

Характеристика штамма *Limosilactobacillus* spp. RI-54 как основы добавки с пробиотическими свойствами для птицеводства

Л. Р. ВАЛИУЛЛИН^{1,2}, Риш. С. МУХАММАДИЕВ^{1,2}, Рин. С. МУХАММАДИЕВ^{1,2}, Р.Х. РАВИЛОВ³, М. Г. БАРЫШЕВ²

¹Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, ул. Научный городок, 2, Казань, 420008, Российская Федерация

²Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, ул. Институт, вл. 5, р.п. Большие Вяземы, Одинцовский р-н, Московская обл., 143050, Российская Федерация

³Казанский государственный аграрный университет, ул. К. Маркса, 65, Казань, 420015, Российская Федерация

Резюме. Исследования проводили с целью характеристики штамма *Limosilactobacillus* spp. RI-54, изолированного из слепых отростков кишечника бройлера, как основы добавки с пробиотическими свойствами для птицеводства. *In vitro* исследования проводили методами диффузии в агар и спектрофотометрии (37,0 °C, n=3), ПЦР и культуры клеток (линия HT-29), *in vivo* – биотестированием на беспородных мышах (n=12). Установлено расхождение результатов идентификации исследуемой бактерии: согласно биохимическому профилю по API 50 CH штамм отнесен к *L. fermentum*, по анализу гена 16S rPHK – к *L. reuteri*. Штамм характеризовался относительно высоким антимикробным потенциалом против тест-культур *S. aureus*, *S. typhimurium* и *P. mirabilis*, зоны подавления их роста составили соответственно 18,09±0,40, 16,24±0,36 и 15,41±0,38 мм. На 24 ч роста бактериального штамма в супернатанте его культуральной жидкости активность фитазы составляла 4,58±0,07 ед./мл, протеазы – 5,63±0,14 ед./мл, амилазы – 0,09±0,002 ед./мл. Ксиланазная и целлюлазная активности не выявлены. После инкубации клеток изучаемой лимосилактобациллы в средах с пепсином (pH 2,5, 1,5 ч) и желчью (pH 7,0, 6 ч) их содержание составляло 36,88±3,55 %, с энтероцитами кишечника (37,0 °C, 2 ч) – 24,07±3,82 % от начального количества. ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) и АБТС (2,2'-азинобис (3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)-тесты показали выраженную активность супернатанта культуральной жидкости в ингибировании свободных радикалов – соответственно 94,03±3,50 и 56,18±2,79 %, что превышало активность intactных клеток и бесклеточного экстракта лимосилактобациллы в 2,2...5,5 раза. Исследуемый штамм проявлял значительную устойчивость к доксициклину, тетрациклину и ципрофлоксацину, промежуточную устойчивость к азитромицину и канамицину. Анализ вирулентности, токсичности и токсигенности лимосилактобациллы на мышах показал, что микроорганизм не обладает признаками патогенности и безопасен для животных. Полученные результаты свидетельствуют о пригодности штамма RI-54 для создания добавки, направленной на повышение продуктивности и сохранности поголовья в птицеводстве.

Ключевые слова: *Limosilactobacillus*, характеристика, антимикробный и антирадикальный потенциал, ферменты, выживаемость, адгезия, антибиотикоустойчивость, безопасность, добавка, пробиотик, птицеводство.

Сведения об авторах: Л. Р. Валиуллин, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник (e-mail: valiullin27@mail.ru); Риш. С. Мухаммадиев, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; Рин. С. Мухаммадиев, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; Р. Х. Равилов, доктор ветеринарных наук, профессор, чл.-корр. АН РТ; М. Г. Барышев, доктор биологических наук, директор.

Для цитирования: Характеристика штамма *Limosilactobacillus* spp. RI-54 как основы добавки с пробиотическими свойствами для птицеводства / Л. Р. Валиуллин, Риш. С. Мухаммадиев, Рин. С. Мухаммадиев и др. // Достижения науки и техники АПК. 2026. Т. 40. № 3. С. 91–100. doi: 10.53859/02352451_2026_40_3_91.

Characteristics of the *Limosilactobacillus* spp. RI-54 strain as the basis for a probiotic supplement for poultry farming

L. R. Valiullin^{1,2}, Rish. S. Mukhammadiev^{1,2}, Rin. S. Mukhammadiev^{1,2}, R.H. Ravilov³, M. G. Baryshev²

¹Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchnyi gorodok, 3, Kazan, 420008, Russian Federation

²All-Russian Research Institute of Phytopathology, ul. Institut, vl. 5, r.p. Bol'shie Vyazemy, Odintsovskii r-n, Moskovskaya obl., 143050, Russian Federation

³Kazan State Agrarian University, 65, ul. K. Marksa, 65, Kazan', 420015, Russian Federation

Abstract. The study was conducted to characterise the *Limosilactobacillus* spp. RI-54 strain, isolated from broiler ceca, as the basis for a probiotic supplement for poultry farming. *In vitro* studies were conducted using agar diffusion and spectrophotometry (37.0 degrees, n=3), PCR, and cell culture (HT-29 line). *In vivo* studies were conducted using biotesting on outbred mice (n=12). Discrepancies were found in the identification results for the studied bacteria: according to the biochemical profile according to API 50 CH, the strain was classified as *L. fermentum*, while analysis of the 16S rRNA gene identified it as *L. reuteri*. The strain was characterised by a relatively high antimicrobial potential against test cultures of *S. aureus*, *S. typhimurium* and *P. mirabilis*, the zones of their growth inhibition were 18.09±0.40, 16.24±0.36 and 15.41±0.38 mm, respectively. After 24 hours of growth of the bacterial strain, the phytase activity in the supernatant of its culture fluid was 4.58±0.07 U/ml, protease – 5.63±0.14 U/ml, amylase – 0.09±0.002 U/ml. Xylanase and cellulase activities were not detected. After incubation of the cells of the studied limosilactobacillus in media with pepsin (pH 2.5, 1.5 h) and bile (pH 7.0, 6 h), their content was 36.88±3.55%, with intestinal enterocytes (37.0 degrees, 2 h) – 24.07±3.82% of the initial amount. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) tests showed a pronounced activity of culture fluid supernatant in inhibiting free radicals – 94.03 ± 3.50 and 56.18 ± 2.79%, respectively, which exceeded the activity of intact cells and cell-free extract of *Limosilactobacillus* by 2.2-5.5 times. The studied strain showed significant resistance to doxycycline, tetracycline and ciprofloxacin, intermediate resistance to azithromycin and kanamycin. Analysis of virulence, toxicity and toxigenicity of *Limosilactobacillus* in mice showed that the microorganism does not have signs of pathogenicity and is safe for animals. The obtained results indicate the suitability of the RI-54 strain for the creation of an additive aimed at increasing the productivity and survival of poultry.

Keywords: *Limosilactobacillus*; characteristics; antimicrobial and antiradical potential; enzymes; survival; adhesion; antibiotic resistance; safety; additive; probiotic; poultry.

Author Details: L. R. Valiullin, Cand. Sc. (Biol.), leading research fellow; Rish. S. Mukhammadiev, Cand. Sc. (Biol.), senior research fellow (e-mail: tashir9891@mail.ru); Rin. S. Mukhammadiev, Cand. Sc. (Biol.), senior research fellow; R. H. Ravilov, D. Sc. (Vet.), prof., Corresponding Member of the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan; M. G. Baryshev, D. Sc. (Biol.), director.

For citation: Valiullin LR, Mukhammadiev RishS, Mukhammadiev RinS, et al. [Characteristics of *Limosilactobacillus spp.* strain RI-54 as basis of an additive with probiotic properties for poultry farming]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2026;40(3):91–100. Russian. doi: 10.53859/02352451_2026_40_3_91.

Интенсивное и нерациональное применение антибиотических препаратов в отрасли птицеводства в качестве кормовых добавок и средств лечения различных инфекций привело к появлению высокорезистентных к применяемым антибиотикам патогенных бактерий, или супербактерий, что стало угрозой продовольственной безопасности и глобальной проблемой человечества [1]. В 2006 г. в государствах-членах Европейского союза использование антибиотиков в качестве стимуляторов набора живого веса животных было запрещено [2]. Экспертной комиссией подразделения Управления по контролю за качеством продуктов и различными лекарствами США (FDA) в 2012 г. подготовлено руководство, согласно которому рекомендуется применение антимикробных препаратов исключительно для лечения вспышек инфекций сельскохозяйственных животных [3]. В 2016 г. эксперты Генеральной Ассамблеи ООН признали использование антибиотиков в животноводстве, включая птицеводство, основной причиной устойчивости бактерий к противомикробным средствам у людей [4]. В последние десятилетия в нашей стране в птицеводческих предприятиях антибиотические препараты широко применяли в целях массовой профилактики различных заболеваний и стимуляции прироста живой массы птицы, тем не менее, с 1 марта 2025 г. государством введено требование об рациональном использовании антибиотиков, в частности на их внесение в корма без назначения рецепта практикующего ветеринарного специалиста (приказ Минсельхоза России № 776).

Антибиотикотерапия весьма часто приводит к изменению структуры кишечной микробиоты, вызывая дисбиотические состояния, и вследствие этого метаболические и физиологические нарушения организма хозяина [5]. Как правило, изменение численности и видового разнообразия микробиоты у птицы опосредованно с атрофией ворсинок, уменьшением мышечной массы и увеличением процесса инфильтрации Т-клеток в слизистую оболочку кишечника [4].

В связи со стремительным ростом антибиотикорезистентности и необходимостью минимизации или полного исключения применения антибиотических препаратов в современном птицеводстве особую актуальность приобретает использование пробиотиков [6], которые представляют собой живые идентифицированные бактерии и дрожжи, клеточные компоненты и метаболиты которых способны демонстрировать положительный эффект на барьерную функцию кишечника и иммунитет организма хозяина [7].

Особое значение среди пробиотических микроорганизмов имеют молочнокислые бактерии. Они занимают доминирующее положение в составе естественной микробиоты здоровой сельскохозяйственной птицы [2]. Высокая устойчивость некоторых представителей этой группы бактерий к агрессивным условиям pH и желчи, обеспечивает их выживаемость при прохождении через пищеварительный тракт животного и последующую эффективную колонизацию его кишечника [8]. Это, несомненно, делает их перспективной альтернативой кормовым антибиотикам.

К наиболее широко исследованным и применяемым в промышленном животноводстве, включая птицеводство, микроорганизмам с пробиотическими свойствами

в группе молочнокислых бактерий относят представителей рода *Lactobacillus* [8]. Эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), FDA и Организации по продовольствию и сельскому хозяйству ООН (FAO) признают штаммы лактобацилл и пробиотики на их основе безопасными и включают последних в международный статус GRAS (Generally Regarded As Safe) [9]. Тем не менее, вследствие существующих определенных рисков и потенциальных побочных явлений, которые могут возникнуть при использовании препаратов, содержащих лактобациллы, их безопасность служит предметом постоянных дискуссий и исследований.

В последние годы повышенный интерес в промышленном птицеводстве вызывают молочнокислые микроорганизмы вида *Limosilactobacillus reuteri*, один из уникальных бактерий семейства *Lactobacillaceae*, обладающих выраженным функционально-метаболическим потенциалом и различными механизмами действия [10]. В связи с тем, что пробиотический потенциал молочнокислых бактерий характеризуется штаммоспецифичностью, оценка свойств индивидуального штамма с целью применения последнего качестве кормовой добавки для птицы приобретает актуальность.

Принимая во внимание широкое использование препаратов на основе *L. reuteri* [9], следует считать, что их эффективность может быть ограничена низкой адаптивностью к конкретным условиям содержания и рациону промышленного поголовья птицы. Хотя большая часть существующих к настоящему времени штаммов указанного вида отобраны по критерию выживаемости *in vitro*, однако их эффективность была неоднозначна, а именно, они нередко характеризуются недостаточной адгезией, при этом их метаболитный профиль изучен не до конца [10].

В настоящем исследовании показано, что штамм *Limosilactobacillus spp.* RI-54, изолированный непосредственно из слепых отростков кишечника бройлера (а не из среды или других видов животных), обладает повышенным адаптационным потенциалом и специфическим набором ферментативных активностей. Кроме того, указанная бактерия сочетает в себе не только антибиотикостойчивость и антагонизм к патогенам, но и выраженную фитазную и антиоксидантную активность, что крайне редко встречается у родственных штаммов в комплексе.

Исследование восполняет пробел в данных о возможности создания целевых пробиотиков, способных подавлять инфекцию (*Salmonella spp.*, *E. coli*) и активно участвовать в деградации антипитательных факторов корма (фитатов), повышая биодоступность фосфора без введения дополнительных ферментных препаратов.

Цель исследования – характеристика штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54 как основы добавки с пробиотическими свойствами для птицеводства.

Условия, материалы и методы. В работе применяли штамм молочнокислой бактерии *Limosilactobacillus spp.* RI-54, изолированный из слепых отростков кишечника бройлера и находящийся в ведении фонда Коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (Московская область, Россия). Тест-объектами при определении антимикробных свойств исследуемой лимосилактобациллы служили грамположительный (*Staphylococcus*

aureus) и грамотрицательные (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) бактерии, выделенные нами ранее [11] из биоматериалов погибших сельскохозяйственных птиц (цыплят-бройлеров и кур-несушек) с клиническими проявлениями кишечных инфекций, оценке *in vitro* адгезивных свойств – клеточная линия HT-29 (Cell Lines Service GmbH, Германия), анализе безопасности в тестах *in vivo* – беспородные белые мыши (7 недель, обоего пола, $n=12$ в каждом тесте).

Антимикробную активность исследуемой молочно-кислой бактерии в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов устанавливали способом диффузии в агар [10]. Для этого первоначально бактериальный штамм культивировали анаэробно в MRS-бульоне (HiMedia Laboratories, Индия) при температуре 37 ± 1 °C в течение суток. Затем супернатант культуральной жидкости (СКЖ) лимосилактобациллы отбирали с помощью центрифугирования при 8 тыс. g и 4 ± 1 °C в течение 5 мин. и фильтровали мембранными фильтрами Millex, имеющих размер пор 0,22 мкм (Merck Millipore, США). В слое LB-агара (HopeBio, Китай), содержащего тест-объекты, стерильно формировали лунки диаметром 6,0 мм, в последние вносили 100 мкл аликвоты СКЖ штамма и инкубацию осуществляли аэробно при вышеуказанных условиях (37 ± 1 °C, 24 ч). О степени антимикробной потенции оценивали по зоне задержки роста условно-патогенных и патогенных микроорганизмов (мм) вокруг лунок с метаболитами исследуемой бактерии.

Для идентификации лимосилактобациллы оценивали ее физиолого-биохимические и молекулярно-генетические характеристики: изучали способность расти при различных температурах, выделять газ из глюкозы, продуцировать молочную кислоту и каталазу [8], а также анализировали переменный фрагмент гена 16S rPHK [12].

Установление способности исследуемой молочно-кислой бактерии к росту при различных температурах проводили выращиванием штамма в анаэробных условиях на среде MRS-агар (HiMedia Laboratories, Индия) при 15 ± 1 и 45 ± 1 °C в течение 24 ч [13]. Положительным результатом считали в случае формирования на агаризованной среде колоний исследуемой бактерии.

Для оценки способности лимосилактобациллы выделять газ из глюкозы бактериальную суспензию с титром клеток $1,0\pm 0,19 \times 10^7$ КОЕ/мл инокулировали в MRS-бульон, содержащий 0,003 %-ный раствор индикатора бромкрезолового пурпурного, и инкубировали в пробирках с перевёрнутыми трубками Дарема при 37 ± 1 °C в течение суток [14]. Положительным результатом считали в случае изменения цвета среды на желтый и появления пузырьков газа в трубках Дарема.

Для выявления способности исследуемой молочно-кислой бактерии к продукции молочной кислоты к 2,0 мл 0,2 %-ного раствора хлорида железа (III) вносили 50 мкл аликвоты СКЖ штамма, полученной вышеуказанным способом, и тщательно перемешивали [15]. Положительным результатом считали в случае изменения цвета СКЖ в желто-зеленый цвет, указывая на образование лактата железа.

Способность лимосилактобациллы к продукции фермента каталазы определяли культивированием бактерии на MRS-агаре с тетраметилбензидином и пероксидазой хрена в концентрациях соответственно 25,0 и 0,01 мг/л [16]. Положительным результатом считали в случае формирования на среде бактериальной колонии голубого или синего цвета.

Биохимическую идентификацию исследуемой молочно-кислой бактерии осуществляли, применяя стандартизованную тест-систему API 50 CH (BioMerieux, Франция) [17]. Для этого бактериальную суспензию, приготовленную с помощью жидкой среды API 50 (стандарт мутности 2,0 по McFarland), вносили в лунки стрипов коммерческой тест-системы и инкубацию последних вели при 37 ± 1 °C. Полученные результаты учитывали через 48 ч. Видовую принадлежность лимосилактобациллы устанавливали веб-сервером «APIWEB» (<https://apiweb.biomerieux.com>).

Для подтверждения биохимической идентификации лимосилактобациллы проводили анализ ее нуклеотидной последовательности переменного фрагмента гена 16S rPHK [13]. Бактериальную культуру высевали на MRS-бульон и инкубировали анаэробно при 37 ± 1 °C в течение суток. Клетки лимосилактобациллы получали путем их осаждения из культуральной жидкости штамма центрифугированием при 10 тыс. g в течение 8 мин. Геномную ДНК лимосилактобациллы выделяли из бактериальных клеток, применяя коммерческий набор DNeasy Mini Kit (Qiagen, США) согласно протоколу компании-производителя. ПЦР-амплификацию переменного фрагмента гена 16S rPHK осуществляли набором с Taq ДНК-полимеразой (Евроген, Россия), комбинацией прямого (5'-AGGTAACGGCTTACCAAGGC-3') и обратного (5'-CCACCGCTACACATGGAGTT-3') праймеров в объеме 50 мкл по следующему режиму: 1 цикл: 94 °C – 5 мин. (стартовая денатурация); 35 циклов: 95 °C – 30 сек. (денатурация), 56 °C – 30 сек (отжиг), 72 °C – 30 сек. (элонгация); 1 цикл: 72 °C – 7 мин. (финальная элонгация) [12]. Для установления успешности амплификации (контроль чистоты, размер полученного продукта) проводили электрофорез в 2,0 %-ном агарозном геле. Продукт, успешно амплифицированный в реакции (около 460 п.н.) выделяли из агарозного геля, используя набор QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США) по протоколу зарубежного производителя, и секвенировали в лаборатории ЗАО «Евроген» (Россия) с использованием системы анализа нуклеотидных последовательностей «ABIPRISM 3100» (Applied Biosystems, США). Полученные секвенированные последовательности переменного фрагмента гена 16S rPHK загружали в GenBank (National Center for Biotechnological Information, NCBI, США) и сравнивали с таковыми программой Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Для выявления наличия активности экзоферментов (фитазы, протеазы, амилазы, ксиланазы и целлюлазы) в СКЖ исследуемой молочно-кислой бактерии последнюю растили при 37 ± 1 °C в течение 24 ч в жидкой модифицированной среде MRS, содержащей соответствующий субстрат как единственный источник углерода [8]. В качестве субстрата для индукции фитазы применяли натриевую соль фитиновой кислоты (HiMedia, Индия) в концентрации 0,2 %, протеазы, амилазы, ксиланазы и целлюлазы – соответственно казеин (CDH, Индия), крахмал (Sigma-Aldrich, США), ксилан (Sigma-Aldrich, США) и карбоксиметилцеллюлозу (Solarbio, Китай) в концентрациях 1,0 %. СКЖ бактериального штамма получали вышеуказанным способом (центрифугирование при 8 тыс. g и 4 ± 1 °C в течение 5 мин с последующим фильтрованием с использованием мембран Millex).

Активность фитазы лимосилактобациллы выявляли колориметрическим методом, который основан на скорости формирования свободного неорганического фосфата при расщеплении ферментом субстрата натриевой соли фитиновой кислоты [18]. Для этого

первоначально готовили реакционную смесь: к 0,12 мл аликвоты СКЖ вносили 0,48 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,0), содержащего 0,2 % фитат натрия. Полученную смесь инкубировали при 37 ± 1 °C в течение 30 мин. Затем реакцию останавливали и окрашивали внесением в смесь соответственно 0,60 мл 10,0 % раствора трихлоруксусной кислоты (стоп-реагент) и аналогичного количества аммоний-молибденового раствора (окрашивающий реагент), свежеприготовленного из четырех объемов 1,5 % молибдата аммония в 5,5 % серной кислоте и одного объема 2,7 % сульфата железа. Светопоглощение измеряли при 630 нм. Концентрацию фосфора устанавливали согласно калибровочному графику, полученному с использованием KH_2PO_4 (0,0...0,2 г/л) в качестве источника неорганического фосфата. За 1 единицу активности принимали количество фермента, которое необходимо для формирования 1 мкмоль неорганического фосфата в минуту в условиях анализа.

Активность протеазы исследуемой молочнокислой бактерии выявляли колориметрическим методом, который основан на определении количества аминокислоты тирозина, образующегося при гидролизе ферментом субстрата казеина, связыванием его в окрашенный комплекс с реактивом Фолина [19]. Реакционная смесь включала 0,5 мл аликвоты СКЖ и аналогичное количество (по объему) 2,0 % раствора казеина, который готовили в 0,1 М универсальном буфере (pH 7,2), содержащего уксусную, ортофосфорную и борную кислоты с концентрациями 0,1 М/л в равных соотношениях. Полученную смесь выдерживали при 40 ± 1 °C в течение 10 мин. и реакцию останавливали путем внесения 1,0 мл 5 % раствора трихлоруксусной кислоты. После фильтрации смеси отбирали 1,0 мл фильтрата, к последней вносили 5,0 мл 0,5 М раствора углекислого натрия и 1,0 мл реактива Фолина, приготовленного по ГОСТ 34430-2018 и разбавленного дистиллированной водой в соотношении 1:2. Инкубацию смеси осуществляли температуре при 40 ± 1 °C в течение 20 мин. Светопоглощение измеряли при 680 нм. За 1 единицу активности принимали количество фермента, которое необходимо для превращения за 1 мин. при 40 ± 1 °C субстрата в неосаждаемое используемой в анализе кислотой состояние, эквивалентное 1 мкмоль тирозина.

Активность амилазы, ксиланазы и целлюлазы штамма лимосилактобациллы выявляли колориметрическим методом, который основан на установлении содержания редуцирующих сахаров после ферментативного гидролиза соответствующего субстрата (крахмала, ксилана и карбоксиметилцеллюлозы), с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты, согласно методикам, описанными нами ранее [5, 8]. За 1 единицу активности принимали количество гидролазы, приводящее к формированию за 1 мин. 1 мкмоль восстанавливающих сахаров в условиях анализа.

Имитацию транзита лимосилактобациллы по пищеварительной системе сельскохозяйственной птицы *in vitro* проводили последовательной инкубацией бактериальных клеток в MRS-бульонах с пепсином (Acros Organics, Бельгия) в концентрации 3,0 г/л (pH 2,5) (соответствует железистому желудку) и 1,0 % желчью бройлеров (pH 7,0) (соответствует тонкому кишечнику) в течение 1,5 и 6,0 ч соответственно [13]. Исходное количество клеток в средах (контроль) составляло $7,62 \pm 0,27 \times 10^8$ КОЕ/мл. pH бульонов доводили до необходимых значений, используя 0,2 М раствор NaOH (для бульона с желчью) или 0,2 М раствор HCl (для бульона с

пепсином). Анализ содержания жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) осуществляли чашечным способом – последовательными 10-кратными разведениями бактериальной суспензии, полученной после инкубации в вышеописанных условиях, с использованием MRS-агара.

Для *in vitro* оценки уровня адгезивной активности исследуемой молочнокислой бактерии клетки НТ-29 высевали в 24-луночные культуральные планшеты (ПанЭко, Россия) из расчета 10^5 клеток на каждую лунку и культивировали при 37 ± 1 °C и 5 % CO_2 до формирования 90 %-ного конфлюэнтного монослоя [17]. Затем в лунки планшетов вносили бактериальную суспензию, разведенную средой RPMI-1640 (pH 7,2) (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:1, из расчета $2,46 \pm 0,35 \times 10^7$ КОЕ/лунка и инкубировали в течение 2 ч в аналогичных условиях (37 ± 1 °C, 5 % CO_2). После трехкратного промывания лунок планшет фосфатно-солевым буферным раствором (pH 7,1) (ПанЭко, Россия) в них добавляли 0,25 %-ный раствор трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Россия) и выдерживали в течение 5 мин. (37 ± 1 °C, 5 % CO_2). Содержимое лунок тщательно суспендировали и полученную гомогенную суспензию серийно разводили для установления количества жизнеспособных клеток (КОЕ/мл). Долю адгезировавшихся бактериальных клеток (%) рассчитывали, как отношение исходного числа клеток, внесенных в лунку планшета, и прикрепившихся к энтероцитам кишечника клеток.

Антиоксидантный потенциал лимосилактобациллы устанавливали ингибированием свободных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) и 2,2'-азинобис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) (АБТС) интактными клетками (ИК), бесклеточным экстрактом (БЭ) и СКЖ бактерии [20]. ИК получали осаждением их из культуральной жидкости штамма путем центрифугирования при 10 тыс. g в течение 10 мин., ресуспендированием осадка в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,4) (diaGene, Россия) и доведением с помощью ФСБ значения оптической плотности, измеренной при длине волны 600 нм (OP_{600}), суспензии до $0,40 \pm 0,05$. БЭ получали ультразвуковой дезинтеграцией интактных клеток при 37,0 кГц в течение 30 мин. с последующим разделением супернатанта, используемого для дальнейших исследований, центрифугированием при 10 тыс. g и 4 ± 1 °C течение 15 мин.

Для оценки способности восстанавливать радикал ДФПГ первоначально образцы ИК, БЭ или СКЖ, приготовленные вышеуказанными способами, смешивали с 0,40 мМ метанольным раствором ДФПГ (CDN, Индия) в соотношении 1:1. Затем реакционную смесь выдерживали в темноте при 37 ± 1 °C в течение 30 мин. и центрифугировали в при 5 тыс. g течение 10 мин. Светопоглощение измеряли при 517 нм. Расчёт антиоксидантной активности проводили по формуле [12].

Для оценки способности гасить катион-радикал АБТС к 0,15 мл образца ИК, БЭ или СКЖ вносили 1,35 мл рабочего раствора АБТС и смесь выдерживали при 37 ± 1 °C в течение 10 мин. Рабочий раствор АБТС готовили инкубацией (темнота, 14 ч, комнатная температура) 7,0 мМ раствора АБТС (AppliChem, Германия) в присутствии 5,50 мМ раствора персульфата калия в соотношении 1:1 и доведением с использованием ФСБ значения OP_{734} полученного раствора до $0,70 \pm 0,05$. После центрифугирования смеси (5 тыс. g, 10 мин.) светопоглощение измеряли при 734 нм. Расчёт антиоксидантной активности проводили по [12].

Устойчивость штамма лимосилактобациллы к антибиотикам *in vitro* устанавливали диско-диффу-

зионным способом согласно МУК 4.2.1890-04. Для этого суспензию с содержанием бактериальных клеток $1,50 \pm 0,31 \times 10^8$ КОЕ/мл вносили на поверхность MRS-агара и выдерживали в течение 15 мин. Затем на поверхность среды наносили диски с различными антимикробными препаратами (НИЦФ, Россия) в следующих концентрациях: доксициклин – 30 мкг/диск, тетрациклин – 30 мкг/диск, ципрофлоксацин – 5 мкг/диск, азитромицин – 15 мкг/диск, тилмикозин – 15 мкг/диск, эритромицин – 15 мкг/диск, амоксициллин – 20 мкг/диск, ампициллин – 10 мкг/диск, гентамицин – 10 мкг/диск, неомицин – 30 мкг/мл, канамицин – 30 мкг/диск, левомицетин – 30 мкг/диск, линкомицин – 15 мкг/диск, клиндамицин – 2 мкг/диск и рифампицин – 5 мкг/диск. Инкубацию вели анаэробно при 37 ± 1 °C в течение суток, после чего проводили замер диаметров зон задержки видимого роста (ДЗЗР) исследуемой молочнокислой бактерии.

Анализ *in vivo* вирулентности, токсичности и токсигенности лимосилактобациллы осуществляли на беспородных мышах обоего пола и одного возраста со средней массой $17,0 \pm 0,5$ г [21]. Для каждого теста отбирали по 12 экспериментальных животных: 6 – контрольных и 6 – опытных. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария, их кормление проводили с применением стандартного гранулированного комбикорма согласно зоотехническим нормам.

Вирулентность исследуемого штамма оценивали при однократном внутрибрюшинном или пятикратном с интервалом в сутки *per os* введении белым мышам бактериальной суспензии, приготовленной в стерильном физиологическом растворе, в дозах $1,50 \pm 0,27 \times 10^8$ КОЕ/животное. Токсичность исследуемого штамма устанавливали при внутрибрюшинном или *per os* введении белым мышам бактериальной суспензии, инактивированной путем нагревания при 80 ± 1 °C в течение 90 мин. Токсигенность исследуемого штамма изучали при внутрибрюшинном или *per os* введении белым мышам стерильного фильтрата СКЖ. После проведения манипуляций за экспериментальными мышами наблюдали в течение 28 суток, учитывая ежедневно клиническое состояние животных и их сохранность. Затем (на 29 сутки) из каждой опытной группы отбирали выборочно по 3 мыши. Мышей усыпляли внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата в дозе 8 мг на $20,0 \pm 0,5$ г массы животного с целью обследования внутренних органов на выявление наличия патологий и забора образцов крови для микробиологического анализа.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Excel. Оценку значимости различий между группами выполняли с использованием *t*-критерия Стьюдента (после предварительного подтверждения нормальности распределения данных). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты представлены в виде средних значений и 95 %-ных доверительных интервалов.

Результаты и обсуждение. На современных птицеводческих комплексах Российской Федерации циркулируют условно-патогенные и патогенные микроорганизмы (как правило, бактерии рода *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* и *Staphylococcus*), неизбежно приводящие к распространению резистентных к антимикробным препаратам бактериальных штаммов и относящиеся к причинам возникновения вспышек различных ассоциированных инфекций молодняка и взрослой птицы [8].

СКЖ штамма *Limosilactobacillus* spp. RI-54 проявлял антагонистическую активность относительно всех

взятых в анализ микроорганизмов, изолированных из биоматериалов погибших сельскохозяйственных птиц с клиническими признаками кишечных инфекций. Наиболее интенсивное ингибирование роста СКЖ штамма лимосилактобациллы отмечали в отношении *S. aureus*, *S. typhimurium* и *P. mirabilis*, зоны подавления роста последних составили соответственно $18,09 \pm 0,40$, $16,24 \pm 0,36$ и $15,41 \pm 0,38$ мм (рис. 1). СКЖ исследуемой бактерии проявлял сравнительно низкую активность относительно грамотрицательной *E. coli* (зона подавления роста – $13,50 \pm 0,33$ мм).

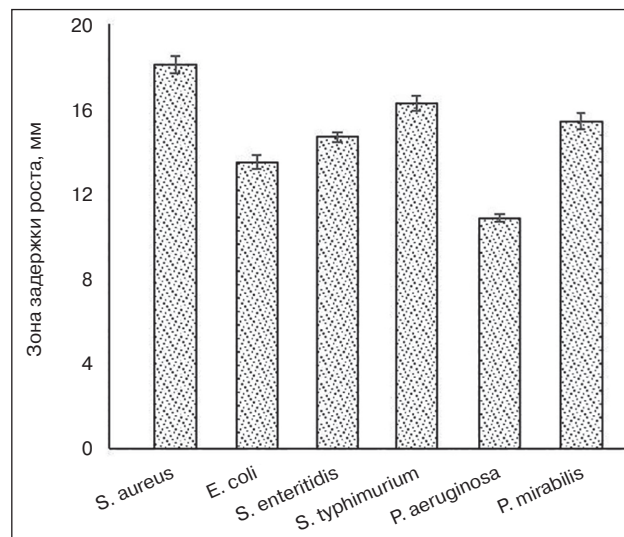


Рис. 1. Антимикробный потенциал СКЖ штамма *Limosilactobacillus* spp. RI-54 в отношении микроорганизмов, изолированных из биоматериалов погибших сельскохозяйственных птиц с клиническими признаками кишечных инфекций (различия между диаметрами зон задержки роста для всех представленных тест-культур статистически значимы ($p < 0,05$) для всех попарных сравнений, величины расчетных критериев Стьюдента для независимых выборок ($df = 4$) находились в диапазоне $t = 2,93 \dots 16,48$ при $t_{\text{крит.}} = 2,78$).

Антимикробный потенциал индивидуального штамма *Limosilactobacillus* spp. обусловлен его физиолого-биохимическими свойствами, включая способность к продукции различных по механизму действия метаболитов (реутерин, реутерициклин, молочная и уксусная кислоты, и многие другие), активных в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [12].

Штамм RI-54 характеризовался отсутствием способности к росту при температуре 15 °C, однако активно рос при 45 °C. Для исследуемой бактерии свойственен гетероферментативный тип метаболизма, что нами подтверждено положительными тестами на образование газа из глюкозы и продукцию молочной кислоты. При этом отсутствие каталазной активности в совокупности с указанными выше признаками свидетельствует о принадлежности штамма к представителям молочнокислых бактерий рода *Limosilactobacillus*.

Изучение профиля ферментации углеводов штамма RI-54 выявило его способность к расщеплению пентоз, в частности L-арабинозы, D-рибозы и D-ксилозы, а также гексоз – D-галактозы и D-глюкозы. Молочнокислая бактерия проявляла ферментативную активность относительно таких дисахаридов, как D-мальтоза, D-лактоза, D-мелибиоза и D-сахароза, и трисахарида D-раффинозы. Способность к гидролизу эскулина свидетельствует о наличии специфической гликозидазной активности. При этом иные протестированные гликозиды (арбутин, сали-

цин, амигдалин), согласно полученным результатам, не вовлекались в метаболизм исследуемого штамма.

Спектр утилизируемых субстратов штамма RI-54 не включал кетозы (D-фруктозу, L-сорбозу), метилированные производные сахаров и сложные полисахариды (инулин и гликоген). Характерная особенность исследуемой бактерии – полное отсутствие его способности к утилизации многоатомных спиртов, или полиолов (глицерина, эритрола, маннита, сорбита, ксилита и арабита), а также глюконата калия и его кето-производных.

Согласно результатам анализа профиля ферментации углеводов, гликозидов, полиолов и некоторых других соединений штаммом RI-54 с применением стандартизированной системы API 50 CH установлена неоднозначная идентификация исследуемой молочнойнокислой бактерии. В связи с этим штамм предварительно был отнесен к виду *Limosilactobacillus fermentum* (биотип II). Тем не менее, результаты молекулярно-генетической идентификации бактерии показали высокую степень сходства (99,0 % идентичности) с референтным штаммом *L. reuteri* 452 (номер Genbank: MT573097.1) и окончательно позволили установить видовую принадлежность как *Limosilactobacillus reuteri*.

Неоднозначная идентификация исследуемой молочнойнокислой бактерии обусловлена способностью последней к сбраживанию L-арабинозы, D-рибозы, D-ксилозы, D-галактозы, D-глюкозы, D-мальтозы, D-лактозы, D-мелибиозы и D-раффинозы, что, с одной стороны, отличает вид *Limosilactobacillus reuteri* от остальных родственных видов молочнойнокислых бактерий, с другой стороны – схож с видом *Limosilactobacillus fermentum* [22]. Несмотря на высокую стандартизацию системы API, её результаты основываются на экспрессии метаболических путей, которая крайне изменчива и во многом обусловлена условиями культивирования штамма, фазой роста или индивидуальных его особенностей. В тоже время, изучение последовательностей консервативных локусов 16S rPHK молочнойнокислой бактерии обеспечивает надежность и таксономическую однозначность. Выявленный биохимический профиль штамма RI-54, вероятно, связан с его адаптацией к специфической нише (слепые отростки кишечника бройлера), что могло привести к сходству метаболизма с бактериальным видом *L. fermentum*. Тем не менее, результаты молекулярно-генетического анализа признаны нами решающими, идентифицируя исследуемый штамм как *Limosilactobacillus reuteri*.

Существенную часть рациона сельскохозяйственной птицы составляют зерновые (пшеница, ячмень, кукуруза и овес) и зернобобовые (горох и соя) корма, которые содержат в своем составе фитаты и некрахмалистые полисахариды – группа соединений с антипитательными свойствами, снижающие процесс перевариваемости кормов и их конверсию, негативно воздействующие на показатель продуктивности и качество птицеводческой продукции [5]. К проявлениям пробиотических функций штаммов *Limosilactobacillus spp.* относят способность последних продуцировать физиологически активные соединения, в частности, гидролитические ферменты [12], которые служат ключевыми факторами пищеварения, обеспечивают расщепление и усвоение необходимых для организма животного питательных веществ кормов [21]. При оценке способности штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54 к биосинтезу гидролитических ферментов в жидких средах, содержащих соответствующий субстрат как единственный источник углерода, в СКЖ

исследуемой бактерии на 24 ч роста активность фитазы составила $4,58 \pm 0,07$ ед./мл, протеазы – $5,63 \pm 0,14$ ед./мл, амилазы – $0,090 \pm 0,002$ ед./мл, ксиланазная и целлюлазная активности не выявлены.

Процесс синтеза гидролитических экзоферментов молочнойнокислой бактерией тесно связан с индивидуальными генетическими особенностями, фазой роста, условиями его выращивания и составом используемой культуральной среды [8]. Схожие результаты представлены в работах ряда исследователей [12, 18, 19], показавшие способность штаммов *Limosilactobacillus reuteri* секретировать фитазы, протеазы и амилазы.

Кроме способности ингибировать широкий спектр патогенных и условно-патогенных бактерий пробиотические микроорганизмы должны обладать колонизационным потенциалом, в частности, выживать и сохранять свои функциональные свойства в процессе транзита по желудку и кишечнику животного, что считают необходимым условием для возможности их использования в промышленном животноводстве [23].

После последовательной инкубации клеток *Limosilactobacillus spp.* RI-54 в средах с пепсином в концентрации 3,0 г/л с pH 2,5 (имитирует железистый желудок птицы) и 1,0 % желчью с pH 7,0 (имитирует тонкий кишечник птицы) в течение соответственно 1,5 и 6 ч их содержание снижалось ($p < 0,05$) до $2,81 \pm 0,18 \times 10^8$ КОЕ/мл (рис. 2), что составляло $36,88 \pm 3,55$ % от начального количества исследуемой бактерии (контроль).

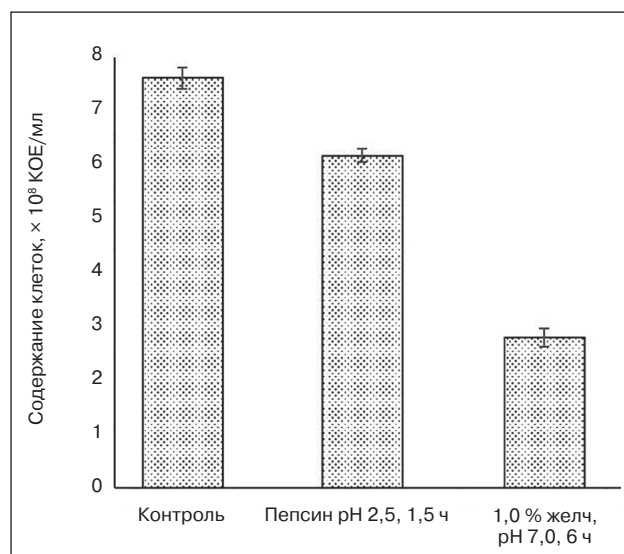


Рис. 2. Выживаемость штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54 в условиях *in vitro*, имитирующих его транзит по желудку и кишечнику сельскохозяйственной птицы (статистически значимое ($p < 0,05$) снижение количества жизнеспособных бактериальных клеток относительно контроля отмечено на всех этапах их транзита, значение расчетного t-критерия Стьюдента для независимых выборок ($df = 4$) для этапа «желудок» составило $t = 4,91$, «кишечник» – $t = 14,84$ при $t_{крит} = 2,78$).

Полученные результаты согласуются с данными некоторых зарубежных авторов [12, 24], которые в своих работах отмечают, что штаммы *Limosilactobacillus reuteri* существенно различаются по способности проявлять устойчивость к стресс-факторам пищеварительной системы. Например, выживаемость штамма *L. reuteri* NCIMB 30253 после его выдерживания в среде, содержащей пепсин в концентрации 3,0 г/л

(рН 2,5), в течение 2 ч составила в среднем 57,91 % по отношению к числу клеток бактерии в начале эксперимента [24]. Установлена способность *L. reuteri* PSC102 проявлять высокую устойчивость к различным концентрациям желчи: выживаемость штамма после 6 ч воздействия 0,3 и 1,0 % солей желчных кислот составила 100,0 % относительно контроля [12].

Установлено, что штамм *Limosilactobacillus spp.* RI-54 характеризовался адгезивными свойствами относительно клеток линии HT-29. После выдерживания бактериальных клеток с энтероцитами кишечника в течение 2 ч при 37,0 °С наблюдали снижение ($p < 0,05$) их количества до $5,92 \pm 0,28 \times 10^6$ КОЕ/лунка, что соответствовало $24,07 \pm 3,82$ % от исходной концентрации клеток лимосилактобациллы.

Согласно данным литературы, способность *Limosilactobacillus reuteri* адгезироваться к энтероцитам кишечника значительно варьирует между штаммами и имеет штаммоспецифичность. Так, доля клеток штамма *L. reuteri* KGC 1901 после их инкубации с колоноцитами HT-29 в течение 2 ч при 37,0 °С составила в среднем 19,0 % [17], в то время как доля клеток *L. reuteri* MJM60668 после их выдерживания в аналогичных условиях – 5,20 % [25], по сравнению с контролем.

К функциональным свойствам штаммов *Limosilactobacillus spp.* относят их способность формировать в различных компартментах и вне клетки соединения (кислоты, экзополисахариды, пептиды, витамины, протеины, ферменты), которые снижают уровень свободных радикалов в макроорганизме, и, тем самым замедляют или предотвращают развитие расстройств, обусловленных окислительным стрессом [12].

Установлено, что ИК, БЭ и СКЖ штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54 проявляют антиоксидантные свойства. ДФПГ- и АБТС-тесты показали сравнительно высокую ($p < 0,05$) активность СКЖ (соответственно $94,03 \pm 3,50$ и $56,18 \pm 2,79$ %) по ингибированию свободных радикалов, по сравнению с ИК (соответственно $42,70 \pm 2,86$ и $25,51 \pm 1,44$ %) и БЭ (соответственно $29,96 \pm 2,13$ и $10,24 \pm 2,38$ %) исследуемой бактерии (рис. 3).

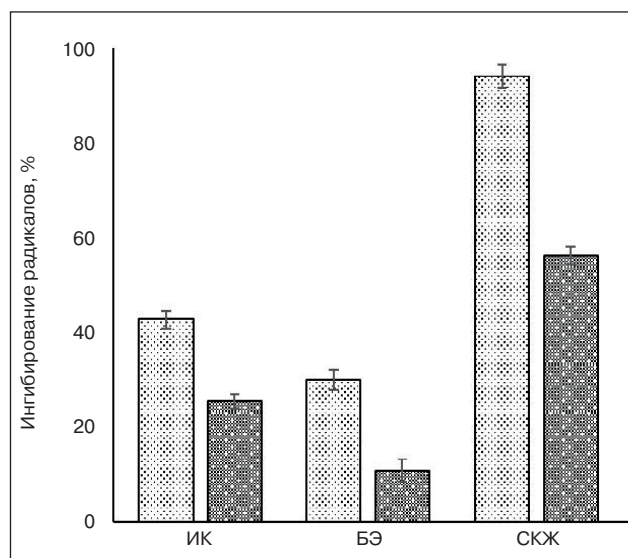


Рис. 3. Антирадикальная активность штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54 (статистически значимые ($p < 0,05$) различия в уровне антиоксидантной активности бактериального штамма выявлены между всеми исследуемыми фракциями (ИК, БЭ, СКЖ) внутри каждого из методов анализа, величины расчетных t -критериев Стьюдента для независимых выборок ($df = 4$) находились в диапазоне $t = 3,57 \dots 15,63$ при $t_{крит.} = 2,78$): ▨ – ДФПГ, ■ – АБТС.

Результаты исследования согласуются с данными авторов зарубежной работы [20], которые выявили, что СКЖ штамма *L. reuteri* в большей степени проявляют антиоксидантные свойства в отличие от ИК и БЭ. При этом нами показан более высокий (на 7,93 %) уровень антирадикальной активности СКЖ бактериального штамма.

Несмотря на то, что Европейское агентство по безопасности продуктов питания и кормов для животных (European Food Safety Authority, EFSA) штаммам *Limosilactobacillus reuteri* присвоил статус QPS (Qualified Presumption of Safety) [16], установление их безопасности требует комплексной оценки в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Современные требования к безопасности штаммов с пробиотическим потенциалом (ОФС.1.7.2.0012.15, регламент Европейского Союза № 429/2008) предъявляют необходимость подтверждения отсутствия у них антибиотикорезистентности и обуславливающих устойчивость к антимикробным препаратам трансмиссивных генов. Последние могут быть ключевым фактором передачи генов устойчивости к антибиотикам в микробиом макроорганизма.

Далее изучали *in vitro* резистентность штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54 к 15 антимикробным препаратам (табл. 1), принадлежащих к различным группам и используемых в ветеринарной практике для лечения различных инфекций сельскохозяйственной птицы.

Таблица 1. Анализ *in vitro* антибиотикоустойчивости штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54*

Антибиотик	ДЗЗР, мм	Устойчивость/чувствительность
группа тетрациклинов		
Доксициклин	9,89±0,15	устойчивый
Тетрациклин	0,54±0,01	устойчивый
группа фторхинолонов		
Ципрофлоксацин	11,63±0,28	устойчивый
группа макролидов		
Азитромицин	13,10±0,32	промежуточно-устойчивый
Тилмикозин	22,47±0,56	чувствительный
Эритромицин	32,02±0,79	чувствительный
группа пенициллинов		
Амоксициллин	27,18±0,64	чувствительный
Ампициллин	20,42±0,50	чувствительный
группа аминогликозидов		
Гентамицин	15,30±0,37	чувствительный
Неомицин	16,94±0,41	чувствительный
Канамицин	13,86±0,33	промежуточно-устойчивый
группа амфениколов		
Левомецетин	35,23±0,88	чувствительный
группа линкозамидов		
Линкомицин	29,68±0,70	чувствительный
Клиндамицин	33,55±0,82	чувствительный
группа рифампицина		
Рифампицин	24,79±0,58	чувствительный

*данные представлены в виде $M \pm t$ ($n=3$). Расчетные значения t -критерия Стьюдента находились в диапазоне $t = 40,0 \dots 65,9$ при $t_{крит.} = 2,78$ ($df = 4$, $p < 0,05$). Чувствительность бактериального штамма оценивали, сравнивая полученные величины ДЗЗР с пограничными, указанными в МУК 4.2.1890-04.

Установлено, что исследуемая молочнокислая бактерия проявляла устойчивость к доксициклину, тетрациклину и ципрофлоксацину (ДЗЗР составляли соответственно $9,89 \pm 0,15$, $0,54 \pm 0,01$ и $11,63 \pm 0,28$ мм),

характеризовалась промежуточной устойчивостью к азитромицину и канамицину (ДЗЗР – соответственно $13,10 \pm 0,32$ и $13,86 \pm 0,33$ мм), и обладала чувствительностью к остальным антибиотикам.

Согласно полученным нами данным, *Limosilactobacillus spp.* RI-54 имеет профиль резистентности к антибиотикам, который свойственен для этого вида бактерия [16, 24]. Выявленная относительная устойчивость исследуемого штамма к антимикробным препаратам группы тетрациклинов нередко связана с наличием генов tet(W) или tet(M). Анализ литературы показывает, что резистентность к антибиотикам группы фторхинолонов, в частности, ципрофлоксацину среди представителей *Limosilactobacillus spp.* обнаруживается достаточно часто [26, 27] и, как правило, относится к природной (врожденной), не связанной с приобретенными механизмами устойчивости, возникающими вследствие различных мутаций или передачи генов. Промежуточная (пониженная) чувствительность к антимикробным препаратам, например, к аминогликозидам, у лимосилактобацилл также обусловлена их физиологической особенностью [27], а именно низкой проницаемостью антибиотиков через мембраны бактерий и способностью последних создавать кислую среду секрецией органических кислот. Это требует дальнейших исследований по выяснению мобильности генов и механизмов, обеспечивающих указанную антибиотикорезистентность. Следует отметить, что бактериальные штаммы, характеризующиеся врожденной устойчивостью к антимикробным препаратам, принято считать пригодными для использования в качестве пробиотиков в животноводстве и могут применяться на фоне антибиотикотерапии различных инфекций.

Хотя полученный нами профиль ДЗЗР характерен для диких штаммов этого вида, выделенных из пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных, мы признаем необходимость дальнейшего полногеномного секвенирования (WGS) исследуемой лимосилактобациллы или ПЦР-скрининга ее генома на наличие мобильных генетических элементов (MGE). Это позволит исключить риск горизонтального переноса генов резистентности в микробных сообществах кишечника птицы и подтвердить статус GRAS (Generally Recognized as Safe) для исследуемого штамма как основы кормовой добавки для промышленного птицеводства.

Потенциальные риски, обусловленные использованием микробного штамма в сельском хозяйстве, оценивают с помощью *in vivo* тестов на вирулентность (способность вызывать инфекцию), токсичность (способность повреждать ткани макроорганизма) и токсигенность (способность продуцировать опасные для животного токсины) [21].

Анализ на белых мышах вирулентности, токсичности и токсигенности штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54 показал, что последний не характеризуется признаками патогенности и безопасен для животных (табл. 2).

На протяжении исследования после внутрибрюшинной инъекции/*per os* введения суспензии бактерии или ее фильтра СКЖ отмечали активную подвижность, хорошую поедаемость пищевых рационов мышами, отсутствие у последних физиологических отравлений и изменений поведенческих реакций. При вскрытии животных нами не выявлены повреждения и патологические изменения их внутренних органов. Анализ микробиологических посевов образцов крови из органов мышей показал отрицательный результат.

Таблица 2. Анализ *in vivo* вирулентности, токсичности и токсигенности штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54

Группа животных	Способ введения	Погибло/выжило
тест на вирулентность		
Контрольная	внутрибрюшинно	0/6
	<i>per os</i>	0/6
Опытная	внутрибрюшинно	0/6
	<i>per os</i>	0/6
тест на токсичность		
Контрольная	внутрибрюшинно	0/6
	<i>per os</i>	0/6
Опытная	внутрибрюшинно	0/6
	<i>per os</i>	0/6
тест на токсигенность		
Контрольная	внутрибрюшинно	0/6
	<i>per os</i>	0/6
Опытная	внутрибрюшинно	0/6
	<i>per os</i>	0/6

Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения штамма *Limosilactobacillus spp.* RI-54 в качестве основы добавки с функциональными свойствами для птицеводства или биопрепарата для нормализации кишечного микробиома сельскохозяйственной птицы при антибактериальной терапии инфекционных заболеваний.

Выводы. Изучаемая бактерия, отнесенная согласно результатам анализа гена 16S рPHK к виду *Limosilactobacillus reuteri*, характеризуется относительно высоким антимикробным потенциалом против *S. aureus*, *S. typhimurium* и *P. mirabilis* (ДЗЗР составили 18,09, 16,24 и 15,41 мм соответственно); фитатгидролизующей (4,58 ед./мл), протеолитической (5,63 ед./мл) и амилалитической (0,09 ед./мл) активностями; активностью по ингибированию свободных радикалов ДФПГ и АБТС (для СКЖ – 94,03 и 56,18 %, ИК – 42,70 и 25,51 % и БЭ – 29,96 и 10,24 % соответственно); выживаемостью (36,88 %) в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения в железистом желудке и тонкой кишке сельскохозяйственной птицы; значительной устойчивостью к доксициклину, тетрациклину и ципрофлоксацину (ДЗЗР – $9,89 \pm 0,15$, $0,54 \pm 0,01$ и $11,63 \pm 0,28$ мм соответственно) и промежуточной устойчивостью к азитромицину и канамицину (ДЗЗР – $13,10 \pm 0,32$ и $13,86 \pm 0,33$ мм соответственно). Микроорганизм безопасен для животных (отсутствуют вирулентность, токсичность и токсигенность). При условии дальнейшего генетического подтверждения отсутствия мобильных элементов резистентности, штамм *L. reuteri* RI-54 пригоден для использования в качестве основы многофункциональной кормовой добавки, сочетающей в себе функции повышения резистентности поголовья птицы к окислительному стрессу и улучшению конверсии комбикорма.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Академии наук РТ №4/2025-ПД-ВНИВИ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных выполнены строго с соблюдением биоэтических стандартов. Содержание и кормление за подопытными животными, выведение последних из экспериментального исследования проводили, опираясь на ГОСТ 33216-2014, а также Директиву Европейского парламента и

Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по защите применяемых для научных целей животных (Directive 2010/63/UE). Протоколы с использованием животных были одобрены Административным комитетом по экспериментам с животными ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань, Россия (идентификатор одобрения: SYXK(SU) 20200711-001 от 30 января 2021 года).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ.

Авторы выражают благодарность Ш. З. Валидову (лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов, отдел перспективных исследований, ФИЦ КазНЦ РАН) за помощь в аналитических экспериментах.

Литература.

1. Влияние антибиотиков, используемых в животноводстве, на распространение лекарственной устойчивости бактерий (обзор) / И. С. Сазыкин, Л. Е. Хмелевцова, Е. Ю. Селиверстова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 1. С. 24–35. doi: 10.31857/S0555109921010335.
2. Влияние пробиотиков *Bacillus subtilis* GM2 и GM5 на рост и усвояемость кормов у цыплят-бройлеров / Г. Ф. Хадиева, М. Т. Лутфуллин, А. А. Николаева и др. // Ученые записки Казанского университета. Серия. Естественные науки. 2019. Т. 161. № 3. С. 472–489. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.472-489.
3. Чем заменить антибиотики в птицеводстве? / Е. А. Иылдырым, Л. А. Ильина, Д. Г. Тюрина и др. // Птицеводство. 2020. № 9. С. 41–46. doi: 10.33845/0033-3239-2020-69-9-41-46.
4. Сравнительная оценка влияния вурджиниамидина и пробиотика на состав кишечного микробиома и зоотехнические показатели цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) / Д. Г. Тюрина, Г. Ю. Лапеев, Е. А. Иылдырым и др. // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 6. С. 1220–1232. doi: 10.15389/agrobiology.2020.6.1220rus.
5. Бактерии – антагонисты возбудителей кишечных инфекций и продуценты комплекса целлюлаз как основа для создания добавок, объединяющих функции пробиотика и кормового фермента / Л. Р. Валиуллин, Рин. С. Мухаммадиев, Рин. С. Мухаммадиев и др. // Достижения науки и техники АПК. 2021. Т. 35. № 9. С. 60–66. doi: 10.53859/02352451_2021_35_9_60.
6. Оптимизация параметров совместного культивирования *Bacillus subtilis* GA27 и *Bacillus subtilis* RF-45 для возможности создания пробиотиков, метапробиотиков и метабитиков для птицеводства / Р. С. Мухаммадиев, Р. С. Мухаммадиев, Л. Р. Валиуллин и др. // Ветеринария Кубани. 2023. № 3. С. 32–38. doi: 10.33861/2071-8020-2023-3-32-38.
7. Postbiotics: an alternative for improving health and performance of poultry production / F. Roque, M. H. S. Lopes, P. Raffi, et al. // Microorganisms. 2025. Vol. 13. No. 7. P. 1472–1490. doi: 10.3390/microorganisms13071472.
8. Новые штаммы *Lactobacillus acidophilus* как перспективные пробиотики для птицеводства / Л. Р. Валиуллин, Рин. С. Мухаммадиев, Рин. С. Мухаммадиев и др. // Ветеринария Кубани. 2022. № 6. С. 16–21. doi: 10.33861/2071-8020-2022-6-16-21.
9. Лактобациллы: правовое регулирование и перспективы создания препаратов нового поколения / Р. А. Юнес, Е. У. Полуэктова, Т. В. Белкина и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 5. С. 520–534. doi: 10.31857/S0555109922050178.
10. Probiotic characterization and comparison of broiler-derived lactobacillus strains based on technique for order preference by similarity to ideal solution analysis / Y. B. Xu, D. L. Li, X. Q. Ding, et al. // Poult. Sci. 2023. Vol. 102. No. 5. Article 102564. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579123000883> (дата обращения: 10.11.2025). doi: 10.1016/j.psj.2023.102564.
11. Видовой состав микроорганизмов, изолированных из тканей и органов павшей птицы / А. С. Мухаммадиева, Р. С. Мухаммадиев, И. Г. Каримуллина и др. // Ветеринария Кубани. 2024. № 6. С. 31–34. doi: 10.33861/2071-8020-2024-6-31-34.
12. Isolation and identification of *Limosilactobacillus reuteri* PSC102 and evaluation of its potential probiotic, antioxidant, and antibacterial properties // M. S. Ali, E.-B. Lee, S.-K. Lim, et al. // Antioxidants (Basel). 2023. Vol. 12. No. 2. P. 238–258. doi: 10.3390/antiox12020238.
13. Молочнокислые и спорообразующие бактерии: формирование сообществ как основы функциональных добавок с пробиотическими свойствами для птицеводства / Р. С. Мухаммадиев, Р. С. Мухаммадиев, Л. Р. Валиуллин и др. // Ветеринария Кубани. 2023. № 2. С. 30–36. doi: 10.33861/2071-8020-2023-2-30-36.
14. Amenu D., Bacha K. Probiotic potential and safety analysis of lactic acid bacteria isolated from Ethiopian traditional fermented foods and beverages // Ann. Microbiol. 2023. Vol. 73. No. 1. P. 1–14. <https://link.springer.com/article/10.1186/s13213-023-01740-9> (дата обращения: 10.11.2025). doi: 10.1186/s13213-023-01740-9.
15. Спектрофотометрическое определение молочной кислоты / Л. Н. Борщевская, Т. Л. Гордеева, А. Н. Калинина и др. // Журнал аналитической химии. 2016. Т. 71. № 8. С. 787–790. doi: 10.7868/S004445021608003X.
16. In silico, in vitro and in vivo safety evaluation of *Limosilactobacillus reuteri* strains ATCC PTA-126787 & ATCC PTA-126788 for potential probiotic applications / D. Gangaiyah, S. P. Mane, N. R. Tawari, et al. // PLoS One. 2022. Vol. 17. No. 1. Article e0262663. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0262663> (дата обращения: 10.11.2025). doi: 10.1371/journal.pone.0262663.
17. Characterization of *Limosilactobacillus reuteri* KGC1901 newly isolated from *Panax ginseng* root as a probiotic and its safety assessment / H.-Y. Yu, M. Kwon, Y.-S. Lee, et al. // Fermentation. 2023. Vol. 9. No. 3. P. 228–242. doi: 10.3390/fermentation9030228.
18. Mohammadi-Kouchesfahani M., Hamidi-Esfahani Z., Azizi M. H. Isolation and identification of lactic acid bacteria with phytase activity from sourdough // Food Sci. Nutr. 2019. Vol. 7. No. 11. P. 3700–3708. doi: 10.1002/fsn3.1229.
19. Protease-producing lactic acid bacteria with antibacterial properties and their potential use in soybean meal fermentation / H. Ma, L. Wang, H. Yu, et al. // Chem. Biol. Technol. Agric. 2022. Vol. 9. No. 1. P. 40–57. doi: 10.1186/s40538-022-00303-5.
20. The antioxidant activity and metabolomic analysis of the supernatant of *Streptococcus alactolyticus* strain FGM / X. Gu, H. Wang, L. Wang, et al. // Sci. Rep. 2024. Vol. 14. No. 1. P. 8413–8428. doi: 10.1038/s41598-024-58933-8.
21. Новые штаммы *Bacillus subtilis* как перспективные пробиотики / Г. Ф. Хадиева, М. Т. Лутфуллин, Н. К. Мочалова и др. // Микробиология. 2018. Т. 87. № 4. С. 356–365. doi: 10.1134/S0026261718040112.
22. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий *Lactobacillus* spp. в отношении клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* / Т. В. Фёдорова, Д. В. Васина, А. В. Бегунова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 264–276. doi: 10.7868/S0555109918030054.
23. Выживаемость ассоциаций микроорганизмов на основе биосовместимых штаммов молочнокислых и спорообразующих бактерий в условиях *in vitro*, аналогичных для различных отделов пищеварительного тракта сельскохозяйственной птицы / Рин. С. Мухаммадиев, Рин. С. Мухаммадиев, Л. Р. Валиуллин и др. // Достижения науки и техники АПК. 2024. Т. 38. № 6. С. 39–45. doi: 10.53859/02352451_2024_38_6.
24. In vitro and in vivo characterization and strain safety of *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30253 for probiotic applications // I. Sulemankhil, M. Parent, M. L. Jones, et al. // Can. J. Microbiol. 2012. Vol. 58. No. 6. P. 776–787. doi: 10.1139/w2012-050.
25. *Lactobacillus reuteri* MJM60668 prevent progression of non-alcoholic fatty liver disease through anti-adipogenesis and anti-inflammatory pathway / P. Werlinger, H. T. Nguyen, M. Gu, et al. // Microorganisms. 2022. Vol. 10. No. 11. P. 2203–2227. doi: 10.3390/microorganisms10112203.

26. 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. No. 1. P. 142–150. doi: 10.1186/s12866-023-02883-0.
27. Анисимова Е. А., Яруллина Д. Р. Антибиотикорезистентность и мобильность ее генетических детерминант у штамма *Lactobacillus fermentum* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020. Т. 38. № 4. С. 162–169. doi: 10.17116/molgen202038041162.

References

1. Sazykin IS, Khmelevtsova LE, Seliverstova Elu, et al. [Effect of antibiotics used in animal husbandry on the spread of bacterial drug resistance (review)]. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2021;57(1):24-35. doi: 10.31857/S0555109921010335. Russian.
2. Khadieva GF, Lutfullin MT, Nikolaeva AA, et al. [Effect of *Bacillus subtilis* GM2 and GM5 probiotics on growth and digestibility of feed in broiler chickens]. Uchen Zap Kazan Univ Ser Estestv Nauki. 2019;161(3):472-89. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.472-489. Russian.
3. Yyldyrym EA, Il'ina LA, Tiurina DG, et al. [How to replace antibiotics in poultry farming?]. Ptitsevodstvo. 2020;(9):41-6. doi: 10.33845/0033-3239-2020-69-9-41-46. Russian.
4. Tiurina DG, Lapev Glu, Yyldyrym EA, et al. [Comparative assessment of the effect of virginiamycin and probiotic on the composition of the intestinal microbiome and zootechnical parameters of broiler chickens (*Gallus gallus* L.)]. Sel'skokhoziastvennaia Biologiya. 2020;55(6):1220-32. doi: 10.15389/agrobiologiya.2020.6.1220rus. Russian.
5. Valiullin LR, Mukhammadiev Rish S, Mukhammadiev Rin S, et al. [Bacteria – antagonists of intestinal pathogens and producers of a cellulase complex as a basis for creating additives combining the functions of a probiotic and feed enzyme]. Dostizh Nauki Tekh APK. 2021;35(9):60-6. doi: 10.53859/02352451_2021_35_9_60. Russian.
6. Mukhammadiev RS, Mukhammadiev RS, Valiullin LR, et al. [Optimization of parameters for co-cultivation of *Bacillus subtilis* GA27 and *Bacillus subtilis* RF-45 for the possibility of creating probiotics, metabiotics and metabiotics for poultry farming]. Veterinariia Kubani. 2023;(3):32-8. doi: 10.33861/2071-8020-2023-3-32-38. Russian.
7. Roque F, Lopes MHS, Raffi P, et al. Postbiotics: an alternative for improving health and performance of poultry production. Microorganisms. 2025;13(7):1472-90. doi: 10.3390/microorganisms13071472.
8. Valiullin LR, Mukhammadiev Rish S, Mukhammadiev Rin S, et al. [New strains of *Lactobacillus acidophilus* as promising probiotics for poultry farming]. Veterinariia Kubani. 2022;(6):16-21. doi: 10.33861/2071-8020-2022-6-16-21. Russian.
9. Iunes RA, Poluektova EU, Belkina TV, et al. [Lactobacilli: legal regulation and prospects for the creation of new generation drugs]. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2022;58(5):520-34. doi: 10.31857/S0555109922050178. Russian.
10. Xu YB, Li DL, Ding XQ, et al. Probiotic characterization and comparison of broiler-derived lactobacillus strains based on technique for order preference by similarity to ideal solution analysis. Poult Sci [Internet]. 2023[cited 2025 Nov 10];102(5):102564. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579123000883>. doi: 10.1016/j.psj.2023.102564.
11. Mukhammadieva AS, Mukhammadiev RS, Karimullina IG, et al. [Species composition of microorganisms isolated from tissues and organs of dead poultry]. Veterinariia Kubani. 2024;(6):31-4. doi: 10.33861/2071-8020-2024-6-31-34. Russian.
12. Ali MS, Lee EB, Lim SK, et al. Isolation and identification of *Limosilactobacillus reuteri* PSC102 and evaluation of its potential probiotic, antioxidant, and antibacterial properties. Antioxidants (Basel). 2023;12(2):238-58. doi: 10.3390/antiox12020238.
13. Mukhammadiev RS, Mukhammadiev RS, Valiullin LR, et al. [Lactic acid and spore-forming bacteria: formation of communities as the basis of functional additives with probiotic properties for poultry farming]. Veterinariia Kubani. 2023;(2):30-6. doi: 10.33861/2071-8020-2023-2-30-36. Russian.
14. Amenu D, Bacha K. Probiotic potential and safety analysis of lactic acid bacteria isolated from Ethiopian traditional fermented foods and beverages. Ann Microbiol [Internet]. 2023[cited 2025 Nov 10];73(1):1-14. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13213-023-01740-9>. doi: 10.1186/s13213-023-01740-9.
15. Borshchevskaya LN, Gordeeva TL, Kalinina AN, et al. [Spectrophotometric determination of lactic acid]. Zhurn Anal Khim. 2016;71(8):787-90. doi: 10.7868/S004445021608003X. Russian.
16. Gangaiah D, Mane SP, Tawari NR, et al. In silico, in vitro and in vivo safety evaluation of *Limosilactobacillus reuteri* strains ATCC PTA-126787 & ATCC PTA-126788 for potential probiotic applications. PLoS One [Internet]. 2022[cited 2025 Nov 10];17(1):e0262663. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0262663>. doi: 10.1371/journal.pone.0262663.
17. Yu H-Y, Kwon M, Lee Y-S, et al. Characterization of *Limosilactobacillus reuteri* KGC1901 newly isolated from Panax ginseng root as a probiotic and its safety assessment. Fermentation. 2023;9(3):228-42. doi: 10.3390/fermentation9030228.
18. Mohammadi-Kouchesfahani M, Hamidi-Esfahani Z, Azizi MH. Isolation and identification of lactic acid bacteria with phytase activity from sourdough. Food Sci Nutr. 2019;7(11):3700-8. doi: 10.1002/fsn3.1229.
19. Ma H, Wang L, Yu H, et al. Protease-producing lactic acid bacteria with antibacterial properties and their potential use in soybean meal fermentation. Chem Biol Technol Agric. 2022;9(1):40-57. doi: 10.1186/s40538-022-00303-5.
20. Gu X, Wang H, Wang L, et al. The antioxidant activity and metabolomic analysis of the supernatant of *Streptococcus alacalyticus* strain FGM. Sci Rep. 2024;14(1):8413-28. doi: 10.1038/s41598-024-58933-8.
21. Khadieva GF, Lutfullin MT, Mochalova NK, et al. [New strains of *Bacillus subtilis* as promising probiotics]. Mikrobiologiya. 2018;87(4):356-65. doi: 10.1134/S0026261718040112. Russian.
22. Fedorova TV, Vasina DV, Begunova AV, et al. [Antagonistic activity of lactic acid bacteria *Lactobacillus* spp. against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*]. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2018;54(3):264-76. doi: 10.7868/S0555109918030054. Russian.
23. Mukhammadiev Rish S, Mukhammadiev Rin S, Valiullin LR, et al. [Survival of associations of microorganisms based on biocompatible strains of lactic acid and spore-forming bacteria under in vitro conditions similar to those of various parts of the digestive tract of poultry]. Dostizh Nauki Tekh APK. 2024;38(6):39-45. doi: 10.53859/02352451_2024_38_6. Russian.
24. Sulemankhil I, Parent M, Jones ML, et al. In vitro and in vivo characterization and strain safety of *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30253 for probiotic applications. Can J Microbiol. 2012;58(6):776-87. doi: 10.1139/w2012-050.
25. Werlinger P, Nguyen HT, Gu M, et al. *Lactobacillus reuteri* MJM60668 prevent progression of non-alcoholic fatty liver disease through anti-adipogenesis and anti-inflammatory pathway. Microorganisms. 2022;10(11):2203-27. doi: 10.3390/microorganisms10112203.
26. Duche RT, Singh A, Wandhare AG, et al. Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. BMC Microbiol. 2023;23(1):142-50. doi: 10.1186/s12866-023-02883-0.
27. Anisimova EA, Yarullina DR. [Antibiotic resistance and mobility of its genetic determinants in *Lactobacillus fermentum* strain]. Mol Genet Mikrobiol Virusol. 2020;38(4):162-9. doi: 10.17116/molgen202038041162. Russian.

Поступила в редакцию 11.02.2026 После доработки 04.03.2026 Принята к публикации 25.03.2026