchette, A. Clinical Mastitis Incidence in Dairy Cows Housed on Recycled Manure Solids Bedding: A Canadian Cohort Study / A. Fréchette, G. Fecteau, C. Côté, S. Dufour // *Front Vet Sci.* – 2021. – Vol. 8. DOI: 10.3389/fvets.2021.742868.
64. Fréchette, A. Association Between Recycled Manure Solids Bedding and Subclinical Mastitis Incidence: A Canadian Cohort Study / A. Fréchette, G. Fecteau, C. Côté, S. Dufour // *Front. Vet.* – 2022. – Vol. 9. DOI: 10.3389/fvets.2022.859858.
65. Lou, C. Exploring the Microbial Community Structure in the Chicken House Environment by Metagenomic Analysis / C. Lou, Z. Chen, Y. Bai [et al.] // *Animals.* – 2024. – Vol. 14. – № 55. DOI: 10.3390/ani14010055.

66. Zhang, J. PM_{2.5} Synergizes With *Pseudomonas aeruginosa* to Suppress Alveolar Macrophage Function in Mice Through the mTOR Pathway / J. Zhang, C. Liu, G. Zhao [et al.] // Front Pharmacol. – 2022. – Vol. 13. DOI: 10.3389/fphar.2022.924242.
67. Yang, L. The Impact of PM_{2.5} on the Host Defense of Respiratory System / L. Yang, C. Li, X. Tang // Front Cell Dev Biol. – 2020. – Vol. 8. DOI: 10.3389/fcell.2020.00091.
68. Amador, P. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae* on Portuguese Livestock Manure / P. Amador, R. Fernandes, C. Prudêncio, I. Duarte // Antibiotics (Basel). – 2019. – Vol. 8. – № 1. DOI: 10.3390/antibiotics8010023.
69. He, Y. Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment / Y. He, Q. Yuan, J. Mathieu [et al.] // npj Clean Water. – 2020. – Vol. 3. – № 4. DOI: 10.1038/s41545-020-0051-0.
70. You, Y. Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion / Y. You, E.K. Silbergeld // Front Microbiol. – 2014. – Vol. 5. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00284.
71. Yang, Q. Influence of Chicken Manure Fertilization on Antibiotic-Resistant Bacteria in Soil and the Endophytic Bacteria of Pakchoi / Q. Yang, H. Zhang, Y. Guo, T. Tian // Int J Environ Res Public Health. – 2016. – Vol. 13. – № 7. DOI: 10.3390/ijerph13070662.
72. McEachran, A.D. Antibiotics, bacteria, and antibiotic resistance genes: aerial transport from cattle feed yards via particulate matter / McEachran A.D., Blackwell B.R., Hanson J.D. [et al.] // Environ Health Perspect. – 2015. – Vol. 123. – № 4. – P. 337–343. DOI: 10.1289/ehp.1408555.
73. РД-АПК 3.10.07.05-17 Ветеринарно-санитарные требования при проектировании, строительстве, реконструкции и эксплуатации животноводческих помещений: утв. Министерством сельского хозяйства Российской Федерации: дата введения: 2017-05-23 / разработан МГАВМ и Б - МВА им. К.И. Скрябина, НПЦ «Гипронисельхоз», ВНИИВСГЭ. – Москва: ФГБНУ «Росинформагротех», 2017 – 88 с.
74. Правила проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного ветеринарного надзора: утв. Министерством сельского хозяйства Российской Федерации от 15.07.2002 г. №13-5-2/0525. – Москва, 2002. – 71 с.
75. Попов, Н.И. Дезинфекция: роль, значение и назначение при инфекционной патологии свиней / Н.И. Попов // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2012. – № 4 (8). – С. 79–86.

76. Попов, Н. И. Дезинфекция как ключевой элемент профилактики и ликвидации инфекционных болезней животных / Н.И. Попов, Г.Ш. Щербакова // Дезинфектология. – 2025. – Т. 1. – № 1. – С. 15–25. DOI 10.47470/dez004.
77. Палий, А.П. Дезинфицирующие средства в системе противозoonотических мероприятий / А.П. Палий, А.П. Палий, Е.А. Родионова // Известия Великолукской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. – № 2. – С. 24–33.
78. Давыдова, А.Д. Дезинфекция и современные дезинфицирующие средства в ветеринарии / А.Д. Давыдова, А.Д. Алексеев // Молодежь и наука. – 2017. – № 3. – С. 13.
79. Довлатов, И.М. Методы обеззараживания помещений для содержания птицы / И.М. Довлатов, С.А. Качан // Инновации в сельском хозяйстве. – 2018. – № 1 (26). – С. 15–21.
80. McDonnell, G. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance / G. McDonnell, A.D. Russell // Clin. Microbiol Rev. – 1999. – Vol. 12. – № 1. – P. 147–179. DOI: 10.1128/CMR.12.1.147.
81. Каменская, Т.Н. Дезинфекционные мероприятия в условиях интенсивного животноводства / Т.Н. Каменская, Л.Л. Кривенко, С.А. Лукьянчик, О.В. Хендогина // Экология и животный мир. – 2021. – № 1. – С. 45–49. DOI: 10.47612/2224-1647-2021-1-45-49.
82. Лискова, Е.А. Профилактика актиномицетных инфекций у телят / Е.А. Лискова, К.Н. Силина, А.А. Блохин // Вестник алтайского государственного аграрного университета. Направления и перспективы исследований в области дезинфекции. – 2017. – № 6 (152). – С. 144–149.
83. Ohashi, I. Disinfectant resistance of *Salmonella* in in vitro contaminated poultry house models and investigation of efficient disinfection methods using these models / I. Ohashi, S. Kobayashi, Y. Tamamura-Andoh [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2022. – Vol. 84. – № 12. – P. 1633–1644. DOI: 10.1292/jvms.22-0311.
84. Mulder, I. Quaternary ammonium compounds in soil: implications for antibiotic resistance development / I. Mulder, J. Siemens, V. Sentek [et al.] // Rev Environ Sci Biotechnol. – 2018. – Vol. 17. – P. 159–185. DOI: 10.1007/s11157-017-9457-7.
85. Gutiérrez, D. Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry / D. Gutiérrez, L. Rodríguez-Rubio, B. Martínez [et al.] // Front Microbiol. – 2016. – Vol. 7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00825.

86. Caselli, E. Impact of a probiotic-based hospital sanitation on antimicrobial resistance and HAI-associated antimicrobial consumption and costs: a multicenter study / E. Caselli, L. Arnoldo, C. Rognoni [et al.] // *Infect Drug Resist.* – 2019. – Vol. 12. – P. 501–510. DOI: 10.2147/IDR.S194670.
87. Połaska, M. Bacteriophages-a new hope or a huge problem in the food industry / M. Połaska, B. Sokołowska // *AIMS Microbiol.* – 2019. – Vol. 5. – № 4. – P. 324–346. DOI: 10.3934/microbiol.2019.4.324.
88. Abbas, R.Z. Role of Bacteriophages for Optimized Health and Production of Poultry / R.Z. Abbas, A.F. Alsayeqh, A.I. Aqib // *Animals (Basel)*. – 2022. – Vol. 12. – № 23. DOI: 10.3390/ani12233378.
89. Azam, A.H. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy / A.H. Azam, Y. Tanji // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2019 – Vol. 103. – P. 2121–2131. DOI: 10.1007/s00253-019-09629-x.
90. Al-Marzooq, F. Can probiotic cleaning solutions replace chemical disinfectants in dental clinics? / F. Al-Marzooq, S.A. Bayat, F. Sayyar // *Eur J. Dent.* – 2018. – Vol. 12. – № 4. – P.532–539. DOI: 10.4103/ejd.ejd_124_18.
91. Stone, W. Disinfectant, Soap or Probiotic Cleaning? Surface Microbiome Diversity and Biofilm Competitive Exclusion / W. Stone, J. Tolmay, K. Tucker, G.M. Wolfaardt // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – № 11. DOI: 10.3390/microorganisms8111726.
92. Piewngam, P. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference / P. Piewngam, Y. Zheng, T.H. Nguyen [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 562. – P. 532–537. DOI: 10.1038/s41586-018-0616-y.
93. Caselli, E. Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation / E. Caselli, M. D'Accolti, A. Vandini [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – №. 2. DOI: 10.1371/journal.pone.0148857.
94. Guéneau, V. 3D imaging-driven assembly of multispecies biofilms with antagonistic activity against undesirable bacteria / V. Guéneau, L. Guillier, C. Berdous [et al.] // *ISME Commun.* – 2025. – Vol. 5. – № 1. DOI: 10.1093/ismeco/ycaf156.

95. Wales, A.D. Disinfectant testing for veterinary and agricultural applications: A review / A.D. Wales, R.J. Gosling, H.L. Bare [et al.] // *Zoonoses Public Health*. – 2021. – Vol. 68(5). – P. 361–375. DOI: 10.1111/zph.12830.
96. Zhumakayeva, A. Efficiency of probiotic culture consortium application for disinfection of dairy farm premises and prevention of mastitis in cows / A. Zhumakayeva, A. Zhubatkanova, Z. Asauova [et al.] // *J. Adv Vet Anim Res*. – 2023. – Vol. 10. – № 2. – P. 185–195. DOI: 10.5455/javar.2023.j668.
97. Cruz Mendoza, I. Biosurfactant from *Bacillus subtilis* DS03: Properties and Application in Cleaning Out Place System in a Pilot Sausages Processing / I. Cruz Mendoza, M. Villavicencio-Vasquez, P. Aguayo [et al.] // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10. – № 8. DOI: 10.3390/microorganisms10081518.
98. D'Accolti, M. Shaping the subway microbiome through probiotic-based sanitation during the COVID-19 emergency: a pre-post case-control study / M. D'Accolti, I. Soffritti, F. Bini [et al.] // *Microbiome*. – 2023. – Vol. 11. – № 1. DOI: 10.1186/s40168-023-01512-2.
99. Ильякова, А.В. Возможность использования спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в производстве дезинфектантов / А.В. Ильякова, Н.В. Шестопапов, Л.С. Федорова, А.С. Белова // *Гигиена и санитария*. – 2020. – Т. 99. – № 5. – С. 436–442. DOI: 10.33029/0016-9900-2020-99-5-436-442.
100. Афиногенова, А.Г. Пробиотические чистящие средства для поверхностей как возможная альтернатива традиционным дезинфектантам / А.Г. Афиногенова, Л.А. Краева, Г.Е. Афиногенов, В.В. Веретенников // *Инфекция и иммунитет*. – 2017. – Т. 7. – №4. – С. 419–424. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-4-419-424.
101. Eric, R. Effect of a Beneficial Flora Colonization of Pen Surfaces on Health of Weanling Piglets / R. Eric, P.G. Julia, Ch. Eric, De.L.O. Fernando Bravo // *International Journal of Veterinary Science and Research*. – 2024. – Vol. 10. – № 3. – P. 063–069. DOI: 10.17352/ijvsr.000150.
102. Gottel, N.R. Biocontrol in built environments to reduce pathogen exposure and infection risk / N.R. Gottel, M.S. Hill, M.J. Neal [et al.] // *ISME J*. – 2024. – Vol. 18. – № 1. DOI: 10.1093/ismejo/wrad024.
103. Fijan, S. A critical assessment of microbial-based antimicrobial sanitizing of inanimate surfaces in healthcare settings / S. Fijan, P. Kürti, U. Rozman, S. Šostar Turk // *Front Microbiol*. – 2024. – Vol. 15. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1412269.

104. Boesenberg, D. Risk analysis approaches for microbial ingredients in microbial-based cleaning products / D. Boesenberg, C. Brueck, C. Chhuon [et al.] // Risk Anal. – 2025. – Vol. 45. – № 7. – P. 1957–1970. DOI: 10.1111/risa.17707.
105. Spök, A. Status of microbial based cleaning products in statutory regulations and ecolabelling in Europe, the USA, and Canada / A. Spök, G. Arvanitakis, G. McClung // Food and Chemical Toxicology. – 2018. – Vol. 116. – P. 10–19.
106. Duniere, L. Conditioner application improves bedding quality and bacterial composition with potential beneficial impacts for dairy cow's health / L Duniere, B. Frayssinet, C. Achard [et al.] // Microbiol Spectr. – 2024. – Vol. 12. – № 4. DOI: 10.1128/spectrum.04263-23.
107. Dewi, G. *Lactobacillus* in Food Animal Production-A Forerunner for Clean Label Prospects in Animal-Derived Products / G. Dewi, A. Kollanoor Johny // Front. Sustain. Food Syst. – 2022. – Vol. 6. DOI: 10.3389/fsufs.2022.831195.
108. D'Accolti, M. Tackling transmission of infectious diseases: A probiotic-based system as a remedy for the spread of pathogenic and resistant microbes / M. D'Accolti, I. Soffritti, F. Bini [et al.] // Microb. Biotechnol. – 2024. – Vol. 17. – № 7. DOI: 10.1111/1751-7915.14529.
109. Temmerman R. Probiotics In Progress – The PIP principle. 2006. URL: <http://www.arthurscourtmotorlodge.co.nz/uploads/images/Probiotic%20Cleaning%20Products%20Info.pdf> (дата обращения: 27.02.2026).
110. Bazzoli, A. Improvement of microbial ecosystem in livestock animal environment: concept of positive biofilm using an example in swine farrowing / A. Bazzoli, J. Plateau, A. Turney // Aust Vet J. – 2019. – Vol. 97. – № 9. DOI: 10.1111/avj.12808.
111. Российская Федерация. Законы. Об органической продукции и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации: Федеральный закон № 280-ФЗ: [принят Государственной думой 25 июля 2018 года: одобрен Советом Федерации 28 июля 2018 года]. – Москва: Кремль. – 2018. – 15 с.
112. Указ Президента Российской Федерации. О стратегии научно-технологического развития российской федерации: Указ № 145 от 28 февраля 2024 года. URL: <http://www.kremlin.ru/acts/bank/50358> (дата обращения 13.01.2026).
113. Овсянников, А.И. Основы опытного дела в животноводстве. – М.: Колос, 1976. – 185 с.

114. Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов. Каталог микроорганизмов. URL: <https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov/show25319/> (дата обращения 21.04.2019).

115. Гайнутдинов, Т. Р. Экспериментальный подбор доз ионизирующего излучения, вызывающих ингибирование роста и полную инактивацию золотистого стафилококка / Т. Р. Гайнутдинов // Ветеринарный врач. – 2020. – № 4. – С. 4–8. DOI 10.33632/1998-698X.2020-4-4-8.

116. Малкова, А.В. Изучение антагонистической активности бацилл по отношению к плесням, поражающим семена при хранении / А.В. Малкова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова, А.Н. Иркитова // Агробιοтехнология-2021: сборник статей международной научной конференции, Москва, 24–25 ноября 2021 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2021. – С. 525–530.

117. ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе: изд. офиц.: утв. и введ. в действие Государственный комитет СССР по стандартам (протокол от 17 января 1984 г.): введен впервые: дата введ. 1985-07-01 – М.: Стандартиформ. – 2010. – 18 с.

118. Евдокимов, И.Ю. Выбор оптимальной питательной среды для глубинного культивирования природных штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250 / И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова, М.В. Ширманов [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2023. – Т. 19. – № 3. – С. 54–63.

119. Карташов, М.А. Разработка сухого бактериального препарата для силосования с оптимальным соотношением молочнокислых и пропионовокислых культур / М.А. Карташов, Т.М. Воинова, А.В. Сергеева [и др.] // Ukrainian Journal of Ecology. – 2016 – Vol. 6. – № 3. – P. 219–228.

120. Georgescu, M. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers / M. Georgescu, I. Gheorghe, C. Curutiu [et al.] // BMC Infect Dis. – 2016. – Vol. 16. DOI: 10.1186/s12879-016-1396-3.

121. Брачихина, М. А. Влияние углеводов на протеолитическую активность штаммов *Lactococcus lactis* / М. А. Брачихина, С. А. Рябцева // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2012. – № 4(20). – С. 47–54.
122. Орлова, Т.Н. Влияние экстракта одуванчика на физико-химические и микробиологические показатели пробиотического штамма *L. acidophilus* для создания синбиотика для сельскохозяйственных животных / Т.Н. Орлова, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник, А.В. Гребенщикова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2019. – № 12(182). – С. 118–121.
123. Евдокимова, К.В. Изучение влияния биостимуляторов на активность бактериальных и грибных гидролаз / К.В. Евдокимова, Я.А. Слащенина, Г.Г. Тумайкин [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2017. – Т. 79, № 4(74). – С. 204–209. DOI 10.20914/2310-1202-2017-4-204-209.
124. Govindaraj, V. Marine *Bacillus haynesii* chitinase: Purification, characterization and antifungal potential for sustainable chitin bioconversion / V. Govindaraj, S.K. Kim, R. Raval, K. Raval // Carbohydr Res. – 2024. – Vol. 541. DOI: 10.1016/j.carres.2024.109170.
125. Литусов, Н.В. Частная бактериология. Электронное иллюстрированное учебное издание. – Екатеринбург: УГМУ, 2017. – 707 с.
126. ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов: изд. офиц.: утв. и введ. в действие Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 25.12.91 № 2117: переиздание: дата введ. 1993-01-01 / разработ. Всесоюзным научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности (ВНИИКОП) Техническим комитетом по стандартизации 93 «Продукты переработки плодов и овощей», 1993. – М.: Стандартиформ, 2008. – 8 с.
127. ГОСТ Р 56139-2014 Продукты пищевые функциональные. Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов: изд. офиц.: утв. и введ. в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 сентября 2014 г. № 1173-ст: введен впервые: дата введ. 2016-01-01 / разработан коллективом специалистов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт питания» (ФГБНУ «НИИ питания»), 2014 – М.: Стандартиформ, 2015. – 36 с.

128. Иркитова, А.Н. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий / А.Н. Иркитова, Я.Р. Каган, Г.Г. Соколова // Известия Алтайского государственного университета. – 2012. – № 3–1(75). – С. 41–44.
129. Yuan, H. Biocontrol activity of *Bacillus halotolerans* strain PI7 against *Botryosphaeria dothidea* causing apple postharvest decay and potential mechanisms / H. Yuan, M. Yuan, B. Shi [et al.] // Front. Microbiol. – 2023. – Vol. 13. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1058167.
130. Kushwaha, P. Plant growth promoting and antifungal activity in endophytic *Bacillus* strains from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) / P. Kushwaha, P.L. Kashyap, A.K. Srivastava, R.K. Tiwari // Braz. J. Microbiol. – 2020. – Vol. 51. – № 1. – P. 229–241. DOI: 10.1007/s42770-019-00172-5.
131. Терегулова, Г.А. Оценка хитинолитической и антибиотической активности актиномицетов *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 / Г.А. Терегулова, О.Н. Синева, Н.Н. Маркелова [и др.] // Почвоведение. – 2023. – № 5. – С. 594–602. DOI: 10.31857/S0032180X22601207.
132. Sohail, R. Microbial Biosurfactant Screening: Diversity in Assessment Methods / R. Sohail, J. Nazia // Advancements of Microbiology. – 2023. – Vol. 62. – P. 145–155. DOI: 10.2478/am-2023-0013.
133. Борщевская, Л.Н. Спектрофотометрическое определение молочной кислоты / Л.Н. Борщевская, Т.Л. Гордеева, А.Н. Калинина, С.П. Синеокий // Журнал аналитической химии. – 2016. – Т. 71 – № 8. – С. 787–790. DOI: 10.7868/S004445021608003X.
134. De Vos, P. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 3 / P. De Vos, G. Garrity, D. Jones et al. – New York.: Springer – 2009. – 1422 p.
135. Basov, N.V. Global LC-MS/MS targeted metabolomics using a combination of HILIC and RP LC separation modes on an organic monolithic column based on 1-vinyl-1,2,4-triazole / N.V. Basov, A.D. Rogachev, M.A. Aleshkova [et al.] // Talanta. – 2024. – Vol. 267. – P. 125168. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.125168.
136. Patrushev, Yu.V. A monolithic column with a sorbent based on 1-vinyl-1,2,4-triazole for hydrophilic HPLC / Yu.V. Patrushev, Yu.S. Sotnikova, V.N. Sidel'nikov // Prot.

Met. Phys. Chem. Surf. –2020. – Vol. 56. – № 1. – P. 49–53. DOI: 10.1134/s2070205119060248.

137. Бороздина, И.Б. Сравнительная характеристика бактерий рода *Bacillus* семейства Берёзовые (*Betulaceae*) при культивировании на искусственных питательных средах // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 2. – С. 43–48.

138. Маринин, Л.И. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы / Л.И. Маринин, И.А. Дятлов, А.Н. Мокриевич – М.: Династия, 2021. – 240 с.

139. Журавлёв, П.В. Ферменты патогенности у бактерий, выделенных из воды открытых водоёмов / П.В. Журавлёв, В.В. Алешня, О.П. Панасовец // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. – № 1 (298). – С. 11–14.

140. Anisimova, E. Alarming Antibiotic Resistance of Lactobacilli Isolated from Probiotic Preparations and Dietary Supplements / E. Anisimova, I. Gorokhova, G. Karimullina, D. Yarullina // Antibiotics (Basel). – 2022. – Vol. 11. – № 11. DOI: 10.3390/antibiotics11111557.

141. Sharma, P. Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* sp. Isolated from Commercial Probiotic Preparations / P. Sharma, S.K. Tomar, V. Sangwan [et al.] // J. Food Saf. – 2016. – Vol. 36. – P. 38–51. DOI: 10.1111/jfs.12211.

142. Charteris, W.P. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species / W.P. Charteris, P.M. Kelly, L. Morelli, J.K. Collins // J. Food Prot. – 1998. – Vol. 61. – № 12. – P. 1636–1643. DOI: 10.4315/0362-028x-61.12.1636.

143. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, Approved Standard – 30 ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

144. Меры ЕС по защите животных, используемых в научных целях. URL: https://environment.ec.europa.eu/topics/chemicals/animals-science_en (дата обращения: 13.09.2024).

145. ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами: изд. офиц.: утв. и введ. в действие Межгосударственным советом по стандартизации,

метрологии и сертификации (протокол от 22 декабря 2014 г. N 73-П): введен впервые: дата введ. 2016-07-01 / разработан Некоммерческим партнерством «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными» (Rus-LASA), 2014 – М.: Стандартиформ. – 2019. – 17 с.

146. Р 4.2.2643-10 Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство: изд. офиц.: утв. Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю.Поповой 18 декабря 2020 г. / разработан ФБУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 615 с.

147. Куренинова, Т.В. Влияние выпаивания метабиотической кормовой добавки на рост телят / Т.В. Куренинова, И.А. Пушкарев, В.А. Мартынов [и др.] // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2025. – № 4. – С. 187–196. DOI: 10.31677/2072-6724-2025-77-4-187-196.

148. Дудник, Д.Е. Отбор штаммов *Bacillus* spp. Для создания биологического препарата для животноводства / Д.Е. Дудник, А.Н. Малкова, Е.Н. Каргашилова // Актуальная биотехнология. – 2023. – № 1. – С. 16-18. DOI: 10.20914/2304-4691-2023-1-16-18.

149. Дудник, Д.Е. Выделение и идентификация ризосферных штаммов *Bacillus* sp / Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова // Труды молодых ученых Алтайского государственного университета. – 2019. – № 16. – С. 6–9.

150. Дудник, Д.Е. Применение тест-систем для идентификации и изучения природных штаммов *Bacillus* sp / Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова // Пища. Экология. Качество: Сборник материалов XVI Международной научно-практической конференции, Барнаул, 24–26 июня 2019 года / Ответственные за выпуск: О.К. Мотовилов, О.А. Высоцкая, К.Н. Нициевская, Л.П. Хлебова. Том 1. – Барнаул: Алтайский государственный университет, 2019. – С. 243–246.

151. Gordon, V. From molecules to multispecies ecosystems: the roles of structure in bacterial biofilms / V. Gordon, L. Bakhtiari, K. Kovach // *Phys Biol.* – 2019. – Vol. 16. – № 4. DOI: 10.1088/1478-3975/ab1384.
152. Lin, Y. Adaptation and phenotypic diversification of *Bacillus thuringiensis* biofilm are accompanied by fuzzy spreader morphotypes / Y. Lin, X. Xu, G. Maróti [et al.] // *NPJ Biofilms Microbiomes.* – 2022. – Vol. 8. – № 1. DOI: 10.1038/s41522-022-00292-1.
153. Bridier, A. The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging / A. Bridier, D. Le Coq, F. Dubois-Brissonnet [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – № 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0016177.
154. Kharkhota, M. Chromogenicity of aerobic spore-forming bacteria of the *Bacillaceae* family isolated from different ecological niches and physiographic zones / M. Kharkhota, H. Hrabova, M. Kharchuk [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* – 2022. – Vol. 53. – № 3. – P. 1395–1408. DOI: 10.1007/s42770-022-00755-9.
155. Soni, N. Carotenoid from marine *Bacillus infantis*: production, extraction, partial characterization, and its biological activity / N. Soni, P. Dhandhukia, J.N. Thakker // *Arch Microbiol.* – 2023. – Vol. 205. № 5. DOI: 10.1007/s00203-023-03505-z.
156. Khaneja, R. Carotenoids found in *Bacillus* / R. Khaneja, L. Perez-Fons, S. Fakhry [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* – 2010. – Vol. 108. – № 6. – P.1889–1902. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x.
157. Гайрабеков, Р.Х. Некоторые особенности эпизоотического процесса при энтеробактериозах мелкого рогатого скота на территории Чеченской Республики / Р.Х. Гайрабеков, Р.Х.Гайрабекова, Я.А. Гайсумов [и др.] // *Рефлексия.* – 2019. – № 4. – С. 6–12.
158. Конищева, А.С. Микробиологический спектр возбудителей при желудочно-кишечной патологии у животных / А.С. Конищева, Н.А. Лещева, В.И. Плешакова // *Вестник КрасГАУ.* – 2022. – № 2(179). – С. 106–112. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-2-106-112.
159. Курятова, Е.В. Этиология возникновения гастроэнтеритов молодняка сельскохозяйственных животных в условиях Амурской области / Е.В. Курятова, М.В. Герасимова, Ю.А. Гаврилов, Г.А. Гаврилова // *Дальневосточный аграрный вестник.* – 2018. – № 1(45). – С. 60–66. DOI: 10.24411/1999-6837-2018-11010.

160. Milanov, D. Common Aetiological Agent of Bovine Mastitis: *Serratia marcescens* / D. Milanov, B. Prunić, S. Košarčić, Potkonjak A. Potkonjak // Arch. Vet. Med. – 2012. – Vol. 5. – P. 3–17. DOI: 10.46784/e-avm.v5i1.157.
161. Köck, R. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review / R. Köck, I. Daniels-Haardt, K. Becker [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2018. – Vol. 24. – № 12. – P. 1241–1250. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.04.004.
162. Nannan, C. Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: gene prevalence versus antagonistic activity against Gram-negative foodborne pathogens / C. Nannan, H.Q. Vu, A. Gillis [et al.] // J. Biotechnol. – 2021. – Vol. 327. – P. 28–35. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.12.017.
163. Tran, C. Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and Their Mode of Action / C. Tran, I.E. Cock, X. Chen, Y. Feng // Antibiotics (Basel). – 2022. – Vol. 11. – № 1. DOI: 10.3390/antibiotics11010088.
164. Sumi, C.D. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics / C.D. Sumi, B.W. Yang, I.C. Yeo, Y.T. Hahm // Can J. Microbiol. – 2015. – Vol. 61. – № 2. – P. 93–103. DOI: 10.1139/cjm-2014-0613.
165. Islam, T. Biosynthesis, Molecular Regulation, and Application of Bacilysin Produced by *Bacillus* Species / T. Islam, M.F. Rabbee, J. Choi, K.H. Baek // Metabolites. – 2022. – Vol. 12. – № 5. DOI: 10.3390/metabo12050397.
166. Caulier, S. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group / S. Caulier, C. Nannan, A. Gillis [et al.] // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00302.
167. Kiesewalter, H.T. Genomic and Chemical Diversity of *Bacillus subtilis* Secondary Metabolites against Plant Pathogenic Fungi / H.T. Kiesewalter, C.N. Lozano-Andrade, M. Wibowo [et al.] // mSystems. – 2021. – Vol. 6. – № 1. DOI: 10.1128/mSystems.00770-20.
168. Steinke, K. Phylogenetic Distribution of Secondary Metabolites in the *Bacillus subtilis* Species Complex / K. Steinke, O.S. Mohite, T. Weber, Á.T. Kovács // mSystems. – 2021. – Vol. 6. – № 2. DOI: 10.1128/mSystems.00057-21.
169. Балбуцкая, А.А. Видовое разнообразие представителей рода *Staphylococcus*, выделенных от домашних и сельскохозяйственных животных с различными гнойно-

воспалительными заболеваниями / А.А. Балбуцкая, О.А. Дмитренко, А.В. Войтенко, В.Н. Скворцов // Международный вестник ветеринарии. – 2015. – № 3. – С. 56–62.

170. Авдуевская, Н.Н. Сравнительный анализ видового состава и количественное соотношение микрофлоры при субклиническом и клиническом мастите коров / Н.Н. Авдуевская, А.В. Капустин, А.В. Горбатов, Е.В. Иванов // Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11. – № 4. – С. 296–302. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-4-296-302.

171. Гагарин, Е.М. Микробные сообщества крупного рогатого скота, заселяющие язвенные поверхности Мортелларо и Рустергольца / Е.М. Гагарин, Л.А. Глазунова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2023. – № 6(104). – С. 283–290.

172. Балбуцкая, Л.Л. Антибиотикочувствительность стафилококков, изолированных от кроликов / Л.Л. Балбуцкая, В.Н. Скворцов, Н.С. Хохлова, С.С. Белимова // Международный вестник ветеринарии. – 2018. – № 3. – С. 68–72.

173. Song, M. *Staphylococcus aureus* and biofilms: transmission, threats, and promising strategies in animal husbandry / M. Song, Q. Tang, Y. Ding [et al.] // J Animal Sci Biotechnol. – 2024. – Vol. 15. – № 44. DOI: 10.1186/s40104-024-01007-6.

174. Wang, P. Transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between animals, environment, and humans in the farm / Wang, P. Zhang, J. Wu [et al.] // Environ Sci. Pollut. Res. – 2023. – Vol. 30, - P. 86521–86539. DOI: 10.1007/s11356-023-28532-7.

175. Liu, J. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces / J. Liu, W. Li, X. Zhu [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – Vol. 103. – № 11. – P. 4565–4574. DOI: 10.1007/s00253-019-09808-w.

176. Gao, L. Plipastatin and surfactin coproduction by *Bacillus subtilis* pB2-L and their effects on microorganisms / L. Gao, J. Han, H. Liu [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2017. – Vol. 110. – P. 1007–1018. DOI: 10.1007/s10482-017-0874-y.

177. Маннапова, Р.Т. Функционально детерминированные изменения нормобиоза под действием *Candida albicans* на фоне развития кандидамикозов пищеварительного тракта / Р.Т. Маннапова, Р.Р. Шайхулов // Известия Дагестанского ГАУ. – 2022. – № 4(16). – С. 180–186. DOI: 10.52671/26867591_2022_4_180.

178. Lopes J.P. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans* / J.P. Lopes, M.S. Lionakis // Virulence. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 89–121. DOI: 10.1080/21505594.2021.2019950.
179. Fungal Diseases in Animals / H. Tutun, E. Sababoglu, A. Ayan, M. Sevindik – Springer, Cham. 2021. – pp. 105–126. DOI: 10.1007/978-3-030-69507-1_8.
180. Antoniassi, N.A.B. *Geotrichum candidum* as a possible cause of bovine abortion / N.A.B. Antoniassi, G.D. Juffo, A.S. Santos [et al.] // J. of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2013. – Vol. 25. – № 6. – P. 795–797. DOI: 10.1177/1040638713508284.
181. Figueredo, L.A. *Geotrichum candidum* as etiological agent of horse dermatomycosis / L.A. Figueredo, C. Cafarchia, D. Otranto // Vet Microbiol. – 2011. – Vol. 148. – № 2-4. – P. 368–371. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.09.025.
182. Дудник, Д.Е. Фунгицидная активность природных штаммов *Bacillus* spp в отношении патогенных грибов *Candida albicans* / Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, Е.Н. Каргашилова // Фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии в науке и образовании: Материалы II международной научно-практической конференции, Рязань, 30 мая 2023 года. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2023. – С. 13–15.
183. Gao, L. Plipastatin and surfactin coproduction by *Bacillus subtilis* pB2-L and their effects on microorganisms / L. Gao, J. Han, H. Liu [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2017. – Vol. 110. – P. 1007–1018. DOI: 10.1007/s10482-017-0874-y.
184. Sreelakshmi, K.P. Microbial lipopeptides: their pharmaceutical and biotechnological potential, applications, and way forward / K.P. Sreelakshmi, M. Madhuri, R. Swetha [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2024. – Vol. 40. – № 135. DOI: 10.1007/s11274-024-03908-0.
185. Koilybayeva, M. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Profiling of Volatile Metabolites Produced by Some *Bacillus* spp. and Evaluation of Their Antibacterial and Antibiotic Activities / M. Koilybayeva, Z. Shynykul, G. Ustenova [et al.] // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – № 22. DOI: 10.3390/molecules28227556.
186. Hirozawa, M.T. Lactic acid bacteria and *Bacillus* spp. as fungal biological control agents / M.T. Hirozawa, M.A. Ono, I.M.S. Suguiura [et al.] // J Appl Microbiol. – 2023. – Vol. 134. – № 2. DOI: 10.1093/jambio/lxac083.

187. Choub, V. Antifungal Activity of *Bacillus velezensis* CE 100 against Anthracnose Disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) and Growth Promotion of Walnut (*Juglans regia* L.) Trees / V. Choub, H.B. Ajuna, S.J. Won [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22. – № 19. DOI: 10.3390/ijms221910438.
188. Zhang, L. Fengycins, Cyclic Lipopeptides from Marine *Bacillus subtilis* Strains, Kill the Plant-Pathogenic Fungus *Magnaporthe grisea* by Inducing Reactive Oxygen Species Production and Chromatin Condensation / L. Zhang, C. Sun // Appl. Environ Microbiol. – 2018. – Vol. 84. – № 18. DOI: 10.1128/AEM.00445-18.
189. Omeike, S.O. Purification, De Novo Characterization and Antibacterial Properties of a Novel, Narrow-Spectrum Bacteriostatic Tripeptide from *Geotrichum candidum* OMON-1 / S.O. Omeike, S.O. Kareem, H. Nandanwar [et al.] // Arab. J. Sci. Eng. – 2021. – Vol. 46. – P. 5275–5283. DOI: 10.1007/s13369-020-05024-1.
190. Kawtharani, H. Phenyllactic Acid Produced by *Geotrichum candidum* Reduces *Fusarium sporotrichioides* and *F. langsethiae* Growth and T-2 Toxin Concentration / H. Kawtharani, S.P. Snini, S. Heang [et al.] // Toxins (Basel). – 2020. – Vol. 12. – № 4. DOI: 10.3390/toxins12040209.
191. Dieuleveux, V. Purification and characterization of anti-Listeria compounds produced by *Geotrichum candidum* / V. Dieuleveux, D. Van Der Pyl, J. Chataud [et al.] // Appl. Environ Microbiol. – 1998. – Vol. 64. – № 2. – P. 800–803. DOI: 10.1128/AEM.64.2.800-803.1998.
192. Wragg, P. Comparison of Biolog GEN III MicroStation semi-automated bacterial identification system with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and 16S ribosomal RNA gene sequencing for the identification of bacteria of veterinary interest / P. Wragg, L. Randall, A.M. Whatmore // J. Microbiol. Methods. – 2014. – Vol. 105. – P. 16–21. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.07.003.
193. Tsigkrmani, M. Microbial Ecology of Artisanal Feta and Kefalograviera Cheeses, Part I: Bacterial Community and Its Functional Characteristics with Focus on Lactic Acid Bacteria as Determined by Culture-Dependent Methods and Phenotype Microarrays / M. Tsigkrmani, M. Bakogianni, S. Paramithiotis [et al.] // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10. – № 1. DOI: 10.3390/microorganisms10010161.
194. Zheng, J. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of

Lactobacillaceae and *Leuconostocaceae* / J. Zheng, S. Wittouck, E. Salvetti [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2020. – Vol. 70. – № 4. – P. 2782–2858. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107.

195. Asha, M.N. Antibacterial potential of lactic acid bacteria isolated from raw cow milk in Sylhet district, Bangladesh: A molecular approach / M.N. Asha, M.S.R. Chowdhury, H. Hossain [et al.] // Vet. Med. Sci. – 2024. – Vol. 10. – № 3. DOI: 10.1002/vms3.1463.

196. Mohammadi, F. Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp. isolated from mother's milk / F. Mohammadi, M. Eshaghi, S. Razavi [et al.] // Microb. Pathog. – 2018. – Vol. 118. – P. 242–246. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.03.020.

197. Younas, S. Bacteriocin Production by Lactobacilli and Their Role as Antibacterial Tool against Common Pathogens / S. Younas, B. Mazhar, I. Liaqat [et al.] // J Oleo Sci. – 2022. – Vol. 71. – № 4. – P. 541–550. DOI: 10.5650/jos.ess21424.

198. Wang, W. Screening of *Lactobacillus plantarum* Subsp. *plantarum* with Potential Probiotic Activities for Inhibiting ETEC K88 in Weaned Piglets / W. Wang, H. Ma, H. Yu [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 19. DOI: 10.3390/molecules25194481.

199. Schwarz, J. Bacterial battle against acidity / J. Schwarz, K. Schumacher, S. Brameyer, K. Jung // FEMS Microbiol Rev. – 2022. – Vol. 46. – № 6. DOI: 10.1093/femsre/fuac037.

200. Shahverdi, S. *In-vitro* and *in-vivo* antibacterial activity of potential probiotic *Lactobacillus paracasei* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / S. Shahverdi, A.A. Barzegari, R. Vaseghi Bakhshayesh, Y. Nami // Heliyon. – 2023. – Vol. 9. – № 4. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14641.

201. Hojjati, M. Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus* / M. Hojjati, B.A. Behabahani, F. Falah // Microb. Pathog. – 2020. – Vol. 147. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104420.

202. Scillato, M. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens / M. Scillato, A. Spitale, G. Mongelli [et al.] // Microbiologyopen. – 2021. – Vol. 10. – № 2. DOI: 10.1002/mbo3.1173.

203. Hossain, T.J. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations // Eur. J. Microbiol. Immunol (Bp). – 2024. – Vol. 14. – № 2. – P. 97–115. DOI: 10.1556/1886.2024.00035.

204. Rouxel, M. Characterization of antifungal compounds produced by lactobacilli in cheese-mimicking matrix: Comparison between active and inactive strains / M. Rouxel, M. Barthe, P. Marchand [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2020. – Vol. 333. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108798.

205. Russo, P. *Lactobacillus plantarum* with Broad Antifungal Activity as a Protective Starter Culture for Bread Production / P. Russo, C. Fares, A. Longo [et al.] // Foods. – 2017. – Vol. 6. – № 12. DOI: 10.3390/foods6120110.

206. Дудник, Д.Е. Оценка биосовместимости штаммов *Bacillus* spp. и *Lactobacillus* spp / Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, Е.Н. Кожевникова // BIOAsia Altai 2024: Материалы IV Международного биотехнологического форума, Барнаул, 23–28 сентября 2024 года. – Барнаул: Алтайский государственный университет, 2024. – С. 76–79.

207. Kwoji, I.D. Multi-Strain Probiotics: Synergy among Isolates Enhances Biological Activities / I.D. Kwoji, O.A. Aiyegoro, M. Okpeku, M.A. Adeleke // Biology (Basel). – 2021. – Vol. 10. DOI: 10.3390/biology10040322. 9.

208. McFarland, L.V. Efficacy of Single-Strain Probiotics Versus Multi-Strain Mixtures: Systematic Review of Strain and Disease Specificity / L.V. McFarland // Dig Dis Sci. – 2021. – Vol. 66. DOI: 10.1007/s10620-020-06244-z.

209. Zhang, X. Three novel leaderless bacteriocins have antimicrobial activity against gram-positive bacteria to serve as promising food biopreservative / X. Zhang, N. Xin, Z. Zhu [et al.] // Microb Cell Fact. – 2022. – Vol. 21. – № 1. DOI: 10.1186/s12934-022-01912-3.

210. Патент № 2821008 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01). Штамм бактерий *Bacillus atrophaeus* RCAM06423, проявляющий антагонизм по отношению к микроорганизмам *Candida albicans*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* и обладающий амилалитической активностью: № 2023131233: заявл. 27.11.2023: опубл. 14.06.2024 / Д.Е. Дудник, А.В. Малкова, Е.Н. Каргашилова, А.Н. Иркитова, И.Ю. Евдокимов, М.В. Ширманов; заявитель, патентообладатель ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет». – 8 с.

211. Патент № 2859479 Российская Федерация МПК C12N 1/00 (2006.01). Штамм бактерий *Bacillus subtilis* RCAM06733, обладающий способностью к продукции биосурфактантов и проявляющий антагонизм по отношению к микроорганизмам *Candida*

albicans, *Staphylococcus* spp. и *Escherichia coli*: № 2024128305: заявл. 24.09.2024: опубл. 03.04.2026 / Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, Е.Н. Кожевникова, И.Ю. Евдокимов, М.В. Ширманов; заявитель, патентообладатель ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет». – 10 с.

212. Mu, Y. Identification and characterization of the *Bacillus atropheus* strain J-1 as biological agent of apple ring rot disease / Y. Mu, Y. Yue, G. Gu [et al.] // J. Plant Dis. Prot. – 2020. – Vol. 127. – P. 367–378. DOI: 10.1007/s41348-020-00309-x.

213. Daneshazari, R. *Bacillus subtilis* isolates from camel milk as probiotic candidates / R. Daneshazari, M. Rabbani Khorasgani, A. Hosseini-Abari, J.H. Kim // Sci Rep. – 2023. – Vol. 13. – № 1. DOI: 10.1038/s41598-023-30507-0.

214. Parvathi, A. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India / A. Parvathi, K. Krishna, J. Jose [et al.] // Braz. J. Microbiol. – 2009. – Vol. 40. – № 2. – P. 269–275. DOI: 10.1590/S1517-838220090002000012.

215. Cui, Y. The Carbohydrate Metabolism of *Lactiplantibacillus plantarum* / Y. Cui, M. Wang, Y. Zheng [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22. – № 24. DOI: 10.3390/ijms222413452.

216. Liu, Y. Characterization of Genomic, Physiological, and Probiotic Features of *Lactiplantibacillus plantarum* JS21 Strain Isolated from Traditional Fermented Jiangshui / Y. Liu, S. Wang, L. Wang [et al.] // Foods. – 2024. – Vol. 13. – № 7. DOI: 10.3390/foods13071082.

217. Surve, S. Isolation, characterization and comparative genomics of potentially probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains from Indian foods / S. Surve, D.B. Shinde, R. Kulkarni // Sci. Rep. – 2022. – Vol. 12. – № 1. DOI: 10.1038/s41598-022-05850-3.

218. Ahmed, S. Aggrandizement of fermented cucumber through the action of autochthonous probiotic cum starter strains of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* / S. Ahmed, F. Ashraf, M. Tariq, A. Zaidi // Ann Microbiol. – 2021. – Vol. 71. – № 1. DOI: 10.1186/s13213-021-01645-5.

219. Beekwilder, J. Characterization of Rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* / J. Beekwilder, D. Marcozzi, S. Vecchi [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2009. – Vol. 75. – № 11. – P. 3447–3454. DOI: 10.1128/AEM.02675-08.

220. Elamary, R. Optimizing and purifying extracellular amylase from soil bacteria to inhibit clinical biofilm-forming bacteria / R. Elamary, W.M. Salem // Peer J. – 2020. – Vol. 8. DOI: 10.7717/peerj.10288.
221. Malik, M.S. Thermo-neutrophilic cellulases and chitinases characterized from a novel putative antifungal biocontrol agent: *Bacillus subtilis* TD11 / M.S. Malik, A. Rehman, I.U. Khan [et al.] // PLoS One. – 2023. – Vol. 18. – № 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0281102.
222. Choub, V. Antifungal Activity of *Bacillus velezensis* CE 100 against Anthracnose Disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) and Growth Promotion of Walnut (*Juglans regia* L.) Trees / V. Choub, H.B. Ajuna, S.J. Won [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22. – № 19. DOI: 10.3390/ijms221910438.
223. Nwachukwu, U. Evaluation of probiotic *Lactobacillus plantarum* CS fermented culture and its crude enzymes as chicken growth enhancers / U. Nwachukwu, U. George-Okafor // World J. of Advanced Research and Reviews. – 2022. – Vol. 14. – P. 332–337. DOI: 10.30574/wjarr.2022.14.3.0484.
224. Mohamad Zabidi, N.A. Enhancement of Versatile Extracellular Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzyme Productions by *Lactobacillus plantarum* RI 11 Isolated from Malaysian Food Using Renewable Natural Polymers / N.A. Mohamad Zabidi, H.L. Foo, T.C. Loh [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 11. DOI: 10.3390/molecules25112607.
225. El-Sayed, A.I.M Identification of *Lactobacillus* strains from human mother milk and cottage cheese revealed potential probiotic properties with enzymatic activity / El-Sayed A.I.M., El-Borai A.M., Akl S.H. [et al.] // Sci Rep. – 2022. – Vol. 12. – № 1. DOI: 10.1038/s41598-022-27003-2.
226. Камартдинова, Д.Р. Разработка консорциума молочнокислых бактерий с антиоксидантными свойствами / Д.Р. Камартдинова, С.В. Китаевская, О.А. Решетник, М.Ю. Тюрин // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. – 2025. – № 2(64). – С. 14–23. DOI: 10.17586/2310-1164-2025-18-2-14-23.
227. Dash, B.K. Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* BI19 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase / B.K. Dash, M.M. Rahman, P.K. Sarker // Biomed Res Int. – 2015. – № 1. DOI: 10.1155/2015/859805.

228. Antonioli Júnior, R. Interdisciplinary Overview of Lipopeptide and Protein-Containing Biosurfactants / R. Antonioli Júnior, J.F. Poloni, É.S.M. Pinto, M. Dorn // *Genes* (Basel). – 2022. – Vol. 14. – № 1. DOI: 10.3390/genes14010076.

229. Дудник, Д.Е. Влияние разных источников углерода на продукцию биосурфактантов природными штаммами *Bacillus* spp. / Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, Е.Н. Кожевникова // *Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет)*. – 2025. – № 2. – С. 152–159. DOI: 10.31677/2072-6724-2025-75-2-152-159.

230. Rezaeimalidareh, R. *Lactobacillus*-Derived Biosurfactants: Emulsification and Antioxidant Properties in Oil Emulsions / R. Rezaeimalidareh, M. Ahmadi, S.A. Shahidi // *Food Sci Nutr*. – 2025. – Vol. 13. – № 6. DOI: 10.1002/fsn3.70334.

231. Wang, W. Screening of *Lactobacillus plantarum* Subsp. *plantarum* with Potential Probiotic Activities for Inhibiting ETEC K88 in Weaned Piglets / W. Wang, H. Ma, H. Yu [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 19. DOI: 10.3390/molecules25194481.

232. Zheng, Q. Different Combinations of Nitrogen and Carbon Sources Influence the Growth and Postbiotic Metabolite Characteristics of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains Isolated from Malaysian Foods / Q. Zheng, S.L. Chia, N. Saad [et al.] // *Foods*. – 2024. – Vol. 13. – № 19. DOI: 10.3390/foods13193123.

233. Ngouénam, J.R. Lactic acid production ability of *Lactobacillus* sp. from four tropical fruits using their by-products as carbon source / J.R. Ngouénam, C.H. Momo Kenfack, E.M. Foko Kouam [et al.] // *Heliyon*. – 2021. – Vol. 7. – № 5. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07079.

234. Chen, X. Large-scale fermentation of *Lactiplantibacillus pentosus* 292 for the production of lactic acid and the storage strategy based on molasses as a preservative / X. Chen, Z. Wei, Z. Feng [et al.] // *BMC Microbiol*. – 2025. – Vol. 25. – № 1. DOI: 10.1186/s12866-025-03837-4.

235. Ngouénam, R.J. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From Rotting Oranges and Use of Agropastoral Processing By-products as Carbon and Nitrogen Sources Alternative for Lactic Acid Production / R.J. Ngouénam, G. Nofal, S. Patra [et al.] // *Biomed Res Int*. – 2024. – Vol. 2024. DOI: 10.1155/2024/4264229.

236. Mateuszuk, L. Antiatherosclerotic Effects of 1-Methylnicotinamide in Apolipoprotein E/Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice: A Comparison with

Nicotinic Acid / L. Mateuszuk, A. Jasztal, E. Maslak [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2016. – Vol. 356. – № 2. – P. 514–524. DOI: 10.1124/jpet.115.228643.

237. Ashry, N.I. Protective Effect of S-Methylcysteine Against Toxoplasma gondii-Induced Reproductive Toxicity in Female Albino Rats / N.I. Ashry, D.M.M. El Shewehy, D.A. Elbadry, A. Ismail // Acta Parasitol. – 2025. – Vol. 71. – № 1. DOI: 10.1007/s11686-025-01172-2.

238. Elmahallawy, E.K. S-Methylcysteine (SMC) Ameliorates Intestinal, Hepatic, and Splenic Damage Induced by *Cryptosporidium parvum* Via Targeting Inflammatory Modulators and Oxidative Stress in Swiss Albino Mice / E.K. Elmahallawy, G.E. Elshopakey, A.A. Saleh [et al.] // Biomedicines. – 2020. – Vol. 8. DOI: 10.3390/biomedicines8100423.

239. Xu, D. LC-MS-based rheumatoid arthritis serum metabolomics reveals the role of deoxyinosine in attenuating collagen-induced arthritis in mice / D. Xu, L. Tang, Y. Wang [et al.] // Heliyon. – 2024. – Vol. 10. – № 10. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30903.

240. Buckner, M.M. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 inhibits macrophage colonization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / M.M. Buckner, L.C. Antunes, N. Gill [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – № 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0069759.

241. Philippe, C. AICAR Antiproliferative Properties Involve the AMPK-Independent Activation of the Tumor Suppressors LATS 1 and 2 / C. Philippe, B. Pinson, J. Dompierre [et al.] // Neoplasia. – 2018. – Vol. 20. – № 6. – P. 555–562. DOI: 10.1016/j.neo.2018.03.006.

242. Kim, M.J. Selection and Characteristics of Fermented Salted Seafood (jeotgal)-Originated Strains with Excellent S-adenosyl-L-methionine (SAM) Production and Probiotics Efficacy / M.J. Kim, S. Park, R.S. Lee [et al.] // Korean J. Food Sci Anim Resour. – 2014. – Vol. 34. – № 1. – P. 65–72. DOI: 10.5851/kosfa.2014.34.1.65.

243. Geng, Q. Rumen-protected guanidinoacetic acid improves growth performance in beef cattle under chronic heat stress by reshaping gut microbiota and modulating serum metabolism / Q. Geng, W. Lin, L. Yang [et al.] // Front. Microbiol. – 2025. – Vol. 16. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1529596.

244. Qiao, Z. *Lactobacillus paracasei* BD5115-Derived 2-Hydroxy-3-Methylbutyric Acid Promotes Intestinal Epithelial Cells Proliferation by Upregulating the MYC Signaling Pathway / Z. Qiao, X. Wang, C. Wang [et al.] // Front. Nutr. – 2022. – Vol. 9. DOI: 10.3389/fnut.2022.799053.

245. Da Silva, A.M. N-acetylcysteine effects on extracellular polymeric substances of *Xylella fastidiosa*: A spatiotemporal investigation with implications for biofilm disruption / A.M. da Silva, D.M. Murillo, S. Anbumani [et al.] // Int. J. Antimicrob Agents. – 2024. – Vol. 64. – № 5. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2024.107340.
246. Kundukad, B. Mechanistic action of weak acid drugs on biofilms / B. Kundukad, M. Schussman, K. Yang [et al.] // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. DOI: 10.1038/s41598-017-05178-3.
247. Villageliú, D. Dopamine production in *Enterococcus faecium*: A microbial endocrinology-based mechanism for the selection of probiotics based on neurochemical-producing potential / D. Villageliú, M. Lyte // PLoS One. – 2018. – Vol. 13. – № 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0207038.
248. Cheng, Y. A bacterial platform for the production of 4-hydroxyphenylacetic acid and its derivatives / Y. Cheng, L. Lu, C. Hu [et al.] // Bioresour Technol. – 2025. – Vol. 422. DOI: 10.1016/j.biortech.2025.132240.
249. Li, X.H. Anti-biofilm effects of anthranilate on a broad range of bacteria / X.H. Li, S.K. Kim, J.H. Lee // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7. DOI: 10.1038/s41598-017-06540-1.
250. Rosheen. Salicylic Acid: Synthetic Strategies and Their Biological Activities / Rosheen, S. Sharma, D. Utreja // ChemistrySelect. – 2023. – Vol. 8. DOI: 10.1002/slct.202204614.
251. Lavermicocca, P. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B / P. Lavermicocca, F. Valerio, A. Evidente [et al.] // Appl. Environ Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – № 9. – P. 4084–4090. DOI: 10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000.
252. Abdul-Rahim, O. Phenyl-Lactic Acid Is an Active Ingredient in Bactericidal Supernatants of *Lactobacillus crispatus* / O. Abdul-Rahim, Q. Wu, T.K. Price [et al.] // J. Bacteriol. – 2021. – Vol. 203. – № 19. DOI: 10.1128/JB.00360-21.
253. Yao, Y. Akkermansia muciniphila-Derived N-Acetylspermidine Modulates the Localization of Intestinal α 1,2-Fucosylated Proteins to Maintain Gut Homeostasis / Y. Yao, Z. Pei, Y. Dai [et al.] // Adv. Sci (Weinh). – 2025. – Vol. 12. – № 38. DOI: 10.1002/advs.202506576.

254. Lotfy, W.A. Neuroprotective and probiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* AM2 in cognitive impairment / W.A. Lotfy, A.M. Ali, H.M. Abdou, K.M. Ghanem // Sci Rep. – 2025. – Vol. 15. – № 1. DOI: 10.1038/s41598-025-06103-9.

255. Ricciutelli, M. Quantification of 2- and 3-isopropylmalic acids in forty Italian wines by UHPLC-MS/MS triple quadrupole and evaluation of their antimicrobial, antioxidant activities and biocompatibility / M. Ricciutelli, G. Bartolucci, R. Campana [et al.] // Food Chem. – 2020. – Vol. 321. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126726.

256. Zhao, M. Gut bacteria-driven homovanillic acid alleviates depression by modulating synaptic integrity / M. Zhao, Z. Ren, A. Zhao [et al.] // Cell Metab. – 2024. – Vol. 36. – № 5. – P. 1000–1012. DOI: 10.1016/j.cmet.2024.03.010.

257. Feng, X. Azelaic Acid: Mechanisms of Action and Clinical Applications / X. Feng, J. Shang, Z. Gu [et al.] // Clin Cosmet Investig Dermatol. – 2024. – Vol. 17. – P. 2359–2371. DOI: 10.2147/CCID.S485237.

258. Tariq, M. Engineering of phenylalanine dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius* for the production of a novel homoglutamate / M. Tariq, M. Israr, M. Raza [et al.] // PLoS One. – 2022. – Vol. 17. – № 3. DOI: 10.1371/journal.pone.0263784.

259. Bongaerts, J. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds / J. Bongaerts, M. Krämer, U. Müller [et al.] // Metab. Eng. – 2001. – Vol. 3. – № 4. – P. 289–300. DOI: 10.1006/mben.2001.0196.

260. Liu, X. Metabolic engineering for the production of l-phenylalanine in *Escherichia coli* / X. Liu, H. Niu, Q. Li, P. Gu // Biotech. – 2019. – Vol. 9. – № 3. DOI: 10.1007/s13205-019-1619-6.

261. Kitade, Y. Production of 4-Hydroxybenzoic Acid by an Aerobic Growth-Arrested Bioprocess Using Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum* / Y. Kitade, R. Hashimoto, M. Suda [et al.] // Appl. Environ Microbiol. – 2018. – Vol. 84. – № 6. DOI: 10.1128/AEM.02587-17.

262. Mehtiö, T. Production and applications of carbohydrate-derived sugar acids as generic biobased chemicals / T. Mehtiö, M. Toivari, M. G. Wiebe [et al.] // Critical Reviews in Biotechnology. – 2016. – Vol. 36. – № 5. – P. 904–916. DOI:10.3109/07388551.2015.1060189.

263. Затолоцкая Ю.А. Экзометаболическое исследование штаммов *Lactiplantibacillus plantarum* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрической детекцией с применением взвешенного

многомерного масштабирования на основе метаболических путей / Ю.А. Затолоцкая, Д.Е. Дудник, А.С. Титенко [и др.] // Масс-спектрометрия. – 2025. – Т. 22. – № 3. – С. 164–175. DOI: 10.25703/MS.2025.22.18.

264. Zatolotskaya, Y.A. Pathway-Weighted Multidimensional Scaling in Exometabolomic Profiling of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains by LC–MS/MS / Y.A. Zatolotskaya, D.E. Dudnik, A.S. Titenko [et al.] // J. Anal. Chem. – 2025. – Vol. 80. – P. 2247–2256. DOI: 10.1134/S106193482670005X.

265. Silveira, V.A.I. Antimicrobial effects of sophorolipid in combination with lactic acid against poultry-relevant isolates / V.A.I. Silveira, R.K.T. Kobayashi, A.G. de Oliveira Junior [et al.] // Braz. J. Microbiol. – 2021 – Vol. 52. – № 4. – P. 1769–1778. DOI: 10.1007/s42770-021-00545-9.

266. Hansakon, A. Oral L-Arginine treatment attenuates *Cryptococcus neoformans* extrapulmonary dissemination and disease progression / A. Hansakon, P. Phucharoenrak, D. Trachootham [et al.] // Virulence. – 2025. – Vol. 16. – № 1. DOI: 10.1080/21505594.2025.2591455.

267. Giordano, C. Glycine restores the sensitivity to antibiotics in multidrug-resistant bacteria / C. Giordano, S. Barnini // Microbiol. Spectr. – 2024. – Vol. 12. – № 8. DOI: 10.1128/spectrum.00164-24.

268. Haj-Yahya, F. Trans, Trans-Farnesol Enhances the Anti-Bacterial and Anti-Biofilm Effect of Arachidonic Acid on the Cariogenic Bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* / F. Haj-Yahya, D. Steinberg, R.V. Sionov // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – Vol. 25. – № 21. DOI: 10.3390/ijms252111770.

269. Coraça-Huber, D.C. Antibacterial and Anti-Biofilm Activity of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids against Periprosthetic Joint Infections-Isolated Multi-Drug Resistant Strains / D.C. Coraça-Huber, S. Steixner, A. Wurm, M. Nogler // Biomedicines. – 2021. – Vol. 9. – № 4. DOI: 10.3390/biomedicines9040334.

270. Zhao, S. The metabolic engineering of *Escherichia coli* for the high-yield production of hypoxanthine / S. Zhao, T. Shi, L. Li [et al.] // Microb Cell Fact. – 2024. – Vol. 23. – № 1. DOI: 10.1186/s12934-024-02576-x.

271. Poethe, S.S. Sustainable production of the drug precursor tyramine by engineered *Corynebacterium glutamicum* / S.S. Poethe, N. Junker, F. Meyer, V.F. Wendisch // Appl. Microbiol Biotechnol. – 2024. – Vol. 108. – № 1. DOI: 10.1007/s00253-024-13319-8.

272. Zhang, H. Efficient Production of (R)-3-Aminobutyric Acid by Biotransformation of Recombinant *E. coli* / H. Zhang, Q. Xu, J. Lv, [et al.] // *Catalysts*. – 2025. – Vol. 15. DOI: 10.3390/catal15050466.

273. Cheng, J. An economically and environmentally acceptable synthesis of chiral drug intermediate L-pipecolic acid from biomass-derived lysine via artificially engineered microbes / J. Cheng, Y. Huang, L. Mi [et al.] // *J. Ind Microbiol Biotechnol.* – 2018. – Vol. 45. – № 6. – P. 405–415. DOI: 10.1007/s10295-018-2044-2.

274. Sadiq, A. (R)- α -Aminoadipic Acid: A Versatile Precursor for the Synthesis of D-Amino Acids / A. Sadiq, N. Sewald // *J. Amino Acids*. – 2013. – Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/252813.

275. Akhtar, J. Recent advances in production of succinic acid from lignocellulosic biomass / J. Akhtar, A. Idris, R. Abd Aziz // *Appl. Microbiol Biotechnol.* – 2014. – Vol. 98. – № 3. – P. 987–1000. DOI: 10.1007/s00253-013-5319-6.

276. Wei, Z. Microbial Biosynthesis of L-Malic Acid and Related Metabolic Engineering Strategies: Advances and Prospects / Z. Wei, Y. Xu, Q. Xu [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 9. DOI: 10.3389/fbioe.2021.765685.

277. Herman, L. The qualified presumption of safety assessment and its role in EFSA risk evaluations: 15 years past / L. Herman, M. Chemaly, P.S. Cocconcelli [et al.] // *FEMS Microbiol Lett.* – 2019. – Vol. 366. – № 1. DOI: 10.1093/femsle/fny260.

278. Qualified presumption of safety. URL: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps> (дата обращения: 04.09.2025).

279. GRAS Notices. URL: <https://www.hfpappexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices> (дата обращения: 04.09.2025).

280. EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2014. Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition // *EFSA Journal*. – 2014. – Vol. 12. – № 5 – 10 pp. DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3665.

281. Иркитова, А.Н. Оценка биобезопасности природных штаммов *Bacillus* spp., обладающих ценными биотехнологическими свойствами / А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник,

А.В. Малкова, К.В. Хлопова // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. – 2025. – Т. 17. – № 3. – С. 188–207. DOI: 10.12731/2658-6649-2025-17-3-1186.

282. Дудник, Д.Е. Влияние разных источников углерода на продукцию биосурфактантов природными штаммами *Bacillus* spp. / Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, Е.Н. Кожевникова // *Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет)*. – 2025. – № 2. – С. 152–159. DOI: 10.31677/2072-6724-2025-75-2-152-159.

283. Koim-Puchowska, B. Evaluation of various methods of selection of *B. subtilis* strains capable of secreting surface-active compounds / B. Koim-Puchowska, G. Kłosowski, D. Mikulski, A. Menka // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14. – № 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0225108.

284. Doke, M. Nucleases from *Prevotella intermedia* can degrade neutrophil extracellular traps / M. Doke, H. Fukamachi, H. Morisaki [et al.] // *Mol. Oral Microbiol.* – 2017. – Vol. 32. – № 4. – P. 288–300. DOI: 10.1111/omi.12171.

285. Ulyanova, V. Barnase and binase: twins with distinct fates / V. Ulyanova, V. Vershinina, O. Ilinskaya // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – № 19. – P. 3633–3643. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08294.x.

286. Хайруллин, Р.М. К механизмам антивирусной активности бактерий рода *Bacillus subtilis* на растениях картофеля / Р.М. Хайруллин, Г.Ф. Бурханова, А.В. Сорокань [и др.] // *Теоретическая и прикладная экология*. – 2019. – № 4. – С. 130–135. DOI: 10.25750/1995-4301-2019-4-130-135.

287. Tarale, P. Antibiotic susceptibility profile of bacilli isolated from the skin of healthy humans / P. Tarale, S. Gawande, V. Jambhulkar // *Braz. J. Microbiol.* – 2015. – Vol. 46. – № 4. – P. 1111–1118. DOI: 10.1590/S1517-838246420131366.

288. Adimpong, D.B. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterization of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis / D.B. Adimpong, K.I. Sørensen, L. Thorsen [et al.] // *Appl. Environ Microbiol.* – 2012. – Vol. 78. – № 22. – P. 7903–7914. DOI: 10.1128/AEM.00730-12.

289. Jung, J. Short Communication: Enterotoxin Genes and Antibiotic Susceptibility of *Bacillus cereus* Isolated from Garlic Chives and Agricultural Environment / J. Jung, H. Jin, S. Seo [et al.] // *Int. J. Environ Res Public Health*. – 2022. – Vol. 19. – № 19. DOI: 10.3390/ijerph191912159.

290. Орлова, Т.Н. Изучение антибиотикочувствительности нового ризосферного штамма *Bacillus pumilus* В-13250 для возможности использования его в составе пробиотических препаратов для животноводства / Т.Н. Орлова, А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова, Д.Е. Дудник // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2020. – № 1(183). – С. 111–115.

291. Irkitova, A.N. A natural bacterial strain *Bacillus pumilus* 16: Identification and antibiotic resistance evaluation / A.N. Irkitova, A.V. Malkova, D.E. Dudnik // Acta Biologica Sibirica. – 2021. – Vol. 7. – P. 391–406. DOI: 10.3897/abs.7.e78412.

292. Toth, M. Class D β -lactamases do exist in Gram-positive bacteria / M. Toth, N.T. Antunes, N.K. Stewart [et al.] // Nat. Chem. Biol. – 2016. – Vol. 12. – № 1. – P. 9–14. DOI: 10.1038/nchembio.1950.

293. Yakhnin, H. NusG-Dependent RNA Polymerase Pausing and Tylosin-Dependent Ribosome Stalling Are Required for Tylosin Resistance by Inducing 23S rRNA Methylation in *Bacillus subtilis* / H. Yakhnin, A.V. Yakhnin, B.L. Mouery [et al.] // mBio. – 2019. – Vol. 10. – № 6. DOI: 10.1128/mBio.02665-19.

294. Bahr, G. Metallo- β -lactamases in the Age of Multidrug Resistance: From Structure and Mechanism to Evolution, Dissemination, and Inhibitor Design / G. Bahr, L.J. González, A.J. Vila // Chem. Rev. – 2021. – Vol. 121. – № 13. – P. 7957–8094. DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00138.

295. Agersø, Y. Antimicrobial Susceptibility Testing and Tentative Epidemiological Cutoff Values for Five *Bacillus* Species Relevant for Use as Animal Feed Additives or for Plant Protection / Y. Agersø, B. Stuer-Lauridsen, K. Bjerre [et al.] // Appl. Environ Microbiol. – 2018. – Vol. 84. – № 19. – P. 1108–1118. DOI: 10.1128/AEM.01108-18.

296. Kerek, Á. Antibiotic Resistance Gene Expression in Veterinary Probiotics: Two Sides of the Coin / Á. Kerek, I. Román, Á. Szabó [et al.] // Vet. Sci. – 2025. – Vol. 12. – № 3. DOI: 10.3390/vetsci12030217.

297. Duche, R.T. Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria / R.T. Duche, A. Singh, A.G. Wandhare [et al.] // BMC Microbiol. – 2023. – Vol. 23. – № 1. DOI: 10.1186/s12866-023-02883-0.

298. Nawaz, M. Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products / M. Nawaz, J. Wang, A. Zhou [et al.] // Curr Microbiol. – 2011. – Vol. 62. – P. 1081–1089. DOI: 10.1007/s00284-010-9856-2.

299. Ruiz-Ramírez, Y. Probiotic and functional potential of lactic acid bacteria isolated from pulque and evaluation of their safety for food applications / Y. Ruiz-Ramírez, R. Valadez-Blanco, C. Calderón-García [et al.] // *Front Microbiol.* – 2023. – Vol. 14. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1241581
300. Gupta, R.S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species / R.S. Gupta, S. Patel, N. Saini, S. Chen // *Int. J. Syst Evol Microbiol.* – 2020. – Vol. 70. – № 11. – P. 5753–5798. DOI: 10.1099/ijsem.0.004475.
301. Chen, Z.M. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs / Z.M. Chen, Q. Li, H.M. Liu [et al.] // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2010. – Vol. 85. – № 5. – P. 1353–1360. DOI: 10.1007/s00253-009-2162-x.
302. Vehapi, M. Optimization of Growth Conditions for the Production of *Bacillus subtilis* Using Central Composite Design and Its Antagonism Against Pathogenic Fungi / M. Vehapi, B. İnan, S. Kayacan-Cakmakoglu [et al.] // *Probiotics & Antimicro. Prot.* – 2023. – Vol. 15. – P. 682–693. DOI: 10.1007/s12602-021-09904-2.
303. Liu, X. Optimization of the fermentation culture conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* ck-05 using response surface methodology / X. Liu, J.J. John Martin, X. Li [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2025. – Vol. 16. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1552645
304. Bolmanis, E. Pilot-scale production of *Bacillus subtilis* MSCL 897 spore biomass and antifungal secondary metabolites in a low-cost medium / E. Bolmanis, O. Grigs, E. Didrihsone [et al.] // *Biotechnol Lett.* – 2024. – Vol. 46. – № 3. – P. 355–371. DOI: 10.1007/s10529-024-03481-4.
305. Vehapi, M. Production of *Bacillus subtilis* soil isolate as biocontrol agent under bioreactor conditions / M. Vehapi, B. İnan, S. Kayacan-Cakmakoglu [et al.] // *Arch. Microbiol.* – 2023. – Vol. 205. – № 52. DOI: 10.1007/s00203-022-03381-z.
306. Da Silva R.N. Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 for cellulase production / R.N. da Silva, L.F.A. Melo, C.L. Luna Finkler // *Biotechnol Rep (Amst).* – 2021. – Vol. 29. DOI: 10.1016/j.btre.2021.e00599.

307. Śliżewska, K. Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium / K. Śliżewska, Chlebicz- A. Wójcik // *Biology (Basel)*. – 2020. – Vol. 9. – № 12. DOI: 10.3390/biology9120423.
308. Choi, G.H. Optimization of Medium Composition for Biomass Production of *Lactobacillus plantarum* 200655 Using Response Surface Methodology / G.H. Choi, N.K. Lee, H.D. Paik // *J. Microbiol Biotechnol.* – 2021. – Vol. 31. – № 5. – P. 717–725. DOI: 10.4014/jmb.2103.03018.
309. Ding, X. Optimization of medium composition of *Lactobacillus plantarum* Y44 using Plackett-Burman and Box-Behnken designs / X. Ding, F. Qian, G. Mu, Y. Tuo // *Prep Biochem Biotechnol.* – 2023. – Vol. 53. – № 9. – P. 1058–1066. DOI: 10.1080/10826068.2023.2166957.
310. Papizadeh, M. Screening for efficient nitrogen sources for overproduction of the biomass of the functionally probiotic *L. plantarum* strain RPR42 in a cane molasses-based medium / M. Papizadeh, M. Rohani, S.N. Hosseini [et al.] // *AMB Express*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. DOI: 10.1186/s13568-020-00976-x.
311. Nochebuena-Pelcastre, X. Development of a low pollution medium for the cultivation of lactic acid bacteria / X. Nochebuena-Pelcastre, A.K. Álvarez-Contreras, M.F. Hernández-Robles [et al.] // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9. – № 12. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e22609.
312. Мамыкин, Д.С. Оптимизация состава питательной среды для производства заквасочных культур *Lactobacillus plantarum* // *Пищевые системы*. – 2021. – Vol. 4. – P. 193–198. DOI: 10.21323/26189771-2021-4-3S-193-198.
313. Wang, T. Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS-8 / T. Wang, Y. Lu, H. Yan [et al.] // *Bioprocess Biosyst Eng.* – 2020. – Vol. 43. – P. 515–528. DOI: 10.1007/s00449-019-02246-y.
314. Lu, Y. Optimization of polysaccharide conditions and analysis of antioxidant capacity in the co-culture of *Sanghuangporus vaninii* and *Pleurotus sapidus* / Y. Lu, D. Liu // *Peer J*. – 2024. – Vol. 12. DOI: 10.7717/peerj.17571.
315. Yang, J.J. Mixed culture models for predicting intestinal microbial interactions between *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in the presence of probiotic *Bacillus subtilis* / J.J.

Yang, C.C. Niu, X.H. Guo // *Benef Microbes*. – 2015. – Vol. 6. – P. 871–878. DOI: 10.3920/BM2015.0033.

316. Kimelman, H. Probiotic Bifunctionality of *Bacillus subtilis* - Rescuing Lactic Acid Bacteria from Desiccation and Antagonizing Pathogenic *Staphylococcus aureus* / H. Kimelman, M. Shemesh // *Microorganisms*. – 2019. – Vol. 7 – № 10. DOI: 10.3390/microorganisms7100407.

317. Малкова, А.В. Подбор питательной среды для культивирования посевного материала штаммов *Bacillus pumilus* // *Актуальная биотехнология*. – 2022. – № 1. – С. 104.

318. Малкова, А.В. 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 [и др.] // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2021. – Т. 11. – № 3 (38). – С. 393–402. – DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402.

319. Zhang, W. Evaluation of the Antibacterial Material Production in the Fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens*-9 from Whitespotted Bamboo Shark (*Chiloscyllium plagiosum*) / W. Zhang, L. Wei, R. Xu [et al.] // *Mar Drugs*. – 2020. – Vol. 18. – № 2. DOI: 10.3390/md18020119.

320. Евдокимов, И.Ю. Влияние уровня pH на показатели глубинного культивирования пробиотических штаммов *Bacillus* / И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова [и др.] // *Ползуновский вестник*. – 2023. – № 1. – С. 29–36. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.004.

321. Popova-Krumova, P. Lactic Acid Production by *Lactiplantibacillus plantarum* AC 11S-Kinetics and Modeling / P. Popova-Krumova, S. Danova, N. Atanasova, D. Yankov // *Microorganisms*. – 2024. – Vol. 12. – № 4. DOI: 10.3390/microorganisms12040739.

322. Śliżewska, K. Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium / K. Śliżewska, A. Chlebicz-Wójcik // *Biology (Basel)*. – 2020. – Vol. 9. – № 12. DOI: 10.3390/biology9120423.

323. Khalfallah, R. Growth Kinetics of *Lactobacillus plantarum* in Sesame Seed Protein Extract Media / R. Khalfallah, M. Mechmeche, I. Jmoui [et al.] // *Chemistry Africa*. – 2022. – Vol. 6. – P. 1217–1226. DOI: 10.1007/s42250-022-00573-4.

324. Позолотина, Н.В. Технология приготовления жидкой формы ветеринарного пробиотического препарата на основе штамма *Lactobacillus paracasei* / Н.В. Позолотина,

И.В. Дармов, И.В. Маракулин, И.П. Погорельский // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2. – С. 2164–2169.

325. Ramyabharathi, S.A. Liquid formulation of endophytic *Bacillus* and its standardization for the management of *Fusarium* wilt in tomato / S.A. Ramyabharathi, L. Rajendran, G. Karthikeyan // Bangladesh Journal of Botany. – 2016. – Vol. 45. – P. 283–290.

326. Gallandat, K. Surface Cleaning and Disinfection: Efficacy Assessment of Four Chlorine Types Using *Escherichia coli* and the Ebola Surrogate Phi6 / K. Gallandat, M.K. Wolfe, D. Lantagne // Environ Sci Technol. – 2017 – Vol. 51. – № 8. – P. 4624–4631. DOI: 10.1021/acs.est.6b06014.

327. Medina, W.R.M. Sewer biofilm microbiome and antibiotic resistance genes as function of pipe material, source of microbes, and disinfection: field and laboratory studies / W.R.M. Medina, A. Eramo, M. Tu, N.L. Fahrenfeld // Environ Sci (Camb). – 2020. – Vol. 6. – № 8. – P. 2122–2137. DOI: 10.1039/d0ew00265h.

328. Tuominen, K. Survival of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 on different surface materials / K. Tuominen, S. Frosth, K. Pedersen [et al.] // Acta Vet. Scand. – 2023. – Vol. 65. – № 1. DOI: 10.1186/s13028-023-00676-z.

329. Hancox, L.R. Inclusion of detergent in a cleaning regime and effect on microbial load in livestock housing / L.R. Hancox, M. Le Bon, C.E. Dodd, K.H. Mellits // Vet. Rec. – 2013. – Vol. 173. – № 7. DOI: 10.1136/vr.101392.

330. Hulbert, L.E. Stress, immunity, and the management of calves / L.E. Hulbert, S.J. Moisé // J. Dairy Sci. – 2016. – Vol. 99. – № 4. – P. 3199–3216. DOI: 10.3168/jds.2015-10198.

Акт внедрения результатов диссертационного исследования

Утверждаю
Ректор ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет», д.э.н.

С.Н. Бочаров

«20» _____ 2026 г.



Утверждаю
Директор ПЗ «Комсомольское» - филиал
ФГБНУ «Федеральный Алтайский
научный центр агробиотехнологий»

И.А. Куренинов

«20» _____ 2026 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научно-исследовательской работы

Место проведения: ПЗ «Комсомольское» - филиал ФГБНУ ФАНЦА, отделение 2,
Алтайский край, Павловский район, пос. Урожайный

Время проведения: август-декабрь 2025 г.

Настоящим актом утверждается, что результаты научно-исследовательской работы, выполненной Дудник Д.Е. под руководством директора Инжинирингового центра «Промбиотех», к.б.н. Иркитовой А.Н., внедрены в животноводческом комплексе ПЗ «Комсомольское» - филиал ФГБНУ ФАНЦА, отделение 2.

В условиях животноводческого комплекса был заложен эксперимент по определению эффективности разработанного прототипа биологического препарата на основе штаммов *Bacillus atrophaeus* RCAM06423 (Пат. № 2821008), *B. subtilis* RCAM06733, *Lactiplantibacillus plantarum* B-14828, *L. plantarum* B-14829, *L. paraplantarum* B-14830.

В результате было установлено, что обработка помещения позволяет снижать количество санитарно-показательных видов микроорганизмов на поверхностях и в подстилке. Отмечено сокращение бактерий группы кишечной палочки на 6,10-29,80%, бактерий р. *Staphylococcus* на 10,45-15,68% и дрожжевых и плесневых грибов на 8,84-22,65%. Также установлено, что среднесуточный привес телят, содержащихся в обрабатываемом помещении, превышал привес телят в необработанном помещении на 10,34-18,75%

Представители ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»

Директор ИЦ «Промбиотех», к.б.н.

М.н.с. ИЦ «Промбиотех»

Иркитова А.Н.

Дудник Д.Е.

Представители ПЗ «Комсомольское» -
филиал ФГБНУ ФАНЦА, отделение 2

Главный ветеринарный врач

Корсык Л.Н.

Акт внедрения результатов диссертационного исследования в образовательный процесс
АлтГУ

Алтайский государственный
университет, г.Барнаул,
пр. Ленина, 61

УТВЕРЖДАЮ
Первый проректор по учебной
работе Алтайского
государственного университета
Е.А. Жданова
«17» _____ 2026 г.



АКТ

Внедрения в учебный процесс на кафедре экологии, биохимии и биотехнологии
Алтайского государственного университета результатов диссертационной работы Д.Е.
Дудник на тему «Биотехнологический потенциал штаммов *Bacillus* spp. и
Lactiplantibacillus spp. и разработка биологического препарата на их основе»

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: зав. кафедрой экологии, биохимии и биотехнологии, д.б.н., профессор Соколова Г.Г., к.б.н., доцент Шарлаева Е.А., к.с.-х.н., доцент Бородулина И.Д., к.б.н., доцент Хлебова Л.П., к.б.н., доцент Бобина И.В., удостоверяем, что результаты диссертационной работы Дудник Д.Е. используются в учебном процессе кафедры экологии, биохимии и биотехнологии Алтайского государственного университета (курсы Микробиология и вирусология (бакалавриат), Промышленная биотехнология (магистратура)).

Зав. кафедрой экологии,
биохимии и биотехнологии,
д.б.н., профессор

Соколова Г.Г.

к.б.н., доцент кафедры экологии,
биохимии и биотехнологии

Шарлаева Е.А.

к.с.-х.н., доцент кафедры
экологии, биохимии и
биотехнологии

Бородулина И.Д.

к.б.н., доцент кафедры экологии,
биохимии и биотехнологии

Хлебова Л.П.

к.б.н., доцент кафедры экологии,
биохимии и биотехнологии

Бобина И.В.

Справки о депонировании и патенты на штаммы *Bacillus* spp.Справка о депонировании штамма
B. atrophaeus 7

 Russian Collection of Agricultural Microorganisms

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00
Факс 470-43-62

Выдано в ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»

1.09.2023 № 193/09

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Сетевой биоресурсной
коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства
(RCAM)

- Депозитории:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет», 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, д.61.
- Авторы:** Дудник Д.Е., Иркитова А.Н., Малкова А.В., Каргашилова Е.Н.
- Штамм *Bacillus atrophaeus* 7** обладает антагонистической активностью по отношению к видам микроорганизмов *Candida albicans*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp. и *Escherichia coli*.
- Штамм *Bacillus atrophaeus* 7** депонирован с целью проведения патентной процедуры 25 августа 2023 г. под регистрационным номером **RCAM06423**.
- Адрес коллекции:** 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: <http://www.arriam.ru>

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ, д.б.н.

В.Е. Цыганов

Заведующая RCAM, к.б.н.

В.И.Сафронова

Справка о депонировании штамма
B. safensis 6

 Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

1117545, 1-й Дорожный проезд д.1, г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

14826

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных
Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на
национальное патентное депонирование культуру:

Bacillus safensis 6

Дата депонирования: 04 декабря 2024 года

Депозитор: ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»

Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом):
производство биологических препаратов

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14826

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.

Синеокий С.П.

Справка о депонировании штамма
B. subtilis 1/8

 Russian Collection of Agricultural Microorganisms

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00
Факс 470-43-62

Выдано в ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»

13.11.2023 № 262/11

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Сетевой биоресурсной
коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства
(RCAM)

- Депозитории:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет», 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, д.61.
- Авторы:** Дудник Д.Е., Иркитова А.Н., Малкова А.В., Кожевникова Е.Н.
- Штамм *Bacillus subtilis* 1/8** является продуцентом амилотических ферментов, обладает антагонистической активностью по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus* spp. и *Candida albicans*.
- Штамм *Bacillus subtilis* 1/8** депонирован с целью проведения патентной процедуры 13 ноября 2023 г. под регистрационным номером **RCAM06733**.
- Адрес коллекции:** 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: <http://www.arriam.ru>

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ, д.б.н.

В.Е. Цыганов

Заведующая RCAM, к.б.н.

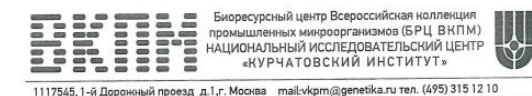
В.И.Сафронова

Патент на штамм *B. atrophaeus* 7Изменение сведений в патенте на штамм *B. atrophaeus* 7

продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ В

Патент на штамм *B. subtilis* 1/8



Справки о депонировании штаммов *Lactiplantibacillus* spp.Справка о депонировании штамма
L. plantarum М

14829

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Lactiplantibacillus plantarum М

Дата депонирования: 04 декабря 2024 года

Депозитор: ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»

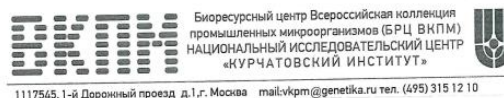
Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом): пищевая промышленность

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14829

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.

Справка о депонировании штамма
L. plantarum ЛВ

14828

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Lactiplantibacillus plantarum ЛВ

Дата депонирования: 04 декабря 2024 года

Депозитор: ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»

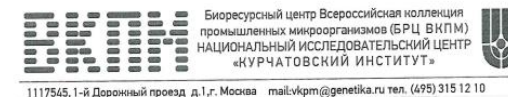
Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом): пищевая промышленность

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14828

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.

Справка о депонировании штамма
L. paraplantarum 8Б

14830

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Lactobacillus paraplantarum 8Б

Дата депонирования: 04 декабря 2024 года

Депозитор: ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»

Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом): пищевая промышленность

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14830

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.

Метаболиты штаммов *Bacillus* spp.

Относительное изменение содержания метаболитов (fold change) в культуральной жидкости штамма *B. atrophaeus* 7 по сравнению с контрольной средой (L-бульон)

№	Метаболит	fold change	№	Метаболит	fold change
1.	4-Hydroxybenzoic acid*	17,68	39.	Glucaric acid	2,40
2.	Guanine*	16,77	40.	Acadesine	2,33
3.	Quinolinic Acid	15,21	41.	4-Hydroxyphenyllactic acid*	2,28
4.	Agmatine*	15,17	42.	Phenyllactic acid	2,25
5.	Hypoxanthine	10,94	43.	Phenylpyruvate*	2,25
6.	Hydroxyproline*	10,68	44.	2,3-dihydroxybenzoic acid*	2,23
7.	1-Methyladenine*	9,99	45.	Citramalic acid*	2,23
8.	Pyridoxal	9,34	46.	2-Methylcitric acid	2,03
9.	Pantothenic acid*	7,75	47.	Mevalonic acid	2,02
10.	1-Methylnicotinamide*	7,29	48.	N-Acetyl-L-alanine_(qualifier)	1,95
11.	Urea	6,97	49.	N-acetyl spermidine	1,89
12.	N-alpha-Acetylarginine*	6,38	50.	2-Hydroxyglutarate*	1,85
13.	Guanidoacetic acid*	6,19	51.	7-Methylguanosine	1,84
14.	deoxyinosine	6,03	52.	Acetylcholine	1,81
15.	Indole-3-carboxylic acid*	5,56	53.	2-Ketohexanoic acid*	1,75
16.	7-methylguanine*	5,21	54.	Sedoheptulose monophosphate	1,74
17.	2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	5,19	55.	Myo-inositol	1,72
18.	S-adenosyl-L-methionine*	5,18	56.	Xanthurenic acid	1,70
19.	N-acetyl spermine	4,70	57.	Hippuric acid*	1,67
20.	S-ribosyl-L-homocysteine*	4,42	58.	Cytidine triphosphate*	1,64
21.	Choline	4,37	59.	4-Pyridoxic acid	1,61
22.	Homocysteine	4,32	60.	Prostaglandin J2	1,58
23.	N-acetylserine*	4,28	61.	2-Isopropylmalic acid	1,57
24.	Dimethylglycine	4,27	62.	Histidinol_(principal)	1,56
25.	Trimethylamine-N-oxide	4,24	63.	Homovanillic acid*	1,55
26.	N-acetylputrescine*	3,71	64.	Gluconolactone	1,52
27.	Dopamine*	3,59	65.	Homoarginine*	1,51
28.	Deoxyribose phosphate	3,51	66.	5-Hydroxyindoleacetic acid	1,46
29.	p-Hydroxyphenylacetic acid	3,48	67.	Indoleacrylic acid	1,46
30.	N-acetyl-glutamine*	3,44	68.	Nicotinamide Riboside	1,43
31.	Anthranilate	3,35	69.	Cinnamoylglycine	1,42
32.	2-Keto-L-gluconate	3,18	70.	Homogentisic acid	1,31
33.	Acetyllysine*	2,95	71.	homocysteic acid*	1,28
34.	1-Methylhistidine	2,72	72.	Indole*	1,27
35.	Ethanolamine*	2,65	73.	SM(d18:1/16:2 OH)	1,27
36.	Uracil	2,64	74.	L-Kynurenine*	1,24
37.	Aminoadipic acid*	2,53	75.	beta-Alanine*	1,22
38.	Salicyluric acid	2,45			

* - метаболит обнаружен у всех штаммов *Bacillus* spp.

Относительное изменение содержания метаболитов (fold change) в культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 1/8 по сравнению с контрольной средой (L-бульон)

№	Метаболит	fold change	№	Метаболит	fold change
1.	4-Hydroxybenzoic acid*	5,99	37.	Imidazoleacetic acid	1,31
2.	Hydroxyproline*	5,28	38.	Ceramide(d18:1/26:0 OH)	1,29
3.	S-adenosyl-L-methionine*	4,80	39.	L-Methionine	1,29
4.	Phenylpyruvate*	4,27	40.	L-Tryptophan	1,27
5.	1-Methyladenine*	3,86	41.	N-acetylputrescine*	1,27
6.	Guanine*	3,13	42.	7-methylguanine*	1,27
7.	1-Pyrroline-5-carboxylic acid	2,79	43.	Indole*	1,26
8.	Acetyllysine*	2,73	44.	Taurocholic acid	1,25
9.	Agmatine*	2,65	45.	Methylcysteine	1,25
10.	Nicotinamide	2,64	46.	GC(18:1/20:0)	1,25
11.	Ethanolamine*	2,64	47.	PGF2alpha	1,25
12.	beta-Alanine*	2,51	48.	L-Phenylalanine	1,24
13.	O-acetylserine	2,44	49.	Suberic Acid	1,23
14.	Pantothenic acid*	2,25	50.	L-Glutaryl carnitine	1,22
15.	N-alpha-Acetylarginine*	2,21	51.	3-Phosphoglyceric acid	1,22
16.	N-acetylserine*	2,19	52.	Ceramide(d18:1/20:0)	1,21
17.	Aldosterone	2,03	53.	homocysteic acid*	1,21
18.	N-acetyl-glutamine*	1,95	54.	3-Hydroxyhexanoyl carnitine	1,20
19.	Dopamine*	1,95	55.	2,3-dihydroxybenzoic acid*	1,19
20.	Guanidoacetic acid*	1,86	56.	Itaconic acid	1,18
21.	Indole-3-carboxylic acid*	1,84	57.	Homovanillic acid*	1,17
22.	4-Hydroxyphenyllactic acid*	1,81	58.	Creatinine	1,15
23.	N-Acetylglutamic acid	1,64	59.	9-Decenoyl carnitine	1,15
24.	2-Ketohexanoic acid*	1,58	60.	Acetoacetic acid	1,14
25.	2-Octenoyl carnitine	1,57	61.	Purine	1,14
26.	Citramalic acid*	1,52	62.	Homoarginine*	1,13
27.	L-Tyrosine	1,49	63.	Allantoin	1,12
28.	L-Kynurenine*	1,48	64.	2-Hydroxyglutarate*	1,12
29.	Cytidine triphosphate*	1,46	65.	Inosine diphosphate	1,11
30.	Azelaic acid	1,44	66.	Propionyl carnitine	1,10
31.	11,12-DiHETrE	1,43	67.	1-Methylnicotinamide*	1,09
32.	S-ribosyl-L-homocysteine*	1,41	68.	Xanthine	1,09
33.	Tiglylglycine	1,41	69.	Aminoadipic acid*	1,08
34.	Hippuric acid*	1,37	70.	Sebacic acid	1,06
35.	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate	1,37	71.	Tetranor-PGEM	1,06
36.	1-Methyladenosine	1,32			

* - метаболит обнаружен у всех штаммов *Bacillus* spp.

Метаболиты штаммов *Lactiplantibacillus* spp.

Относительное изменение содержания метаболитов (fold change) в культуральной жидкости штамма *L. plantarum* ЛВ по сравнению с контрольной средой (MRS)

№	Метаболит	fold change
1.	4-Hydroxyphenyllactic acid*	27,93
2.	L-Lactic acid*	27,45
3.	Acetylcholine*	22,10
4.	Phenyllactic acid*	20,96
5.	3-Aminoisobutyric acid*	12,10
6.	S-ribosyl-L-homocysteine*	7,59
7.	S-adenosyl-L-methionine*	6,37
8.	PG(34:1)*	4,77
9.	O-acetylserine*	4,72
10.	THC 18:1/24:1	4,21
11.	N-acetyl spermidine*	4,20
12.	THC 18:1/24:0	2,65
13.	Acetylphosphate*	2,49
14.	BMP(18:1/16:0)	2,49
15.	N-acetylserine	2,08
16.	2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	1,92
17.	Citrulline (qualifier)	1,92
18.	2-Hydroxyglutarate*	1,86
19.	Glycerol 3-phosphate*	1,81
20.	Citrulline (principal)	1,67
21.	5,6-DHET	1,63
22.	Adenosine monophosphate*	1,60
23.	Glycine*	1,54
24.	2-Isopropylmalic acid	1,50
25.	Uridine 5-monophosphate*	1,47
26.	Deoxyribose phosphate	1,46
27.	Guanidoacetic acid	1,42
28.	L-Kynurenine	1,41
29.	Arginine	1,40
30.	N-alpha-Acetylarginine*	1,34
31.	PE(32:1)	1,32
32.	Uric acid*	1,31
33.	Ethanolamine*	1,28
34.	Guanosine monophosphate*	1,28
35.	Orotidine monophosphate	1,24
36.	Acetyllysine*	1,22
37.	Hypoxanthine	1,19
38.	3-Phosphoglyceric acid	1,16
39.	Arginine	1,16
40.	N-acetyl-glutamine*	1,08

* - метаболит обнаружен у всех штаммов *Lactiplantibacillus* spp.

Относительное изменение содержания метаболитов (fold change) в культуральной жидкости штамма *L. plantarum* М по сравнению с контрольной средой (MRS)

№	Метаболит	fold change	№	Метаболит	fold change
1.	L-Lactic acid*	28,10	31.	Glycerophosphocholine	1,60
2.	Phenyllactic acid*	24,97	32.	PE(32:1)	1,56
3.	Acetylcholine*	20,62	33.	Guanidinoacetic acid	1,53
4.	3-Aminoisobutyric acid*	14,25	34.	L-Valine	1,53
5.	S-ribosyl-L-homocysteine*	6,78	35.	L-Kynurenine	1,50
6.	4-Hydroxyphenyllactic acid*	6,62	36.	Deoxyribose phosphate	1,48
7.	Purine	5,37	37.	Adenosine monophosphate*	1,47
8.	Tyramine	5,03	38.	Ethanolamine*	1,45
9.	PG(34:1)*	5,01	39.	Methylmalonic acid	1,43
10.	N-acetyl spermidine*	4,83	40.	Deoxythymidine diphosphate (qualifier)	1,42
11.	THC 18:1/24:1	3,93	41.	2,3-dihydroxybenzoic acid	1,42
12.	O-acetylserine*	3,88	42.	Orotidine monophosphate	1,42
13.	2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	3,67	43.	Acetyllysine*	1,40
14.	BMP(18:1/16:0)	3,41	44.	Phosphorylcholine	1,39
15.	THC 18:1/24:0	3,32	45.	Guanosine monophosphate*	1,39
16.	2-Hydroxyglutarate*	3,25	46.	Succinic acid	1,37
17.	N-acetylserine	2,59	47.	Hydroxyproline	1,36
18.	BMP(16:0/16:0)	2,50	48.	N-alpha-Acetylarginine*	1,35
19.	Ornithine	2,47	49.	L-Glutaryl carnitine	1,35
20.	Acetylphosphate*	2,42	50.	3-Hydroxyhexanoyl carnitine	1,31
21.	S-adenosyl-L-methionine*	2,24	51.	Betaine aldehyde	1,28
22.	5,6-DHET	2,11	52.	Ceramide(d18:1/24:1)	1,27
23.	Glycerol 3-phosphate*	2,01	53.	Arachidonic Acid	1,27
24.	Guanidoacetic acid	1,96	54.	Docosahexaenoic acid	1,26
25.	Glycine*	1,95	55.	Creatine	1,21
26.	GC(18:1/24:0)	1,86	56.	N-acetyl-L-alanine (principal)	1,21
27.	Cytidine triphosphate	1,78	57.	N-acetyl-glutamine*	1,16
28.	Uridine 5-monophosphate*	1,65	58.	Cytidine monophosphate	1,16
29.	Adenosine phosphosulfate (principal)	1,64	59.	DL-2-Aminooctanoic acid	1,14
30.	Uric acid*	1,59	60.	Ceramide(d18:1/24:0)	1,08

* - метаболит обнаружен у всех штаммов *Lactiplantibacillus* spp.

Относительное изменение содержания метаболитов (fold change) в культуральной жидкости штамма *L. paraplantarum* 8Б по сравнению с контрольной средой (MRS)

№	Метаболит	fold change	№	Метаболит	fold change
1.	L-Lactic acid*	26,05	29.	Guanidinoacetic acid	1,67
2.	Acetylcholine*	25,27	30.	Ceramide(d18:1/22:1)	1,67
3.	4-Hydroxyphenyllactic acid*	22,14	31.	Pipecolic acid	1,63
4.	Phenyllactic acid*	18,83	32.	Hydroxyproline	1,62
5.	O-acetylserine*	14,10	33.	Acetyllysine*	1,60
6.	N-acetyl-glutamate	9,37	34.	L-Valine	1,57
7.	S-ribosyl-L-homocysteine*	5,42	35.	Ceramide(d18:1/18:0)	1,53
8.	2-Hydroxyglutarate*	5,25	36.	Androsterone sulfate	1,45
9.	Malic acid	4,10	37.	N-alpha-Acetylarginine*	1,43
10.	PG(34:1)*	3,40	38.	3-Hydroxyisovaleryl carnitine	1,43
11.	Adenosine monophosphate*	3,23	39.	16:0-d31 Ceramide	1,38
12.	Guanosine monophosphate*	2,50	40.	Adenosine triphosphate	1,33
13.	Cytidine triphosphate	2,33	41.	N-acetyl-glutamine*	1,32
14.	N-acetyl spermidine*	2,32	42.	3-Phosphoglyceric acid	1,28
15.	Glycerol 3-phosphate*	2,27	43.	Phosphorylcholine	1,27
16.	2-Deoxyguanosine 5-monophosphate	2,25	44.	Ceramide(d18:1/24:0)	1,27
17.	Ceramide(d18:1/24:0 OH)	2,23	45.	3-Aminoisobutyric acid*	1,25
18.	Uridine 5-monophosphate*	2,22	46.	Ceramide(d18:1/26:1)	1,22
19.	Ethanolamine*	1,98	47.	Hexanoylcarnitine	1,22
20.	Acetylphosphate*	1,95	48.	Myristoylcarnitine	1,18
21.	1-Pyrroline-5-carboxylic acid	1,88	49.	Ceramide(d18:1/20:0)	1,18
22.	Ceramide(d18:1/24:2)	1,88	50.	Zymosterol	1,15
23.	S-adenosyl-L-methionine*	1,85	51.	3, 5-Tetradecadiencarnitine	1,12
24.	Glycine*	1,77	52.	Ceramide(d18:1/16:0)	1,08
25.	Uric acid*	1,73	53.	9-Decenoylcarnitine	1,07
26.	Creatine	1,73	54.	Ceramide(d18:1/16:1 OH)	1,07
27.	Adenosine phosphosulfate	1,73	55.	Cyanocobalamin	1,07
28.	Glycerophosphocholine	1,72			

* - метаболит обнаружен у всех штаммов *Lactiplantibacillus* spp.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Нормативно-техническая документация на производство опытных партий биологического препарата

Приказ об утверждении технологической инструкции



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Алтайский государственный университет»

П Р И К А З

04.02.2026

№122/П

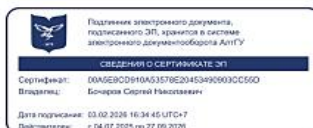
ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ИНСТРУКЦИИ

В связи с производственной необходимостью

П Р И К А З Ы В А Ю:

Утвердить прилагаемую технологическую инструкцию на производство опытных партий биологического препарата на основе бацилл и лактобактерий для обработки подстилки и помещений сельскохозяйственного назначения.

Ректор



С.Н. Бочаров

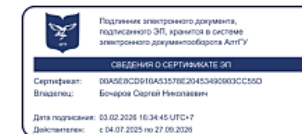
Технологическая инструкция

Приложение (-ия) к приказу ректора от 04.02.2026 №122/П

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 579.66

УТВЕРЖДАЮ



Технологическая инструкция на производство опытных партий биологического препарата на основе бацилл и лактобактерий для обработки подстилки и помещений сельскохозяйственного назначения

РАЗРАБОТАНО:
Директор ИЦ «Промбиотех»
Иркитова А.Н.

Барнаул
2026

Приказ об утверждении технических условий



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Алтайский государственный университет»

П Р И К А З

04.02.2026

№123/П

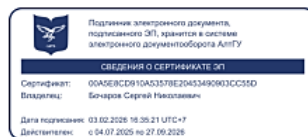
ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ТЕХНИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ

В связи с производственной необходимостью

П Р И К А З Ы В А Ю:

Утвердить прилагаемые технические условия «Биологический препарат на основе бацилл и лактобактерий для обработки подстилки и помещений сельскохозяйственного назначения»

Ректор



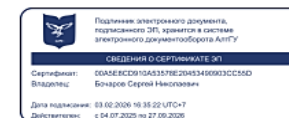
С.Н. Бочаров

продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ Ж

Технические условия

Приложение (-ия) к приказу ректора от 04.02.2026 №123/П

УТВЕРЖДАЮ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

(ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»)

ОКПД2 10.89.19.290

ОКС 07.100.99

Биологический препарат на основе бацилл и лактобактерий для обработки
подстилки и помещений сельскохозяйственного назначения

Технические условия

ТУ 10.89.19.290-008-02067818-2026

Вводятся впервые

Дата введения в действия – 02.02.2026

РАЗРАБОТАНО

ИЦ «Промбиотех», ФГБОУ ВО

«Алтайский государственный университет»

Директор, к.б.н.

Ирkitова А.Н.

И.о. замдиректора, н.с., к.б.н.

Евдокимов И.Ю.

М.н.с.

Дудник Д.Е.

М.н.с.

Ширманов М.В.

Протоколы испытаний телят на бруцеллез в возрасте 4 месяцев

УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ АЛТАЙСКОГО КРАЯ
Крайнее государственное бюджетное учреждение
"Управление ветеринарии государственной службы Алтайского края по Павловскому району"
(сокращенное наименование: КГБУ "Управление ветеринарии по Павловскому району")
Юридический адрес: 659000, Алтайский край, Павловский район, с. Павловск, переулок Боровой, дом 1
телефон 8(38581) 2-03-30 (начальник), тел. 8(38581) 2-01-67 (бухгалтерия), e-mail: vetmenzag@mail.ru

ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ
Фактический адрес осуществления деятельности:
659000, Алтайский край, Павловский район, с. Павловск, переулок Боровой, дом 1
Телефон 8 (385-81) 2-00-10, e-mail: pavlensk-vetlab@mail.ru (руководитель ИЛ)
уникальный номер записи об аккредитации в реестре аккредитованных лиц NORA.RU21AK01

УТВЕРЖДАЮ:
Ведущий ветеринарный врач ИЛ

Н.А.Бабина
03.12.2025

Протокол испытаний № 5928 от 03.12.2025

Наименование образца испытаний: Сыворотка крови от крупного рогатого скота (телки 4 месяца) принадлежащего: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ АЛТАЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ", ИНН: 2223043971, 656910, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, п. Научный Городок, д. Д. 35
заказчик: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ АЛТАЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ", ИНН: 2223043971, 656910, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, п. Научный Городок, д. Д. 35
основание для проведения лабораторных исследований: Плановые исследования (первично), животные против бруцелллёза не вакцинированы
место отбора проб: Российская Федерация, Алтайский край, Павловский район, п. Урожайный, ПЗ "Комсомольское" филиал ФГБНУ ФАНЦА, отделение №2
акт отбора проб: № 331 от 25.11.2025 г.
дата и время отбора проб: 25.11.2025 08:30
отбор проб произвел: Вет. врач Корсык Л.Н.
в присутствии: скотника Закрылина Ю.М., зоотехника Гергенрейдер Е.А.
НД, регламентирующий правила отбора: Отбор проб (образцов) произведен в соответствии с "Правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования", утв. ГУВ МСХ СССР 24.06.1971 г.
сопроводительный документ: б/н от 26.11.2025 г.
вид упаковки доставленного образца: пробирки вакуумные
состояние образца: удовлетворительное, сыворотка крови консервирована борной кислотой
объем пробы: 5 миллилитров
количество проб: 3 пробы
дата поступления: 26.11.2025 11:30
даты проведения испытаний: 26.11.2025 - 03.12.2025
структурные подразделения, проводившие исследования: Серологический отдел
фактический адрес места осуществления деятельности: ИЛ КГБУ "Управление ветеринарии по Павловскому району", Алтайский край, Павловский район, с. Павловск, переулок Боровой, дом 1.
на соответствие требованиям: нет информации
примечание: условия проведения испытаний соответствуют установленным требованиям; контактные данные заказчика: +73858129340

Результаты испытаний:

№ п/п	Идентификация (инвентарный номер, кличка животного)	Антитела к возбудителю бруцеллеза	
		Серологический	Наставление по диагностике бруцелллёза животных №13-5-02/0850, утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ 29.09.2003, п. 4.2, п. 4.3
1	Телка 4 месяца, черно-пестрая, 643099001752111	отрицательная	-
2	Телка 4 месяца, черно-пестрая, 643099001752112	отрицательная	-

Протокол № 5928 от 03.12.2025
Сгенерировано автоматизированной системой «Веста». Идентификатор документа: E0B8B48F-E9A4-47CC-BE8F-1D6EA34035B9

УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ АЛТАЙСКОГО КРАЯ
Крайнее государственное бюджетное учреждение
"Управление ветеринарии государственной службы Алтайского края по Павловскому району"
(сокращенное наименование: КГБУ "Управление ветеринарии по Павловскому району")
Юридический адрес: 659000, Алтайский край, Павловский район, с. Павловск, переулок Боровой, дом 1
телефон 8(38581) 2-03-30 (начальник), тел. 8(38581) 2-01-67 (бухгалтерия), e-mail: vetmenzag@mail.ru

ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ
Фактический адрес осуществления деятельности:
659000, Алтайский край, Павловский район, с. Павловск, переулок Боровой, дом 1
Телефон 8 (385-81) 2-00-10, e-mail: pavlensk-vetlab@mail.ru (руководитель ИЛ)
уникальный номер записи об аккредитации в реестре аккредитованных лиц NORA.RU21AK01

УТВЕРЖДАЮ:
Ведущий ветеринарный врач ИЛ

Н.А.Бабина
03.12.2025

Протокол испытаний № 5927 от 03.12.2025

Наименование образца испытаний: Сыворотка крови от крупного рогатого скота (бык 4 месяца) принадлежащего: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ АЛТАЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ", ИНН: 2223043971, 656910, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, п. Научный Городок, д. Д. 35
заказчик: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ АЛТАЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ", ИНН: 2223043971, 656910, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, п. Научный Городок, д. Д. 35
основание для проведения лабораторных исследований: Плановые исследования (первично), животные против бруцелллёза не вакцинированы
место отбора проб: Российская Федерация, Алтайский край, Павловский район, п. Урожайный, ПЗ "Комсомольское" филиал ФГБНУ ФАНЦА, отделение №2
акт отбора проб: № 330 от 25.11.2025 г.
дата и время отбора проб: 25.11.2025 08:30
отбор проб произвел: Вет. врач Корсык Л.Н.
в присутствии: скотника Закрылина Ю.М., зоотехника Гергенрейдер Е.А.
НД, регламентирующий правила отбора: Отбор проб (образцов) произведен в соответствии с "Правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования", утв. ГУВ МСХ СССР 24.06.1971 г.
сопроводительный документ: б/н от 26.11.2025 г.
вид упаковки доставленного образца: пробирка вакуумная
состояние образца: удовлетворительное, сыворотка крови консервирована борной кислотой
объем пробы: 5 миллилитров
количество проб: 1 проба
дата поступления: 26.11.2025 11:30
даты проведения испытаний: 26.11.2025 - 03.12.2025
структурные подразделения, проводившие исследования: Серологический отдел
фактический адрес места осуществления деятельности: ИЛ КГБУ "Управление ветеринарии по Павловскому району", Алтайский край, Павловский район, с. Павловск, переулок Боровой, дом 1.
на соответствие требованиям: нет информации
примечание: условия проведения испытаний соответствуют установленным требованиям; контактные данные заказчика: +73858129340

Результаты испытаний:

№ п/п	Идентификация (инвентарный номер, кличка животного)	Антитела к возбудителю бруцеллеза	
		Серологический	Наставление по диагностике бруцелллёза животных №13-5-02/0850, утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ 29.09.2003, п. 4.2, п. 4.3
1	Бык, 4 месяца, черно-пестрый, 653099001752114	отрицательная	-

Применяемое оборудование:
Протокол № 5927 от 03.12.2025
Сгенерировано автоматизированной системой «Веста». Идентификатор документа: C5E43215-F316-4C61-A0B3-AD5CF0C75834