

МРНТИ 62.09.39, 69.25.15, 34.27.39, 34.27.51

<https://doi.org/10.26577/eb.2021.v89.i4.12>

А.В. Чижаева* , А.А. Амангелды , А.Ж. Алыбаева ,
Е.А. Олейникова , М.Г. Саубенова , Ж.Н. Ермекбай ,
А.А. Айтжанова 

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Казахстан, г. Алматы

*e-mail: anna_chizhaeva@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ЦЕННЫХ ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ

Одним из ключевых пунктов новой парадигмы в работе с рисками биобезопасности аквакультуры является усиление профилактики заболеваний за счет ответственного рыбоводства, включая снижение устойчивости к противомикробным препаратам в аквакультуре и применение подходящих альтернатив противомикробным препаратам, в том числе пробиотиков. В связи с этим, актуальными становятся исследования, направленные на разработку и внедрение в практику новых эффективных пробиотиков для аквакультуры на основе безопасных микроорганизмов, способных предотвращать и лечить заболевания рыб. Целью данного научного исследования являлся поиск и исследование *in vitro* свойств новых активных штаммов молочнокислых бактерий для разработки отечественного пробиотического препарата, повышающего резистентность и продуктивность ценных видов рыб в аквакультуре. Научная и практическая значимость работы связана с получением новых знаний о толерантности различных видов и штаммов молочнокислых бактерий к неблагоприятным факторам среды, моделирующим некоторые условия желудочно-кишечного тракта ценных видов рыб. В результате данного исследования создана коллекция новых активных штаммов молочнокислых бактерий, резистентных к желчи, фенолу, соли, низким значениям pH и способных выживать в условиях желудочно-кишечного тракта рыб, а также сильных антагонистов, способных сдерживать рост патогенов, вызывающих заболевания рыб. Данная коллекция послужит основой для разработки нового эффективного отечественного пробиотика для аквакультуры.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, резистентность, антагонист, пробиотик, аквакультура.

A.V. Chizhayeva *, A.A. Amangeldi, A.Z. Alybaeva, Ye.A. Oleinikova,
M.G. Saubenova, J.N. Ermekbay, A.A. Aitzhanova

LLP «Scientific and Production Center for Microbiology and Virology,» Kazakhstan, Almaty

*e-mail: anna_chizhaeva@mail.ru

***In vitro* investigation of probiotic properties new strains of lactic acid bacteria valuable for aquaculture**

One of the key points of new paradigm in addressing aquaculture biosafety risks is to enhance disease prevention through responsible fish farming, including reducing antimicrobial resistance in aquaculture and the use of suitable alternatives to antimicrobials, such as probiotics. In this regard, research aimed at the development and implementation of new, effective probiotics for aquaculture based on safe microorganisms capable of preventing and treating fish diseases becomes relevant. The purpose of this scientific investigation was to search and study *in vitro* the properties of new active strains of lactic acid bacteria for the development of domestic probiotic preparation that increases the resistance and productivity of valuable fish species in aquaculture. The scientific and practical significance of the work is associated with obtaining new knowledge about the tolerance of various species and strains of lactic acid bacteria to adverse environmental factors that model some conditions of the gastrointestinal tract of valuable fish species. In result of this study, a collection of new active strains of lactic acid bacteria resistant to bile, phenol, salt, low pH values and capable of surviving in the gastrointestinal tract of fish, as well as strong antagonists capable of restraining the growth of pathogens causing fish diseases was created. This collection will serve as the basis for the development of a new effective domestic probiotic for aquaculture.

Key words: lactic acid bacteria, resistance, antagonist, probiotic, aquaculture.

А.В. Чижаева*, А.А. Амангелді, А.Ж. Алыбаева, Е.А. Олейникова,
М.Г. Саубенова, Ж.Н. Еремекбай, А.А. Айтжанова

«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: anna_chizhaeva@mail.ru

Аквакультураға бағалы сүтқышқылды бактериялардың жаңа штамдарының пробиотикалық қасиеттерін *in vitro* зерттеу

Аквакультураның биоқауіпсіздік қаупімен күресуде жаңа парадигманың негізгі нүктелерінің бірі – аквакультурада микробқа қарсы төзімділікті төмендету және пробиотиктермен қоса микробқа қарсы қолайлы баламаларды қолдану арқылы жауапты балық өсіру арқылы аурудың алдын алуды күшейту. Осыған байланысты балық ауруларының алдын алатын және емдей алатын қауіпсіз микроорганизмдерге негізделген аквакультураға арналған жаңа, тиімді пробиотиктерді әзірлеуге және енгізуге бағытталған зерттеулер өзекті бола бастады. Бұл зерттеудің мақсаты – аквакультурадағы бағалы балық түрлерінің төзімділігі мен өнімділігін арттыратын отандық пробиотикалық препаратты әзірлеуге арналған сүтқышқылды бактериялардың жаңа белсенді штамдарының қасиеттерін іздеу және *in vitro* зерттеу. Жұмыстың ғылыми-практикалық маңыздылығы бағалы балық түрлерінің асқазан-ішек жолдарының белгілі бір жағдайларын имитациялайтын қолайсыз экологиялық факторларға әр түрлі түрлер мен сүтқышқылды бактериялардың төзімділігі туралы жаңа білім алумен байланысты. Зерттеу нәтижесінде өт қышқылына, фенолға, тұзға төзімді және балықтың асқазан-ішек жолдары жағдайында өмір сүруге қабілетті сүтқышқылды бактериялардың жаңа белсенді штамдарының жиынтығы, сондай-ақ күшті антагонистер балық ауруларын тудыратын қоздырғыштардың өсуін тежеу құрылды. Бұл жинақ аквакультураға арналған жаңа тиімді отандық пробиотикті әзірлеуге негіз болады.

Түйін сөздер: сүтқышқылды бактериялар, төзімділік, антагонист, пробиотик, аквакультура.

Сокращения и обозначения

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения, FAO – Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединённых Наций, США – Соединенные Штаты Америки, МКБ – молочнокислые бактерии, GRAS – обычно считаются безопасными, FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, QPS – квалифицированная презумпция безопасности, EFSA – Европейское управление по безопасности пищевых продуктов, ATCC – Американская коллекция типовых культур, MAR – множественная антибиотикоустойчивость, КОЕ – колониеобразующие единицы, рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, АТФ – аденозинтрифосфат.

Введение

Рыба и рыбные продукты признаны не только одними из самых здоровых продуктов на планете, но также одними из менее вредных для окружающей среды. ВОЗ рекомендует употреблять не менее 16 кг рыбной продукции в год на человека. Помимо этого, большая часть населения в мире зависит от рыбы как основного источника белка. Аквакультура является одним

из секторов рыбного промысла, занимающегося разведением и выращиванием водных организмов (рыб, ракообразных, моллюсков, водорослей) в естественных и искусственных водоёмах, а также на специально созданных морских плантациях. В 2018 году этот сектор рыбного хозяйства являлся значимым источником рыбы, употребляемой в пищу, его продукция составила 52 процента от общего объема [1-3]. Это динамично развивающаяся отрасль рыбоводства, которая основывается на интенсивных технологиях. Однако, болезни водных животных, вызываемые вирусными, бактериальными, паразитическими и грибковыми инфекциями, служат причиной экономических потерь во многих странах (например, в США – до 6 млрд. долл. в год) и являются одним из основных ограничивающих факторов для расширения отрасли аквакультуры [4-7].

Обычно, для профилактики, лечения или борьбы с инфекционными заболеваниями у культивируемых рыб используются вакцины, химические препараты, включая антибиотики. [8-10]. Однако, использование химиотерапевтических средств в аквакультуре может вызвать несколько проблем, включая повышение бактериальной резистентности и появление устойчивых к лекарственным средствам бактерий, которые могут передаваться через пищевую цепь

от рыбы к человеку [11]; а также, остаточное действие антибиотиков в съедобных тканях, что может вызвать проблемы со здоровьем у человека и нанести ущерб водным экосистемам [12-16].

В качестве многообещающего средства для уменьшения зависимости от антибиотиков, вакцин и других лекарственных препаратов, улучшения здоровья рыб в аквакультуре могут служить пробиотики, что подтверждено различными исследованиями [17-26]. Пробиотики определяются как микробные клетки или соединения, которые оказывают благотворное влияние на здоровье их хозяина [27,28]. Применение пробиотиков как профилактического средства или в качестве защитного соединения позволяет предотвратить распространение заболеваний, улучшить состав желудочно-кишечной микробной флоры, увеличить эффективность конверсии корма, улучшить состояние воды в водоеме, повысить врожденный иммунитет, снизить стрессовое состояние и повысить сопротивляемость болезням [29-37].

Микроорганизмы, которые обычно используются в аквакультуре как пробиотики включают дрожжи, бактерии и водоросли [38]. Ко всем пробиотическим штаммам для аквакультуры предъявляются определенные требования: они не должны обладать патогенностью в отношении рыб [39]; не должны содержать генов устойчивости к антибиотикам, кодируемых плазмидой [40]; должны быть устойчивыми к высоким и низким значениям pH среды и высоким концентрациям желчи; должны обладать высокой адгезионной способностью; иметь высокую антагонистическую активность в отношении возбудителей болезней рыб; иметь высокую ферментативную активность; иметь местное происхождение [20]. Молочнокислые бактерии (МКБ), отвечают этим требованиям и могут быть весьма успешными микроорганизмами для создания пробиотиков для рыб на их основе. МКБ являются представителями микробиоты рыб [41], они обладают антагонистической активностью к условно-патогенным бактериям, дрожжам и плесневым грибам (*B. subtilis*, *S. aureus*, *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium sp.* и др.), возбуждающим инфекции рыб, микробиологическую порчу кормов, загрязняющим водоемы. Лактобактерии являются безопасными микроорганизмами, т.к. имеют статус GRAS (FDA) и статус QPS (EFSA) [42]. Они продуцируют антагонистически активные метаболиты – органические кислоты, CO₂,

H₂O₂, жирные кислоты, антибиотики (Реутерин) и бактериоцины (Низин, Лейкоцин, Сакацин, Педиоцин PAI/AcH, Энтероцины AS-48, A and B, другие) [43-45]. Применение пробиотиков на основе молочнокислых бактерий в аквакультуре повышает устойчивость к инфекциям и стрессовым факторам, выживаемость и продуктивность рыб [26, 46-47]. Для того, чтобы пробиотические клетки оказывали максимально положительный эффект, попав в организм водного животного, они должны обладать высокой выживаемостью при прохождении агрессивной среды желудочно-кишечного тракта хозяина [48]. Таким образом, высокая устойчивость штаммов к неблагоприятным условиям ЖКТ в сочетании с высокой антимикробной активностью против патогенов могут служить основанием для создания на их основе эффективного пробиотика.

Цель данной работы: выделение и исследование *in vitro* свойств новых активных штаммов молочнокислых бактерий для разработки отечественного пробиотического препарата, повышающего резистентность и продуктивность ценных видов рыб в аквакультуре.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись изоляты молочнокислых бактерий, выделенные из сырьевых компонентов (зерно и мука кукурузы, пшеницы, ячменя ржи, пшеничная клейковина и зародыш, кукурузный глютен и др.), входящих в рецептуры кормов для рыб. Тестами для определения антагонистической активности служили штаммы из коллекции Научно-производственного центра микробиологии и вирусологии (г.Алматы): мицелиальные грибы *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sporotrichioides*, бактерии *Escherichia coli*, *Mycobacterium citreum*, *Staphylococcus aureus*, *Sarsina flava*, *Bacillus subtilis*. Бактерии культивировали на среде Meat Infusion Agar (TM Media, Индия), мицелиальные грибы – на среде Czapek Dox Agar (TM Media, Индия).

Изоляты молочнокислых бактерий получали методом посева определенного количества сырья и его разведений на селективные питательные среды MRS Agar (TM Media, Индия) и Lactic Streak Agar (TM Media, Индия). Отдельные колонии пересеивали в стерильное обезжиренное молоко; изоляты, образующие сгусток, использовали для получения чистой культуры и дальнейших исследований их пробиотических свойств. Для культивирования чистых культур

использовали жидкую питательную среду MRS Broth (TM Media, Индия).

Исследование фенотипических признаков чистой культуры штамма: культуральные свойства колоний, морфология клеток в микроскопических препаратах (в живом и зафиксированном виде), отношение к окраске по Граму, способность к спорообразованию, а также каталазная и нитратредуцирующая активность, тест на индол, проводили общепринятыми в микробиологии методами анализа [49].

Биохимическое исследование фенотипических признаков выделенных изолятов (сахаролитический профиль) проводили с использованием бульона с бромкрезоловым пурпурным (HiMedia, Индия) и стандартных дисков, пропитанных углеводами или многоатомными спиртами.

Кислотообразующие свойства выделенных изолятов оценивали по активной (рН) и титруемой кислотности при культивировании в стерильном обезжиренном молоке, соответственно потенциометрическим или титрометрическим методами [49].

Протеолитическую активность исследовали на питательной среде следующего состава (% мас./об.): пептон -0,5; говяжий экстракт - 0,3; обезжиренное молоко -1; агар -1,8; вода -100. Молоко стерилизовали отдельно, добавляли перед использованием в стерильную расплавленную среду, тщательно перемешивали. Теплую питательную среду разливали по чашкам и давали остыть, далее агаровую среду перфорировали стерилизованной пробкой Бора и заливали в лунки суточную культуру МКБ, предварительно выращенную на MRS при соответствующей оптимальной температуре. Чашки выдерживали при 30, 37 °С в течение 48 ч инкубации и наблюдали за протеазой по зоне просветления молочной среды вокруг лунки, измеряя диаметр зоны [50].

Исследование устойчивости выделенных штаммов к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом с наложением стандартных бумажных дисков, пропитанных антимикробными препаратами на поверхность агаризованной среды MRS Agar (TM Media, Индия). Чашки Петри с питательной средой засеивали однородным газоном суточных культур лактобактерий (по 0,1 мл суспензии на одну чашку), затем на поверхность питательной среды укладывали диски, содержащие антимикробные препараты. Культивирование вели в течение 3 суток при 30° и 37°С. Чувствительность исследуемых штаммов к антибиотикам определяли по диаметру

зоны подавления роста. Индекс MAR рассчитывали согласно Krumperman [51]: количество неэффективных антибиотиков/количество использованных антибиотиков. При определении степени чувствительности штаммов к антибиотикам использовали критерии интерпретации результатов для оценки чувствительности лактобактерий, изложенные в МУ 2.3.2.2789—10 [49].

Исследование пробиотического потенциала штаммов проводили тестированием *in vitro* антагонистической активности и толерантности к неблагоприятным факторам среды – определение оптимальных и предельных температур роста и рН среды; рост в присутствии NaCl, желчи, фенола, моделирующим некоторые условия желудочно-кишечного тракта ценных видов рыб (*Salmo sp.*, *Oncorhynchus sp.* и др.).

Антагонистические свойства изолятов молочнокислых бактерий в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов различных групп (тест-культур) первично устанавливали методом диффузии в агар из лунок [52].

Определение устойчивости к кислой (рН 3; 4) и щелочной реакции среды (рН 8,3; 9,2; 9,6) проводили засеиванием 0,1 мл суточной исследуемой культуры в 10 мл жидкой питательной среды MRS Broth (TM Media, Индия) с различным значением рН (контроль – рН7,0). Посевы выдерживали при 30, 37°С в течение 48 часов, проверяя рН. Жизнеспособность клеток определяли методом подсчета колоний на чашках с MRS Agar [49].

Для определения устойчивости к желчи исследуемые культуры культивировали в MRS Broth (TM Media, Индия), содержащем 20, 30 и 40 % желчи (рН 6,8-7,0) при 30, 37°С в течение 24 ч. Количество выживших клеток определяли по количеству жизнеспособных клеток бактерий в 1 см³ культуральной жидкости [49].

Устойчивость выделенных изолятов лактобактерий к различным концентрациям бактерий NaCl (от 2 до 6,5 %) определяли в MRS Broth (TM Media, Индия) с добавлением соли. Посевы культивировали 24 ч при 30, 37°С. Жизнеспособность клеток определяли по числу КОЕ [49].

Чувствительность штаммов молочнокислых бактерий к фенолу исследовали в MRS Broth (TM Media, Индия) с добавлением 0,4% фенола. Инокуляты культивировали в течение 24 ч при 30, 37°С. Жизнеспособность клеток определяли по числу КОЕ [50].

Молекулярно-генетическую идентификацию проводили путем секвенирования по Сэнгеру [53].

Все результаты были средними из трех независимых экспериментов с тремя параллельными повторениями (n=9). Для оценки результатов использовались стандартные статистические методы в Excel (Microsoft® Office 2010) с использованием критерия Стьюдента [54]. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

С целью выделения новых антагонистически активных штаммов молочнокислых бактерий

нами проводилось микробиологическое исследование сырьевых компонентов растительного (кукуруза, пшеница, рожь, ячмень, шрот и жмых подсолнечный, шрот и жмых соевый, пшеничные клейковина и зародыш, кукурузный глютен и др.) и животного (рыбная, мясокостная, крилевая мука, сухое молоко и др.) происхождения, входящих в рецептуры кормов для рыб. Из вышеуказанных объектов, в основном растительного происхождения, нам удалось выделить 15 изолятов, предположительно молочнокислых бактерий (рисунок 1).

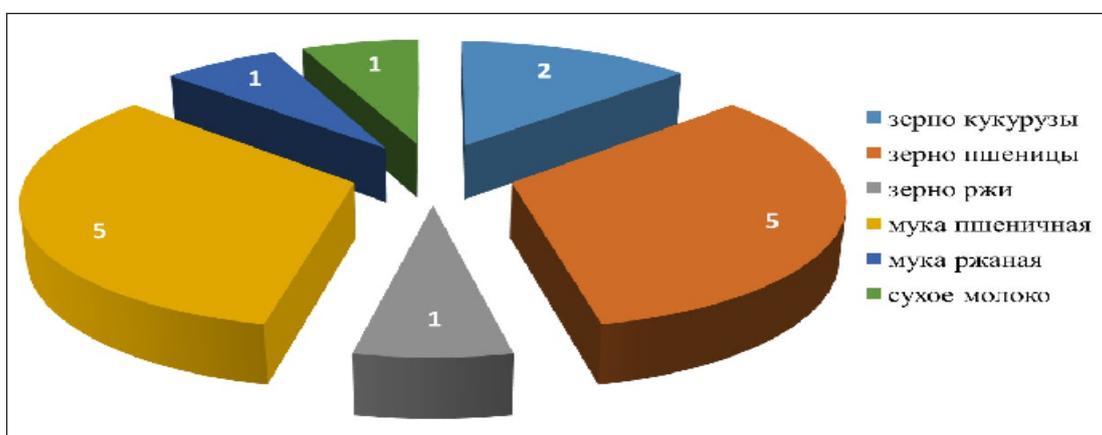


Рисунок 1 – Локализация молочнокислых бактерий в сырьевых компонентах, входящих в рецептуры кормов для рыб

Все штаммы–кандидаты, а также производственные штаммы пробиотиков при использовании в обязательном порядке должны проверяться по культуральным, тинкториальным, морфологическим, биохимическим свойствам и безопасности (*in vitro* и *in vivo*).

В ходе микробиологического изучения фенотипических признаков вновь выделенных бактерий нами было показано, что клетки 15 исследуемых изолятов были неподвижны, не содержали спор и капсул, окрашивались положительно по Граму, были каталазонегативны, не восстанавливали нитраты, имели отрицательный тест на индол. По этим признакам они являлись типичными представителями группы молочнокислых бактерий. При культивировании на твердых и питательных средах все выделенные штаммы не проявляли признаков диссоциации, обладали однородными морфологическими и тинкториальными свойствами. На основании формы клеток – мелкие палочки, изогнутые палочки или кокки; их агрегации – одиночные, парные, тетракок-

ки или цепочки различной длины, 15 выделенных изолятов были предварительно отнесены к лактобациллам, педиококкам и лейконостокам. Молекулярно-генетическая идентификация выделенных изолятов позволила выявить принадлежность 1 штамма, выделенного из пшеничной муки, к еще одному роду молочнокислых бактерий – р. *Enterococcus*. В приводимых ниже результатах исследований будет указана видовая принадлежность выделенных изолятов, в соответствии с новой таксономической классификацией, предложенной Jinshui Zheng с соавторами [55].

Результаты исследования кислотообразующей и протеолитической активности у выделенных штаммов молочнокислых бактерий, представленные в таблице 1, свидетельствуют о наличии среди них как штаммов с высокой энергией кислотообразования и средней протеолитической активностью (*Wg-35*, *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-20*, *Kc-1*), так и штаммов с низкой способностью к продукции кислот и пептизации белка (*Mg-1*,

Mg-2, Rg-9). При тестировании культур молочнокислых бактерий на протеолитическую активность выявлено, что при добавлении в молочный агар небольших количеств пептона и мясного экстракта наблюдается активация ферментных протеолитических систем у всех штаммов молочнокислых бактерий. Среди всех выделенных культур следует отметить новый выделенный штамм *Lacticaseibacillus paracasei Wf-20*, обладающий наиболее высокой протеиназно-пептидазной активностью, сравнимой с активностью известных производственных пробиотических штаммов лактобацилл [50]. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования активных штаммов в составе пробиотического препарата для рыб, поскольку продукция органических кислот, а также внеклеточных и клеточносвязанных протеиназ и пептидаз обуславливает лечебно-профилактические свойства культур, играет существенную роль в нормализации белкового обмена в организме, а также способствует лучшей конверсии и усвоению корма [56].

Исследование способности микроорганизмов сбраживать различные углеводы и многоатомные спирты необходимо для их первичной идентификации по классической системе. Кроме этого, знание профиля ферментации культуры позволяет направленно регулировать продукцию штаммом различных метаболитов: молочной кислоты и др. В связи с этим, у выделенных нами 15 изолятов бактерий был исследован их сахаролитический профиль (таблица 1). Моносахариды – самый быстрый и качественный источник энергии для процессов, происходящих в клетке. Как видно из таблицы 1, почти все 15 изолятов, обладают способностью сбраживать гексозы (глюкозу, фруктозу, галактозу, маннозу) и олигосахариды, включающие остатки гексоз (галактозу, сахарозу, мальтозу и трегалозу). Дисахариды мальтоза и трегалоза, состоящие из двух остатков глюкозы, расщепляются и утилизируются почти всеми новыми изолятами бактерий, кроме трех. Дисахариды сахароза и лактоза, содержащие в своем составе кроме глюкозы, остатки фруктозы и галактозы соответственно, оказались недоступны всего трем изолятам. Отсутствие ферментов, расщепляющих эти дисахариды на сбраживаемые мономеры, не позволяют штамму *Pediococcus lolii Wg-4* использовать в своем энергетическом обмене сахарозу и лакто-

зу, штамму *Lacticaseibacillus casei Wf-10* – сахарозу, а *Leuconostoc mesenteroides Mg-2* – лактозу. Тест на способность ферментировать полисахарид рамнозу показал, что ни один из новых изолятов не имеет ферментов, расщепляющих эту гексозу. Многие растительные компоненты кормов для рыб содержат в своем составе низкий уровень легкодоступных углеводов. Для лучшей конверсии этих растительных субстратов предпочтительно включать в состав пробиотических препаратов для рыб пентозосбраживающие штаммы молочнокислых бактерий. Среди выделенных нами изолятов, способность к сбраживанию пентоз, в частности арабинозы, проявили всего 5 исследованных штаммов. Три из них слабо сбраживали также ксилозу. Раффинозу утилизировали 3 штамма – *Leuconostoc mesenteroides Mg-1, Mg-2* и *Lactiplantibacillus plantarum Wg-1*, что свидетельствует о наличии у них специфических гликозилгидролаз.

Необходимо отметить, что тест на сахаролитические ферменты, помимо определения таксономической идентификации изолятов, позволил выявить индивидуальные особенности штаммов. Однако, из-за сходности биохимических свойств возникли сложности с видовой дифференциацией по сахаролитическому профилю и по молекулярно-генетическому исследованию 16S рРНК среди штаммов, отнесенных к *Lacticaseibacillus casei* и *Lacticaseibacillus paracasei*, а также к *Enterococcus sp.* Для более точной идентификации новых изолятов молочнокислых бактерий в дальнейшем будут проведены дополнительные молекулярно-генетические исследования с использованием специфических видовых праймеров.

Исследование чувствительности к антибиотикам – один из важных этапов оценки безопасности пробиотического штамма. В опытах *in vitro* показано, что при определенных условиях (расположение генов антибиотикорезистентности на плазмидной ДНК, большой размер плазмид и их способность к самостоятельному переносу, наличие половых ворсинок у клеток и др.) есть риск передачи гена антибиотикостойчивости пробиотических культур к патогенным микроорганизмам [40]. К тому же индекс множественной устойчивости к антибиотикам (MAR) позволяет судить о степени загрязнения источника происхождения штамма и рисках его дальнейшего использования [57,58].

Определение *in vitro* фенотипического профиля чувствительности/резистентности к антимикробным препаратам у выделенных нами штаммов молочнокислых бактерий (таблица 2) показало, что все они в разной степени чувствительны к рифампицину, олеандомицину, ампицилину, линкомицину, эритромицину. Большинство изолятов проявляло также чувствительность к тетрациклину, канамицину и бензилпенициллину. Устойчивость к антибиотикам, зависела от таксономической принадлежности лактобактерий. Так, штаммы *Leuconostoc mesenteroides* Mg-1, Mg-1 были устойчивы к пefлоксацину и ванкомицину, *Lactiplantibacillus plantarum* Wg-1 проявил резистентность к ванкомицину и фуразолидону, а *Latilactobacillus curvatus* Wg-3 – к бензилпенициллину. Педиококки (*Pediococcus lolii* Wg-4) были устойчивы к канамицину и фуразолидону. Все изоляты, относящиеся к *Lacticaseibacillus paracasei* и *Limosilactobacillus pontis*, кроме *Lacticaseibacillus paracasei* Wg-8, были чувствительны ко всем тестируемым антибиотикам. Штамм *Lacticaseibacillus paracasei* Wg-8 обладал резистентностью к тетрациклину и гентамицину.

Энтерококки (*Enterococcus durans* Wf-71) были устойчивы к гентамицину и бензилпенициллину. *Limosilactobacillus fermentum* Rf-3 был резистентен к ванкомицину и тетрациклину. А вот среди *Lacticaseibacillus casei*, изолят Wf-10 (выделенный из пшеничной муки) был чувствительным ко всем антибиотикам, тогда как *Lacticaseibacillus casei* Kc-1 (выделенный из сухого молока) был самым антибиотикорезистентным среди всех выделенных штаммов, он был устойчив к четырем из двенадцати тестируемых антибиотиков – к тетрациклину, канамицину, гентамицину и фуразолидону.

Определение индекса MAR показало, что источники выделения всех штаммов, кроме *Lacticaseibacillus casei* Kc-1, являются естественной средой, где не были использованы антибиотики и выделенные штаммы молочнокислых бактерий, имеющие индексы $MAR < 0,2$ [57] могут быть использованы как пробиотические штаммы, не относящиеся к категории антибиотикоустойчивых. Тогда как, сухое молоко, из которого был выделен изолят Kc-1, вероятно содержало следы антибиотиков, о чем свидетельствует индекс $MAR = 0,33$.

Далее было проведено исследование выживаемости выделенных лактобактерий при стрессовых значениях pH (рисунок 2) и в присутствии 20, 30, 40 % желчи (рисунок 3), являющихся максимальными концентрациями, с которыми встречаются клетки бактерий в желудке и различных отделах кишечника.

Установлено, что для большинства исследуемых штаммов молочнокислых бактерий значение pH 3,0 является стрессовым фактором, выживаемость клеток в этих условиях составляет от 0 – 15%. Наиболее кислотоустойчивыми являются штаммы *Limosilactobacillus pontis* Wf-6 – 15%, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20 – 12% и *Latilactobacillus curvatus* Wg-3 – 86%.

Следует отметить, что штаммы Wf-6 и Wf-20 сами являются сильными кислотообразователями и, соответственно, это объясняет их резистентность к низким pH. А штамм *Lb. curvatus* Wg-3, обладающий средней энергией кислотообразования, тем не менее, проявляет среди всех выделенных штаммов наиболее высокую жизнеспособность в кислой среде при pH 3,0. Высокую выживаемость штамма *Lb. curvatus* PA40 отмечал и Hong с соавторами [59], выделенный ими штамм показывал высокую выживаемость 97,8% в среде с 1% пепсина при pH 2,5. Zommiti и др. [60] получили подобный результат с *Lb. curvatus* DN317, который остается жизнеспособным при pH 2,5. Это указывает на то, что желудок с низкой pH может служить средой обитания *Lb. curvatus*. В своем обзоре Ying Chen с соавторами [61] пытаются разобраться в механизме этой толерантности. Возможно, *Lb. curvatus* может препятствовать проникновению H^+ , изменяя структуру и проницаемость клеточной мембраны. Продуцируемые экзополисахариды также могут обеспечить ему способность переносить кислую среду. *Lb. curvatus* также может производить аммиак для изменения pH окружающей среды. Тем не менее, это всего лишь гипотеза, для подтверждения которой требуются дальнейшие исследования.

Повышение pH среды до 9,2 не является значительным ингибирующим фактором для тестируемых штаммов молочнокислых бактерий, так как выживаемость культур в этих условиях довольно высокая – 43-96% в зависимости от штамма. Неблагоприятной для жизнеспособности молочнокислых бактерий является более щелочная среда при pH 9,6; в таких условиях выживают только 67% исследуемых культур, однако их жизнеспособность колеблется в пределах 2-20%. Наибольшую устойчивость к сильнощелочной среде проявляют штаммы *Lb. paracasei* Wf-2 и *Lb. paracasei* Wf-20, соответственно 20% и 12%, тогда как штамм *Lb. paracasei* Wg-8 демонстрирует чувствительность к щелочным условиям среды. Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что устойчивость молочнокислых бактерий к различным значениям pH среды является не только видовым, но и штаммоспецифичным признаком.

Таблица 2 – Чувствительность молочнокислых бактерий к антибиотикам (R-резистентный)

Штамм	Индекс MAR	Зона задержки роста (мм)											
		Тетрациклин	Рифампицин	Канамидин	Олеандомицин	Ампициллин	Гентамицин	Пефлоксацин	Ванкомицин	Линколин	Фуразолидон	Бензилпенициллин	Эритромицин
<i>Leuconostoc mesenteroides Mg-1</i>	0,17	20	26	11	21	17	16	R	R	20	20	14	20
<i>Leuconostoc mesenteroides Mg-2</i>	0,17	17	31	12	14	30	15	R	R	36	28	28	23
<i>Lactiplantibacillus plantarum Wg-1</i>	0,17	14	29	11	16	30	11	R	R	36	R	31	29
<i>Lactilactobacillus curvatus Wg-3</i>	0,08	39	37	20	12	19	30	41	28	43	35	R	12
<i>Pediococcus lolii Wg-4</i>	0,17	17	24	R	21	17	17	11	11	23	R	14	21
<i>Lacticaseibacillus paracasei Wg-8</i>	0,17	R	29	11	30	32	R	24	17	34	19	33	22
<i>Lacticaseibacillus paracasei Wg-35</i>	0	33	32	14	35	26	29	21	18	21	27	26	38
<i>Lacticaseibacillus paracasei Wf-2</i>	0	32	39	21	26	29	15	19	18	35	16	33	33
<i>Limosilactobacillus pontis Wf-6</i>	0	24	38	15	32	28	18	23	18	27	16	27	35
<i>Lacticaseibacillus casei Wf-10</i>	0	30	39	14	32	28	16	23	14	35	12	32	27
<i>Lacticaseibacillus paracasei Wf-20</i>	0	22	36	12	27	34	21	19	24	29	20	34	35
<i>Enterococcus durans Wf-71</i>	0,17	19	11	13	18	13	R	13	16	20	18	R	25
<i>Limosilactobacillus pontis Rg-9</i>	0	28	32	14	33	31	26	20	19	37	28	33	30
<i>Limosilactobacillus fermentum Rf-3</i>	0,17	R	26	10	20	35	18	15	R	39	20	15	28
<i>Lacticaseibacillus casei Kc-1</i>	0,33	R	34	R	19	28	R	29	18	33	R	27	24

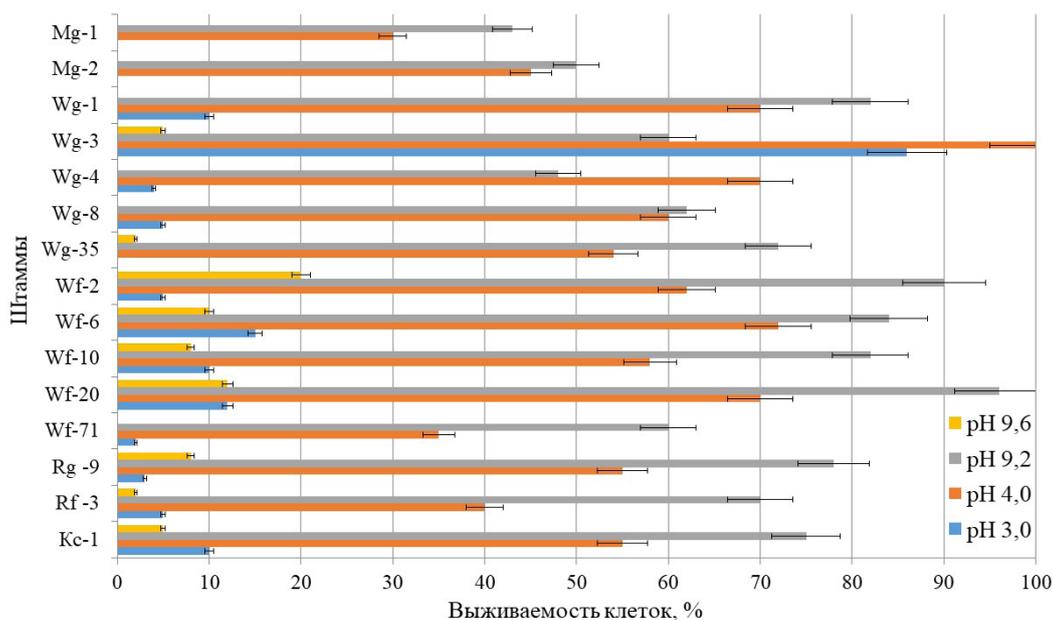


Рисунок 2 – Степень выживаемости молочнокислых бактерий при различных значениях pH

На рисунке 3 представлены результаты исследования степени выживаемости выделенных лактобактерий при росте в присутствии 20 и 40 % желчи. Все изоляты молочнокислых бактерий проявляли снижение показателей роста в присутствии желчи с концентрацией 20% и выше, что объясня-

ется тем, что желчные соли способны дезорганизовывать структуру клеточной мембраны, состоящую из липидов и жирных кислот; вызывать индукцию окислительного стресса, изменения метаболизма сахаров и неправильную укладку белков, а также вызывать повреждение ДНК [62].

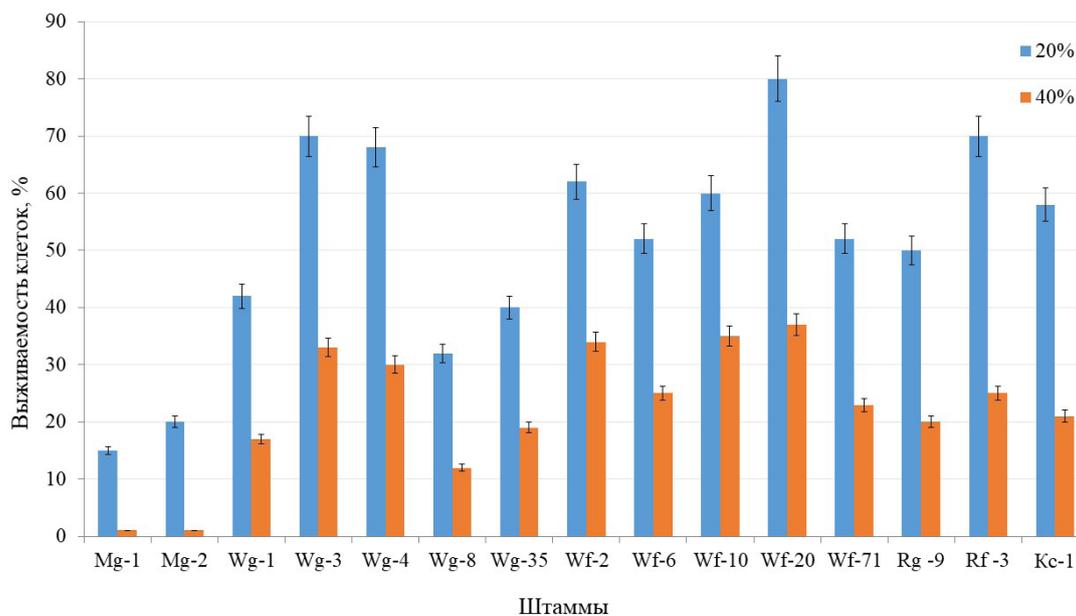


Рисунок 3 – Влияние различных концентраций желчи на выживаемость клеток лактобактерий

При этом, все штаммы лактобактерий вели себя в этом тесте совершенно по-разному, степень выживаемости при концентрации желчи 20% составляла 15-80%, а в присутствии 40% желчи – 5-37%. Наименьшей устойчивостью к желчным солям обладали штаммы *Leuconostoc mesenteroides* Mg-1, Mg-1. Штамм *Lb. paracasei* Wf-20 продемонстрировал наибольшую резистентность к высоким концентрациям желчи, что особенно важно для пробиотических бактерий, поскольку их полезные эффекты должны проявляться в присутствии этой биологической жидкости.

Понимание механизмов, с помощью которых пробиотические бактерии способны пережить стресс, вызванный солями желчных кислот, долгое время было противоречивым, но современные – omics технологии для анализа характеристик штаммов *in vivo* раскрыли белковые и генные сети, участвующие в этом процессе, и определили специфические реакции, направленные на преодоление стресса

желчи. Так, обычным ответом лактобактерий на стресс желчи являются: активация молекулярных механизмов для противодействия окислительному и кислотному стрессу; использование систем оттока желчи, а также модификация желчи с помощью гидролаз солей желчных кислот [62].

Исследование резистентности молочнокислых бактерий к фенолу показало, что все выделенные культуры молочнокислых бактерий способны выживать в присутствии фенола с концентрацией 0,4%, при этом степень выживаемости клеток у 10 из 15 тестируемых штаммов была выше 30% (рисунок 4). К высокотолерантным в отношении фенола можно отнести 4 штамма – *Lactiplantibacillus plantarum* Wg-1, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-2, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10 и *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20 (более 40% выживших клеток). Наибольшей устойчивостью к фенолу обладал штамм *Lb. casei* Wf-10 – 58%, наименьшей – *Leuconostoc mesenteroides* Mg-1 -10%.

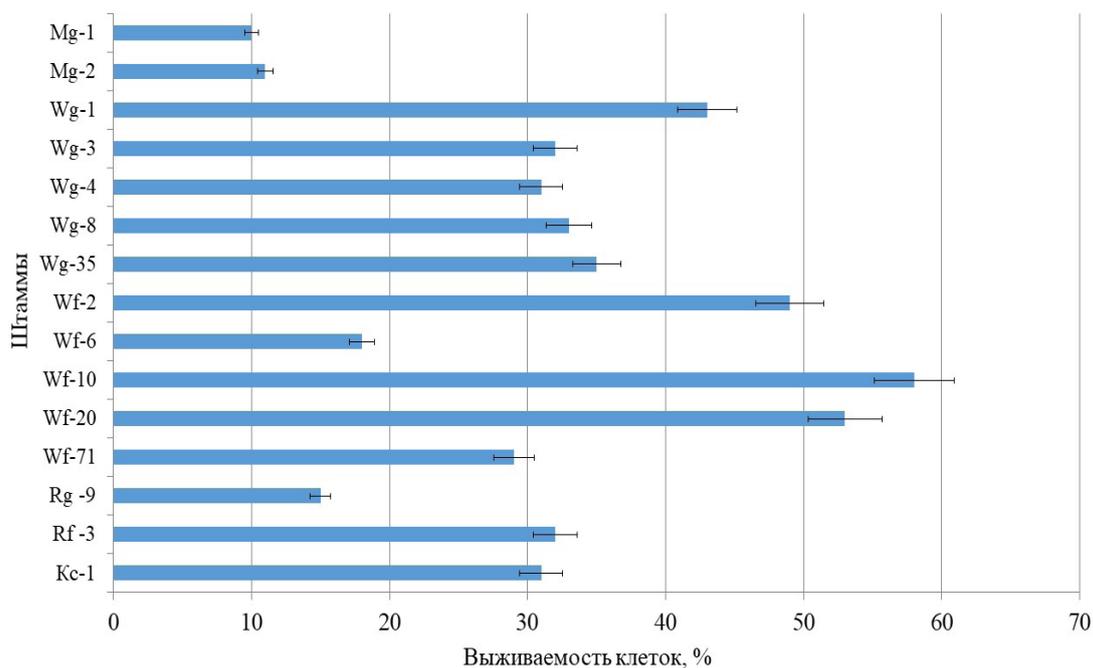


Рисунок 4 – Резистентность молочнокислых бактерий к фенолу

Известно, что высокая концентрация соли провоцирует в организме потерю тургора, когда вода движется из клетки наружу, что приводит к нарушению физиологии бактерий, активности определенных ферментов и обмена

веществ. Молочнокислые бактерии с высокой толерантностью к осмотическому давлению являются отличными кандидатами в пробиотики как для пресноводной, так и морской аквакультуры, а также могут быть использованы в

пищевых производствах. Результаты исследования осмотической устойчивости выделенных культур молочнокислых бактерий представлены на рисунке 5.

Тестирование на солеустойчивость выделенных культур молочнокислых бактерий показало, что все они способны расти в присутствии 6,5% NaCl, однако степень их выживаемости различна и зависит от штамма. Наименее осмотолерантными оказались штаммы *Limosilactobacillus*

pontis Rg-9 и *Enterococcus durans* Wf-71, процент выживаемости их клеток 8-9%. Максимальную резистентность к высокой концентрации хлорида натрия проявляли *Lb. casei* Wf-10 и *Lb. paracasei* Wf-20 – 60% и 56% выживших клеток соответственно. Различия в осмотической толерантности у бактериальных штаммов обусловлены различным составом их мембранных фосфолипидов, а также действием АТФ-зависимого глицинбетаина транспортера QacT [63].

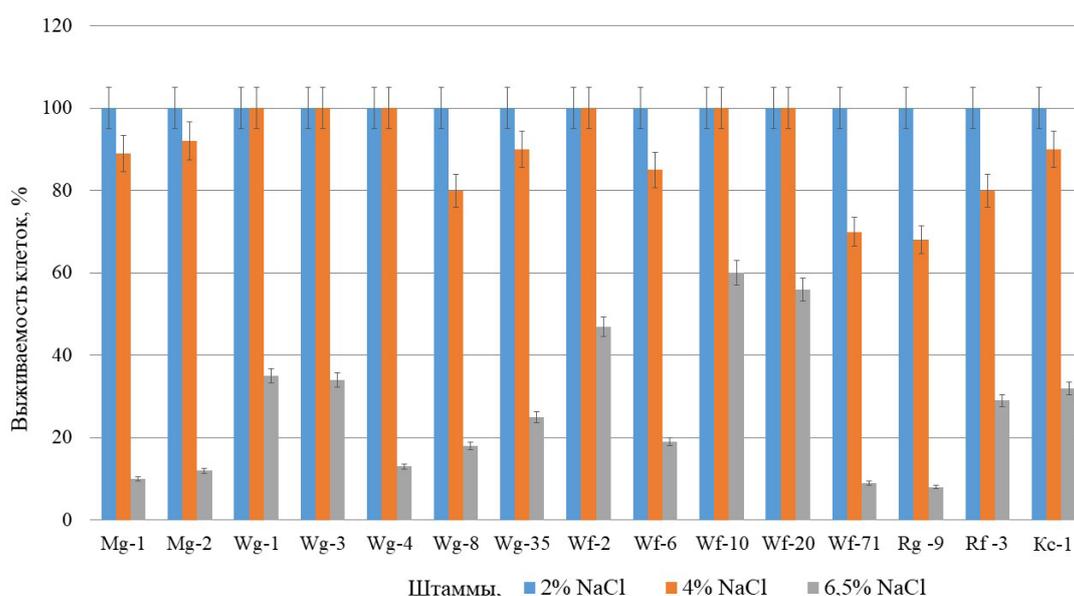


Рисунок 5 – Осмотолерантность молочнокислых бактерий

С целью поиска новых антагонистов, у выделенных штаммов молочнокислых бактерий была исследована *in vitro* антагонистическая активность в отношении оппортунистических и патогенных бактерий, а также микотоксигенных грибов, вызывающих заболевания рыб, загрязняющих кормовое сырье и воду в условиях аквакультуры (таблица 3). Согласно данным, полученным в ходе исследования и представленным в таблице 3, среди выделенных штаммов есть активные антагонисты как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Пять новых штаммов молочнокислых бактерий *Pediococcus lolii* Wg-4, *Lb. paracasei* Wf-2, *Lb. pontis* Wf-6, *Lb. casei* Wf-10 и *Lb. paracasei* Wf-20 проявляли довольно высокую противогрибковую активность в отношении плесневых грибов

Penicillium sp., *Aspergillus niger*, *Fusarium sporotrichioides*.

Следует отметить, что некоторые исследуемые штаммы, например, *Lactocaseibacillus casei* Wf-10, имея высокую ингибирующую способность в отношении тест-культур, обладали низкой кислотообразующей активностью. Можно предположить, что антагонизм этих штаммов, возможно, обусловлен не только действием органических кислот, образуемых ими, но и продукцией других антимикробных метаболитов или бактериоцинов. Исследование молекулярно – биохимической природы антагонистической активности, наличие генов, кодирующих синтез бактериоцинов у новых штаммов станет предметом дальнейших исследований в рамках данного проекта.

Таблица 3 – Характеристика антагонистической активности выделенных штаммов молочнокислых бактерий

Штамм	Антагонистическая активность к тест-культурам, диаметр зоны, мм							
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Sarsina flava</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycobacterium citreum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium sporotrichoides</i>
<i>L. mesenteroides</i> Mg-1	10±0,12	11±0,23	-	12±0,13	16±0,64	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i> Mg-2	12±0,18	13±0,20	-	13±0,24	17±0,70	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i> Wg-1	17±0,91	18±0,67	17±0,52	19±0,86	11±0,11	15±0,05	11±0,03	10±0,21
<i>Lb. curvatus</i> Wg-3	16±0,90	18±0,52	14±0,13	21±0,79	15±0,62	13±0,02	11±0,01	12±0,37
<i>P. acidilactici</i> Wg-4	11±0,32	16±0,12	8±0,08	20±0,67	24±1,07	15±0,31	14±0,42	13±0,01
<i>Lb. paracasei</i> Wg-8	12±0,34	14±0,28	13±0,12	18±0,32	24±0,99	12±0,80	10±0,01	11±0,03
<i>Lb. paracasei</i> Wg-35	13±0,29	15±0,64	15±0,60	19±0,48	23±1,09	15±0,54	11±0,44	12±0,04
<i>Lb. paracasei</i> Wf-2	19±1,00	19±0,35	19±0,26	25±1,07	26±0,89	18±0,52	11±0,21	14±0,60
<i>Lb. pontis</i> Wf-6	17±0,63	24±1,09	18±0,19	24±0,98	21±1,10	17±0,63	11±0,37	15±0,35
<i>Lb. casei</i> Wf-10	19±0,54	31±1,11	22±1,01	27±1,09	25±0,92	18±0,28	10±0,36	14±0,27
<i>Lb. paracasei</i> Wf-20	20±1,03	29±1,03	22±0,89	27±1,13	25±1,09	19±0,97	11±0,24	17±0,31
<i>E. durans</i> Wf-71	17±0,51	19±0,69	17±0,23	21±0,44	22±1,08	-	-	10±0,45
<i>Lb. pontis</i> Rg-9	15±0,27	20±0,99	14±0,48	22±0,76	16±1,05	10±0,03	10±0,02	12±0,18
<i>Lb. fermentum</i> Rf-3	16±0,39	18±0,47	15±0,87	19±0,21	17±0,21	11±0,08	10±0,01	15±0,13
<i>Lb. casei</i> Kc-1	18±0,17	24±1,08	18±0,98	23±1,03	20±0,77	17±0,35	11±0,45	13±0,21

Заключение

Основой успеха в создании пробиотика является правильный выбор эффективного и безопасного штамма-кандидата. Нами из сырьевых компонентов кормов для рыб были выделены 15 новых штаммов молочнокислых бактерий, которые в результате исследований были идентифицированы и отнесены к 9-ти видам: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactilactobacillus curvatus*, *Pediococcus lolii*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus pontis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Enterococcus durans*, большая часть которых является представителями нормальной микрофлоры рыб.

Многие из вновь выделенных культур молочнокислых бактерий характеризуются штаммовыми отличиями от типовых представителей их видов по способности ферментировать углеводные субстраты, устойчивости к антибиотикам, по степени выживаемости в неблагоприятных условиях среды. При изучении спектра ферментации углеводов нами выявлены штаммы лактобацилл, ферментирующие углеводы, наиболее распространенные в сырьевых компонентах кормов для рыб, а также пентозосбраживающие штаммы, способные использовать труднодоступные углеводы растительного сырья. Выявлен штамм *Lb. paracasei Wf-20*, обладающий высокой протеолитической активностью, не характерной для молочнокислых бактерий. Эти штаммы-кандидаты при условии их включения в состав пробиотика будут способствовать лучшей конверсии и усвояемости кормов для рыб.

Анализ результатов проведенных исследований показывает, что выделенные штаммы молочнокислых бактерий *Lb. curvatus Wg-3*, *Lb. paracasei Wf-2*, *Lb. pontis Wf-6*, *Lb. casei Wf-10* и *Lb. paracasei Wf-20* характеризуются как высокоустойчивые к стрессовым значениям pH, к максимальным концентрациям желчи и фенола, встречающимся в условиях желудочно-кишечного

тракта рыб, а также как сильные антагонисты к патогенным бактериям и плесневым грибам.

Полученные данные будут служить основой для прогнозирования способности новых штаммов лактобактерий к сохранению ими метаболической активности по мере прохождения через желудочно-кишечный тракт и приживаемости в кишечнике рыб, выживаемости в водоеме, в том числе с морской водой. Штаммы с меньшей устойчивостью к различным концентрациям солей желчных кислот и pH, однако, обладающие высокой антагонистической активностью, могут служить хорошими кандидатами для быстрого лизиса и целевого высвобождения необходимых метаболитов в условиях желудочно-кишечного тракта.

Таким образом, поиск и исследование степени устойчивости новых штаммов молочнокислых бактерий к неблагоприятным факторам окружающей среды, воспроизводящим «*in vitro*» некоторые условия желудочно-кишечного тракта рыб, а также определение их антагонистической активности, позволило выявить перспективные штаммы-кандидаты для создания на их основе пробиотического препарата для ценных видов рыб в аквакультуре.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Финансирование

Данное исследование финансируется Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP09258412) в рамках бюджетной программы 217 «Развитие науки» и подпрограммы 102 «Грантовое финансирование научных исследований» по приоритету «Рациональное использование водных ресурсов, животного и растительного мира, экология», договор №148/36-21-23 от 07.04.2021г.

References

- 1 Amal M.N.A., Saad M.Z. (2013) Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, vol. 34, no 2, pp. 195-206.
- 2 Assefa A., Abunna F. (2018) Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Vet. Med. Int.*, e 5432497.
- 3 Ayandele A.A., Oladipo E.K., Oyebisi O., Kaka M.O. (2020) Prevalence of Multi-Antibiotic Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* species obtained from a Tertiary Medical Institution in Oyo State, Nigeria. *Qatar medical journal*, vol.1, is. 9, pp.1-6.

- 4 Balcazar J.L., Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Cunningham D., Vendrell D., Muzquiz J.L. (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, vol.114, pp.173-186.
- 5 Bhatnagar A., Dhillon O. (2019) Characterization, screening, and application of bacteria with probiotic properties isolated from the gut of *Labeo calbasu* (Hamilton). *Fish. Aquatic Life.*, vol. 27, pp. 178-189. <https://doi.org/10.2478/aopf-2019-0020>.
- 6 Buchinger T.J., Li W., Johnson N.S. (2014) Bile salts as semiochemicals in fish. *Chem.Senses.*, vol.39, is. 8, pp.647-654.
- 7 Cabello F.C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, vol.68, no7, pp.1137-1144.
- 8 14 Cabello F.C., Godfrey H.P., Buschmann A.H., Dölz H.J. (2016) Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infect. Dis.*, vol. 16, pp.127–133.
- 9 Carlson J.M., Leonard A.B., Hyde E.R., Petrosino J.F., Primm T.P. (2017) Microbiome disruption and recovery in the fish *Gambusia affinis* following exposure to broadspectrum antibiotic. *Infect. Drug Resist.*, vol.10, pp. 143.
- 10 Chirom Aarti, Ameer Khusro, Rakesh Varghese, Mariadhas Valan Arasu, Paul Agastian, Naif Abdullah Al-Dhabi, Soundharajan Ilavenil, Ki Choon Choi. (2017) In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. *LWT – Food Science and Technology*, vol.86, pp.438-446.
- 11 Dawood M.A., Koshio S. (2018) Vitamin C supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animals. *Rev. Aquac.*, vol.10, pp. 334-350.
- 12 Dawood M.A.O., Koshio S. (2016) Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. *Aquaculture*, vol. 454, pp. 243-251.
- 13 Di J., Chub Z., Zhang Z., Huang J., Du H., Wei Q. (2019) Evaluation of the potential probiotic *Bacillus subtilis* isolated from two ancient sturgeons on growth performance, serum immunity and disease resistance of *Acipenser dabryanus*. *Fish & Shellfish Immunol.*, vol. 93, pp.711-719. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.020>.
- 14 Doan H.V., Soltani M., Ring E. (2021) In vitro antagonistic effect and in vivo protective efficacy of Gram-positive probiotics versus Gram-negative bacterial pathogens in finfish and shellfish. *Aquaculture.*, vol.540, pp.736581. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736581>
- 15 EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Kostas Koutsoumanis, Ana Allende et al. (2021) Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 13: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2020. *EFSA Journal.*, vol.19, is.1,pp.6377. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6377
- 16 Egorov N.S. (1995) *Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po mikrobiologii* [Guide to Practical Microbiology Exercises].M.: Izd-vo MGU, 186 p.
- 17 FAO. (2020) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome, 224 p. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- 18 Garc'és M.E., Olivera N.L., Fern'andez M., Rossi C.R., Sequeiros C. (2020) Antimicrobial activity of bacteriocin-producing *Carnobacterium* spp. isolated from healthy Patagonian trout and their potential for use in aquaculture. *Aquac. Res.* <https://doi.org/10.1111/are.14806>.
- 19 Gasser M., Zingg W., Cassini A., Kronenberg A. (2019) Attributable deaths and disability adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in Switzerland. *Lancet Infect. Dis.*, vol. 19, pp.17-18.
- 20 Ghosh K., Banerjee S., Moon U.M., Khan H.A., Dutta D. (2017) Evaluation of gut associated extracellular enzyme-producing and pathogen inhibitory microbial community as potential probiotics in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Int. J. Aquac.*, vol.7, pp.143-158. <https://doi.org/10.5376/ija.2017.07.0023>.
- 21 Glanc S. (1998) *Mediko-biologicheskaya statistika* [Medical and biological statistics]. Per. s angl., M.: Praktika, 459 p.
- 22 Gong L., He H., Li D., Cao L., Ali Khan T., L, Y., Pan L., Yan,L., Ding X., Sun Y., Zhang Y., Yi G., Hu S., Xia L. (2019) A new isolate of *Pediococcus pentosaceus* (SL001) with antibacterial activity against fish pathogens and potency in facilitating the immunity and growth performance of grass carps. *Front. Microbiol.*, vol. 10, pp. 1384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01384>.
- 23 Goutam Banerjee, Arun Kumar Ray (2017) The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Research in Veterinary Science*, vol. 115, pp.66-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>
- 24 Grayfer L., Kerimoglu B., Yaparla A., Hodgkinson J.W., Xie J., Belosevic M. (2018) Mechanisms of fish macrophage antimicrobial immunity. *Front. Immunol.*, vol. 9, pp. 1105. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01105>.
- 25 Gueimonde M., Sánchez B., Reyes-Gavilán C.G.D.L., Margolles A. (2013) Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.*, vol.4, pp. 202.
- 26 Hai N.V. (2015) The use of probiotics in aquaculture. *J. Appl. Microbiol.*, vol. 119, is.4, pp.917-935, <https://doi.org/10.1111/jam.12886>.
- 27 Havenaar R., Huis I. (1992) *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*/ In: Wood B.J.B. (Ed.) 1. Elsevier, New York, NY, USA. 199p.
- 28 Hong S.W., Kim J.H., Bae H.J., Ham J.S., Yoo J.G., Chung K.S., Oh M.H. (2018) Selection and characterization of broad-spectrum antibacterial substance-producing *Lactobacillus curvatus* PA40 as a potential probiotic for feed additives. *Anim. Sci. J.*, vol.89, pp.1459-1467.
- 29 Hoseinifar S.H., Ringø E., Shenavar Masouleh A., Esteban M.A. (2014) Probiotic, Prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. *Rev. Aquacult.*, vol. 6, pp.1-14.
- 30 Hoseinifar S.H., Sun Y.-Z., Wang A., Zhou Z. (2018) Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Front. Microbiol.*, vol. 9, pp.2429, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02429>.

- 31 Kaktcham P.M., Temgoua J.B., Zambou M.N., Diaz-Ruiz G., Wachter C., P'erez- Chabela M.L. (2018) In Vitro evaluation of the probiotic and safety properties of bacteriocinogenic and non-bacteriocinogenic lactic acid bacteria from the intestines of Nile Tilapia and common carp for their use as probiotics in aquaculture. *Probiotics Antimicrob. Prot.*, vol.10, no1, pp.98-109. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9312-8>.
- 32 Krumperman Paul H. (1983) Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. *Applied and environmental microbiology*, vol.46, no. 1, pp.165-170.
- 33 Kuebutornye F.K.A., Abarike E.D., Lu Y., Hlordzi V., Sakyi M.E., Afriyie G., Wang Z., Yuan Li Y., Xie C.X.(2019) Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 46, pp. 819-841. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00754-y>
- 34 Le B., Yang S.H. (2018) Probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Microbiol.*, vol.56, pp. 138-144. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7407-x>.
- 35 Merrifield D.L., Dimitroglou A., Bradley G., Baker R.T.M., Davies S.J. (2010) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacult. Nutr.*, vol. 16, is.5, pp.504-510, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x>.
- 36 Metodicheskie ukazaniya po sanitarno-epidemiologicheskoy ocenke bezopasnosti i funkcional'nogo potenciala probioticheskikh mikroorganizmov, ispol'zuemykh dlya proizvodstva pishchevyykh produktov: Metodicheskie ukazaniya. [Methodological guidelines on sanitary and epidemiological assessment of safety and functional potential of probiotic microorganisms used for food production] (2011) M.: Federal'nyy centr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 104 p.
- 37 Musharrafieh R., Tacchi L., Trujeque J., et al. (2014) *Staphylococcus warneri*, a resident skin commensal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with pathobiont characteristics. *Vet. Microbiol.*, vol.169, no 1-2, pp. 80-88.
- 38 Nandi A., Banerjee G., Dan S.K., Ghosh K., Ray A.K. (2018) Evaluation of in vivo probiotic efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* in *Labeo rohita* challenged by pathogenic strain of *Aeromonas hydrophila* MTCC 1739. *Probiotics Antimicrob. Proteins.*, vol. 10, is.2, pp. 391-398, <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9310-x>.
- 39 Narayanan Gobi, Baskaralingam Vaseeharan, Jiann-Chu Chen, Ravichandran Rekha, Sekar Vijayakumar, Mahalingam Anjugam, Arokiadhas Iswarya. (2018) Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 74, pp. 501-508.
- 40 Nayak S.K. (2010) Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 29, pp. 2-14.
- 41 Novik G.I. i dr. (2006) Biologicheskaya aktivnost' mikroorganizmov-probiontov [Biological activity of probiont microorganisms]. *Prikl. biohim. i mikrobiol.*, vol.42, no2, pp. 187-194.
- 42 Okocha R.C., Olatoye I.O., Adedeji O.B. (2018) Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. *Public Health Rev.*, vol.39, pp. 21.
- 43 Rico A., Phu T.M., Satapornvanit K., Min J., Shahabuddin A., Henriksson P.J. et al. (2013) Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, vol. 412, pp.231-243.
- 44 Ringø E., Doan H.V., Lee S.O., Soltani M., Hoseinifar S.H., Harikrishnan R., Song S. K. (2020) Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *J. Appl. Microbiol.*, vol.129, is.1, pp. 116-136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>.
- 45 Rotchell D, Paul D. (2016) Multiple Antibiotic Resistance Index. Fitness and Virulence Potential in Respiratory *Pseudomonas aeruginosa* from Jamaica. *Journal of Medical Microbiology*. vol.65, pp.251-271.
- 46 Ruiz L, Margolles A and Sánchez B. (2013) Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front. Microbiol.*, vol.4, pp.396. doi: 10.3389/fmicb.2013.00396
- 47 Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.74, pp.5463-5467.
- 48 Sergaliev N.H., Andronov E.E., Pinaev A.G.(2019) Izuchenie mikroflory osetrovyykh vidov ryb, razvodimyykh v UZV s primeneniem metodov metagenomiki [Study of microflora of sturgeon fish species bred in UCV using metagenomics methods] *Sbornik nauchnykh trudov KNCZV*. vol. 8, no1, pp.63–68.
- 49 Soltani M., Ghosh K., Hoseinifar S.H., Kumar V., Lymbery A.L., Roy S., Ringø E. (2019) Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, vol.27, is.3, pp.331-379. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>.
- 50 Soltani M., Lymbery A., Song S.K., Hossein-Shrkarabi P. (2019) Adjuvant effects of medicinal herbs and probiotics for fish vaccines. *Rev. Aquac.*, vol.11, pp.1325-1341. <https://doi.org/10.1111/raq.12295>.
- 51 Steenbergen L., Sellaro R., van Hemert S., Bosch J.A., Colzato L.S. (2015) A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain Behav. Immun.*, vol. 48, pp. 258-264.
- 52 Stentiford G., Neil D., Peeler E., Shields J., Small H., Flegel T. et al. (2012) Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *J. Invertebr. Pathol.*, vol.110, pp. 141-157.
- 53 Stentiford G.D., Sritunyaluksana K., Flegel T.W., Williams B.A., Withyachumnarnkul B., Itsathitphaisarn O., Bass D. (2017) New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis. *PLoS Pathog.*, no 3. – e1006160.
- 54 Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Netrusov A.I.(2012) Antimikrobnyye metabolity molochnokislykh bakterij: raznoobrazie i svoystva [Antimicrobial metabolites of lactic acid bacteria: diversity and properties] *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya*, vol. 48, no3, pp.259-275

- 55 Tanwar J., Das S., Fatima Z., Hameed S. (2014) Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* e 541340. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/541340>
- 56 Thilsted S.H., Thorne-Lyman A., Webb P., Bogard J.R., Subasinghe R., Phillips M.J., et al. (2016) Sustaining healthy diets: the role of capture fisheries and aquaculture for improving nutrition in the post-2015 year. *Food Policy*, vol. 61, pp.126-131.
- 57 Wang Y.B., Li J.R., Lin J. (2008) Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, vol. 281, pp.1-4.
- 58 Wasko A., Polak-Berecka M., Gustaw W. (2013) Increased viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* after osmotic stress. *Acta Aliment.*, vol.42, is.4, pp.520-528.
- 59 World Bank (2013) Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. In *Agriculture and Environmental Services Discussion Paper*, no 3.
- 60 Ying Chen, Leilei Yu, Nanzhen Qiao, Yue Xiao, Fengwei Tian, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Wei Chen and Qixiao Zhai. (2020) *Lactobacillus curvatus*: A Candidate Probiotic with Excellent Fermentation Properties and Health Benefits. *Foods*, vol.9, pp.1366. doi:10.3390/foods9101366
- 61 Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P. et al. (2020) 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol.70, pp. 2782–2858. doi:10.1099/ijsem.0.004107
- 62 39 Zokaeifar H., Balcázar J.L., Kamarudin M.S., Sijam K., Arshad A., Saad C.R. (2012) Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens. *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol.65, is.6, pp.289-294.
- 63 60 Zommiti M., Connil N., Hamida J.B., Ferchichi M. (2017) Probiotic Characteristics of *Lactobacillus curvatus* DN317, a Strain Isolated from Chicken Ceca. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol.9, pp.415-424.