

При промышленном разведении креветок, ракообразных и других представителей аквакультуры фермеры часто встречаются с различными инфекциями объектов производства и, как следствие, массовой смертностью водных животных. К болезнетворным микроорганизмам в водной среде относятся представители р. *Vibrio*, *Salmonella*, *Escherichia* и многие др. Для предотвращения крупных потерь при воспроизводстве промысловых объектов, долгие годы применялись антибиотики, что со временем приводило к развитию генов резистентности к ним у большинства микроорганизмов. Чтобы устойчивость бактерий к антибиотикам не привела к экологической катастрофе, стоит задача поиска более безопасных способов борьбы с патогенными организмами. В связи с этим производители все чаще используют пробиотики в качестве профилактики и комплексном лечении инфекционных заболеваний.

Научная новизна

1. Впервые описаны биотехнологические свойства новых ризосферных штаммов *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249, выделенных из растений Алтайского края. Выявлен высокий антагонистический эффект к представителям патогенной и условно-патогенной микрофлоры животных и аквакультуры. Определена антибиотикорезистентность исследуемых штаммов к антибиотикам, используемым в хозяйствах. Описан широкий профиль метаболитов обеих бацилл, обеспечивающий возможность для использования их в качестве основы разных биопродуктов.

2. Разработана и описана наиболее эффективная технология производства пробиотического препарата, проявляющаяся в краткосрочном биотехнологическом цикле, использовании дешевых компонентов промышленных сред, получении максимального выхода биомассы и численности микроорганизмов.

3. Впервые получены данные использования нового пробиотического препарата в производстве аквакультуры: подтверждена стимулирующая активность на выклев рачков артемии, зафиксирован более ранний выход из личиночной стадии креветок Розенберга, а также снижение концентрации токсичных соединений в установках замкнутого водоснабжения.

Практическая значимость работы для Российского рынка биотехнологических продуктов

1. Фонд Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов пополнился двумя штаммами бацилл с важными технологическими свойствами.

2. Результаты выполненной работы расширяют знания о биотехнологических возможностях бацилл. Разработанная технология подтверждает устойчивость новых штаммов к условиям промышленного культивирования, заморозке, сушке и сателлитных технологических процедурах. Это имеет значение как для фундаментальных, так и прикладных исследований в области промышленной микробиологии, а также при разработке новых биопрепаратов.

3. Пробиотик прошел промышленные испытания на объектах аквакультуры, зарекомендовав себя как эффективный биологический препарат, способствующий улучшению санитарного фона предприятий, производящих аквакультуры, и предотвращающий распространение инфекционных заболеваний среди водных животных.

4. В соответствии с приоритетными направлениями научно-технологического развития Российской Федерации создание новых биологических препаратов на основе безопасных и полезных микроорганизмов способствует переходу к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству. Результаты работы способствуют развитию экономики Алтайского края и Российской Федерации в целом, переходу к органическому сельскому хозяйству, а также независимости РФ от импортных биопрепаратов.

На производство препарата зарегистрированы нормативно-технические документы: ТУ 10.92.10-001-02067818-2022 и ТИ (приказ ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» №589/п), получен патент (Пат. 2799554), зарегистрирован каталожный лист продукции № 080/007923. Технология производства данного препарата экономически эффективна и обеспечивает получение качественного готового продукта.

В качестве объекта исследования при разработке пробиотика использованы 2 штамма споровых бактерий из собственной коллекции, депонированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (таблица 1).

Таблица 1. Штаммы бацилл, использованные в исследовании

Штамм	Источник выделения	Номер регистрации в ВКПМ	Морфология
<i>B. toyonensis</i>	Ризосфера р. <i>Helianthus</i>	В-13249	Палочки (около 1 мкм), чаще расположенные парами или цепочками. Колонии на L-среде грязно-белого цвета, 1,0–1,2 см, блестящие, приподнятые, с неровным краем.
<i>B. pumilus</i>	Ризосфера р. <i>Cichorium</i>	В-13250	Палочки (около 0,7 мкм), чаще расположенные одиночно или парами. Колонии на L-среде белого цвета, с максимальным диаметром 0,5–0,8 см, матовые, приподнятые, ровной округлой формы, со складчатой каймой.

Оба штамма образуют овальные споры, расположенные терминально или субтерминально, выдерживают нагревание в 80 °С в течение 30 минут. Внешний вид колоний представлен на рисунке 1.

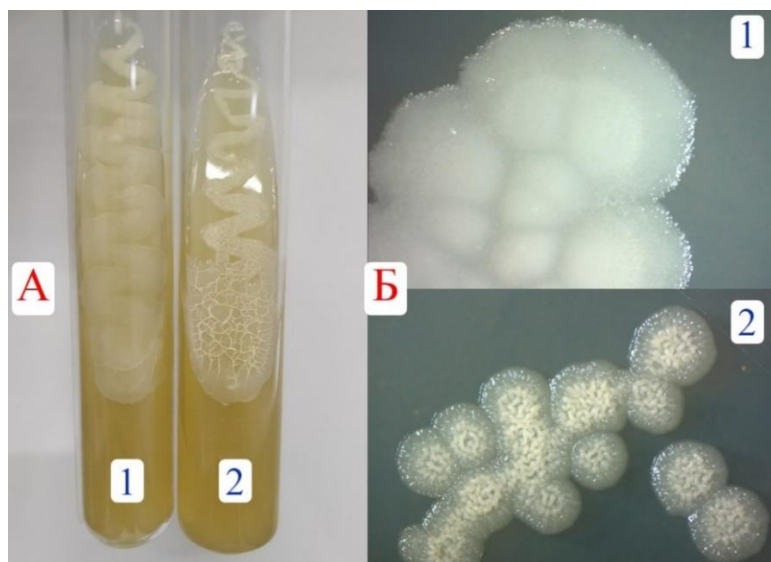


Рисунок 1 – Внешний вид штаммов бацилл: А – чистые культуры на скошенном агаре, Б – колонии на L-агаре, $\times 10$. 1 – штамм *B. toyonensis* В-13249; 2 – штамм *B. pumilus* В-13250

Для данных штаммов определен комплекс культурально-биохимических свойств для последующего эффективного включения их в биотехнологическое производство биологических препаратов, в том числе для аквакультуры:

1) штаммы проявили антагонизм к большому количеству патогенных и условно-патогенных микроорганизмам, вызывающих инфекционные заболевания человека и животных;

2) штаммы *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 чувствительны к широкоприменяемым в животноводстве, птицеводстве и аквакультурном производстве антибиотикам: олеандомицины, энрофлоксацины, мономицины, цефалексины, бензилпенициллины и не чувствительны к оксациллину;

3) доказано накопление метаболитов класса белков природы у обоих штаммов: *B. pumilus* В-13250 в нативном растворе содержит как минимум 3 белка, размером ~ 22, ~34 и ~57 кДа, *B. toyonensis* В-13249 накапливает хорошо различимые белки размером ~ 36 и ~ 50 кДа. Для определения других классов метаболитов использован наиболее точный и современный метод ВЭЖХ-МС/МС, обнаружена продукция 117 разных метаболитов (из них 43 одинаковых и по 37 уникальных), в большом количестве аминокислоты, витамины группы В, гормоны, органические кислоты и ряд других.

На основе обозначенных высокоэффективных микроорганизмов разработана технология и подобраны оптимальные условия производства пробиотического препарата: посевная среда – L-бульон, основная ферментационная – МК-ОС; доза посевного материала – 1%; температура выращивания обоих штаммов – 37 °С; рН – 6,8; время ферментации каждого штамма 24 ч; режим проточного центрифугирования – 100–130 л/ч при 15000 об./мин; время лиофильной сушки 40 ч; время заморозки в камере сублиматора 8 ч при температуре –35 °С или не менее 12 ч при температуре – 20–25°С; для стандартизации – 60 мин перемешивания до однородности продукта 98%. На рисунке 2 представлена общая схема технологии производства пробиотического препарата для аквакультур.



Рисунок 2 – Схема эксперимента. Этапы 1–6 реализуются для каждого штамма отдельно

Готовая форма пробиотического препарата стандартизована ориентируясь на численность бактерий в сухих концентратах, по отношению к массе наполнителя. Характеристика нового пробиотического препарата представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика полученного пробиотического препарата для аквакультур

Наименование показателя	Значение показателя	Метод анализа
Внешний вид	Порошок, состоящий из наполнителя – мальтодекстрина и лиофильно высушенных концентратов бактерий. Допускается незначительное количество комочков, рассыпающихся при легком механическом воздействии.	Визуальный
Цвет	От белого до светло-кремового с бурыми вкраплениями концентратов бактерий	Визуальный
Вкус и запах	Запах, характерный для мальтодекстрина, слегка сладковатый	Вкусовой, обонятельный
Массовая доля влаги, %, не более	5,0	ГОСТ 24061-2012
Количество жизнеспособных клеток <i>B. pumilus</i> B-13250, <i>B. toyonensis</i> B-13249, КОЕ/г, не менее	1×10^{10}	ГОСТ 31928-2013
Токсичность	Не токсичный	ГОСТ 31674-2012
Микробиологическая чистота	Не допускается наличие патогенной микрофлоры (бактерии рода <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; семейства <i>Enterobacteriaceae</i>).	ГОСТ Р 55291-2012

Установлен срок хранения препарата. Для установления минимального срока хранения на протяжении 12 месяцев оценивали динамику численности бацилл и посторонней микрофлоры. На протяжении всего времени, численность целевых микроорганизмов сохранилась не ниже 1×10^{10} КОЕ/г (рисунке 3).

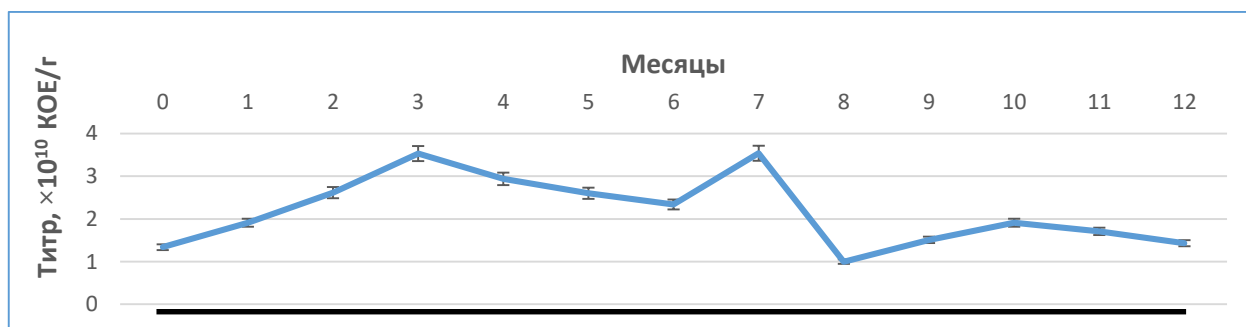


Рисунок 3 – Изменение численности бацилл в готовом препарате в ходе хранения

Промышленные испытания препарата на объектах аквакультуры

Испытание препарата на артемии. Исследование показало, что в двух разных партиях цист артемии добавление пробиотического препарата дало положительный эффект. Наилучшие результаты выклева представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты 48 часов инкубации цист партии

№ партии	Навеска препарата (г) на 2 г цист	Процент выклева (HR), %	Коэффициент вариации (CV), % (по HR)	Коэффициент биомассы
1	0,10	96,53 ($\pm 2,91$)	3,0	3,70
2	0,10	88,76 ($\pm 5,66$)	6,4	3,40

Процент выклева при добавлении пробиотического препарата к партии №1 менялся в лучшую сторону (на 1,4% максимально). При добавлении к партии №2 отмечали прирост HR примерно на 10%.

Выявлен положительный эффект также и на выход биомассы, выраженный в массе рачков, полученных после инкубации (рисунок 4).

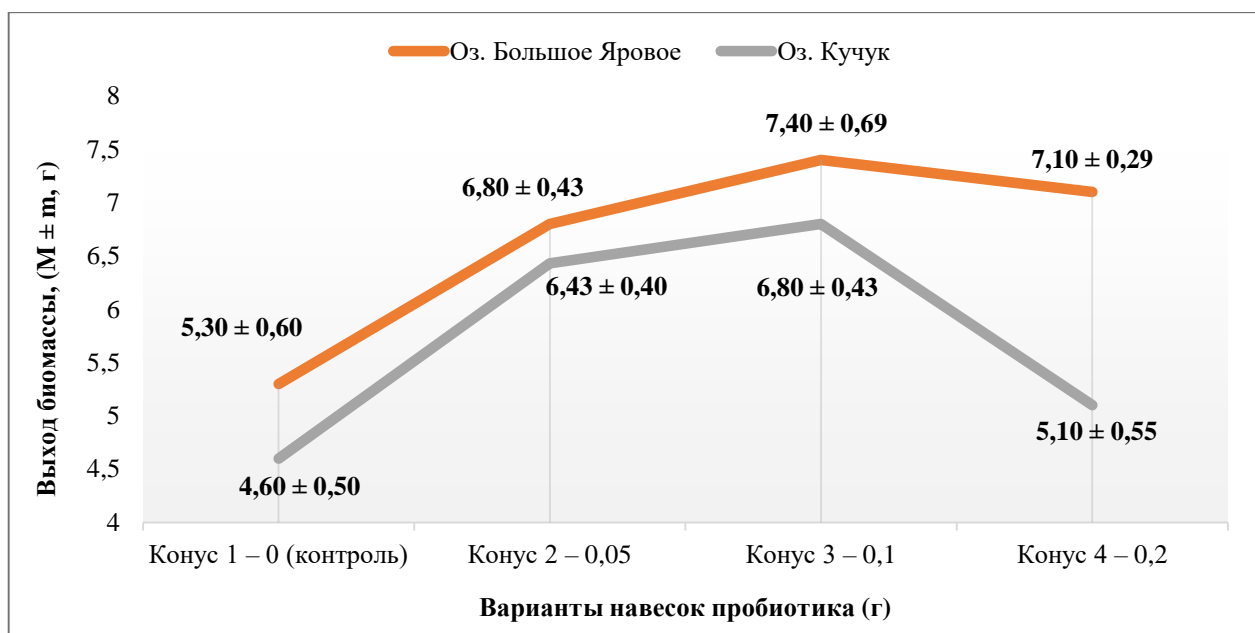


Рисунок 4 – Корреляция между концентрацией пробиотического препарата и выходом биомассы

Из представленных результатов следует, что лучшие показатели процента выклева и выходу биомассы достигнуты при добавлении 0,1 г препарата к 2 г сухих цист.

Достигнутый экономический эффект от внедрения.

Оценочная стоимость разработанного пробиотического препарата – 3 тыс. руб. за 1 кг готового продукта, при определенной наиболее эффективной норме расхода препарата в 0,1 г на 2 г цист артемии имеются прогнозные данные по выручке от реализации и экономической эффективности применения данного биопрепарата. Наиболее выгодно применение препарата для партий цист артемии с начальным выклевом менее 80% – экономический эффект составляет 46,55%, а экономическая эффективность – 13,34 руб./руб.

Дополнительные испытания проводились на широко культивируемом и коммерчески важном виде – креветках Розенберга. В опытной группе наблюдали более ранний выход *M. rosenbergii* из личиночной стадии – на 18 день. В контрольной группе – на 28 день (рисунок 5).

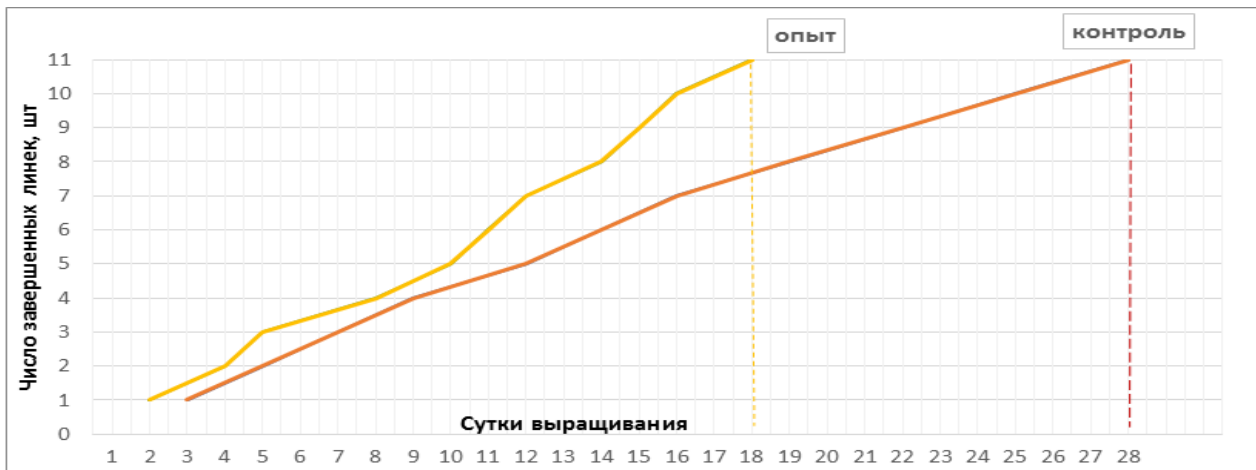


Рисунок 5 – Сроки завершения метаморфоза личинок *M. rosenbergii* в разных группах

Выход на рынок готовых партий половозрелых креветок за счет введения в производство пробиотика, стал возможен гораздо раньше, что экономически более эффективно.

Проведены исследования влияния пробиотического препарата на гидрохимию воды в установках замкнутого водоснабжения (рисунок 6).

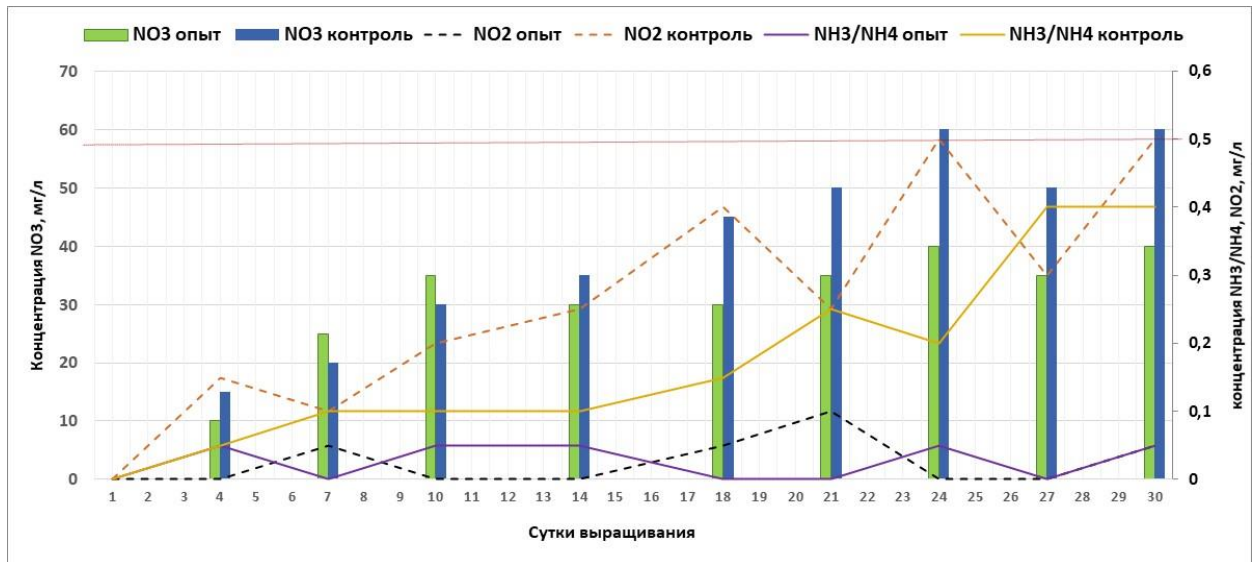


Рисунок 6 – Гидрохимический режим в опытной и контрольной системах

Концентрация аммонийного и нитритного азота в контрольной системе к окончанию эксперимента достигла верхнего предела нормы (0,5 мг/л), в опытной – нет. При норме концентрации нитрата до 50 мг/л в контрольной установке на 24 день зафиксировали пиковое значение в 60 мг/л. В опытной установке данный показатель не превышал 40 мг/л. Что дополнительно подтверждает эффективность и

последующее качество производимых партий объектов аквакультур, благодаря добавлению разработанного пробиотика.