

УДК: 619:579.852.11:615.076

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.43

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ РОДА *BACILLUS* НА СОСТОЯНИЕ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ И ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ *COTURNIX COTURNIX* И *MUS MUSCULUS*

Ан К.В.¹ – мл. науч. сотр. сектора молекулярной биологии (ORCID 0009-0003-0354-1697); Миронова Т.Е.^{1,2} – мл. науч. сотр. сектора молекулярной биологии, научный сотрудник Центра ветеринарной иммунологии и биотехнологии (ORCID 0000-0003-0860-1778); Кильп А.С.^{1,2} – науч. сотр. сектора молекулярной биологии, руководитель Центра ветеринарной иммунологии и биотехнологии (ORCID 0000-0002-9501-4485); Афонюшкин В.Н.^{1,2} – канд. биол. наук, зав. сектором молекулярной биологии, доц. кафедры микробиологии и гигиены животных (ORCID 0000-0001-5177-4733); Афонюшкин А.В.² – студ.

¹ФГБУН «Сибирский федеральный центр агробиотехнологий СФНЦА РАН»

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет»

*bobikova.anna97@gmail.com

Ключевые слова: бактерии, *Bacillus*, споровые пробиотические препараты, энтероинвазивность, иммуногенность, иммунофлуоресцентная реакция агглютинации.

Keywords: bacteria, *Bacillus*, spore probiotic preparations, enteroinvasiveness, immunogenicity, immunofluorescence agglutination reaction.

Поступила: 03.09.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024

РЕФЕРАТ



Исследования микроорганизмов рода *Bacillus* открывают широкие возможности для применения пробиотических штаммов в различных областях биотехнологии. Микроорганизмы рода *Bacillus* проявляют противоаллергическое и антиоксидантное действие, а также производят антибактериальные вещества, бактериоцины и ферменты, что делает их перспективными для применения в качестве биодобавок в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Пробиотики на основе *Bacillus*, особенно в споровой форме, обладают устойчивостью к агрессивным условиям и способны активировать неспецифический клеточный иммунный ответ. В нашем исследовании мы оценивали 5 культур микроорганизмов рода *Bacillus* для разработки пробиотических препаратов, с фокусом на стимуляцию гуморального антигенного ответа. Исследования проводили на перепелах *Coturnix coturnix* породы Техас (в возрасте 14 суток), птиц разделили на 5 опытных групп и 1 контрольную (n=7), а также на мышах ICR (CD-1), которых делили на одну опытную группу и одну контрольную (n=8). Изучали антагонистическую, гемолитическую, галактозидазную и ДНКазную активности, а также чувствительность к канамицину. Проводили скрининг иммуногенности и инвазивности культур методом оценки сывороток в иммунофлуоресцентной реакции агглютинации. Определяли длину кишечных ворсинок у опытных животных, а также взвешивали органы для определения массовых коэффициентов. Выявлено, что

штамм *B. halotolerans* №5.6 способствует увеличению длины кишечных ворсинок у перепелов, но не влияет на слизистую оболочку у мышей. Наши исследования подтвердили, что многие штаммы *B. subtilis* обладают инвазивностью, что считается основным фактором, определяющим их иммуностимулирующие эффекты. Это свойство также полезно для доставки вакцинных антигенов через слизистые оболочки, однако результаты показали, что иммуногенность и способность преодолевать пищевую толерантность у *B. subtilis* не зависят исключительно от инвазивности. Другие виды *Bacillus*, такие как *B. halotolerans*, могут быть перспективными для разработки пробиотиков.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Для современной биотехнологии аэробные микроорганизмы рода *Bacillus*, способные продуцировать споры и биологически активные вещества, являются перспективными объектами исследований. Важный фактор их практического применения - устойчивость образующихся спор при хранении, что определяет во многом эффективность основанных на них препаратов. Разные штаммы *Bacillus* оказывают противоаллергическое и антиоксидантное действие, а также продуцируют антибиотики четырех классов [1, 2]. Кроме того, их представители не образуют биопленки на слизистых оболочках и поэтому не могут бесконтрольно персистировать в организме. К полезным свойствам организмов также относят способность вырабатывать бактериоцины – пептиды, подавляющие рост патогенов [3, 4]. Таким образом, при пероральном введении бактерии активируют неспецифическую резистентность организма-носителя и имеют большой потенциал для использования их в качестве биодобавок в сельском хозяйстве и пищевой промышленности [5].

Пробиотики – это биомасса бактерий в вегетативной или споровой форме с четко выраженной антагонистической активностью к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, которая оказывает положительный эффект на организм хозяина при введении в адекватных количествах. К особенностям споровых пробиотиков относят: сохранение их жизнеспособности при воздействии самых разнообразных агрессивных факторов (антибиотики, повышенная кислотность, высокие температуры); способность проходить через кислую среду желудка в тонкий кишечник,

не разрушаясь; устойчивость к антибиотикам [6]. Грамположительная сенная палочка *Bacillus subtilis* - один из перспективных микроорганизмов для разработки пробиотиков. В экспериментальных исследованиях было показано ее положительное влияние на показатели роста и иммунную систему. Пробиотики могут усиливать неспецифический клеточный иммунный ответ, характеризующийся активацией макрофагов, естественных киллеров (NK), антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов и высвобождением различных цитокинов штамм-специфичным и дозозависимым образом [7, 8]. Иммунные или эпителиальные клетки могут экспрессировать ряд рецепторов распознавания образов (PRR). Типичные PRR состоят из Toll-подобных рецепторов (TLR), рецепторов, подобных гену I, индуцируемому ретиноевой кислотой (RLR), рецепторов, подобных домену олигомеризации нуклеотидов (NOD) (NLR), и рецепторов лектинов C-типа. Молекулярные паттерны пробиотиков, ассоциированные с патогенами (PAMPs), взаимодействуют с PRR, инициируя соответствующие сигнальные пути для экспрессии различных генов и последующей выработки иммунных медиаторов, которые помогают хозяевам противодействовать патогенным инфекциям. Помимо этих иммунореабилитирующих эффектов, пробиотики также оказывают другие укрепляющие здоровье эффекты на хозяев. Местная микробиота обладает различной биологической активностью, простирающейся от анаболизма до катаболизма крупных молекул, что приводит к благотворному воздействию на здоровье хозяина, а также на саму микробиоту. Микрофлора кишечника может ферментировать

эндогенную слизь и неперевариваемые остатки пищи, а также вырабатывать витамины, такие как витамин К и В [9]. В своих исследованиях британские ученые доказали, что вегетативные клетки *B. subtilis* могут стимулировать экспрессию генов toll-подобного рецептора (TLR) для TLR2 и TLR4. Однако доказано, что споры не могут стимулировать ни то, ни другое и должны взаимодействовать с другим TLR и с помощью этого механизма способствовать активации врожденного иммунитета [10].

В настоящем исследовании было показано, что наличие инвазивности микроорганизмов рода *Bacillus* является важным, но не основным фактором, определяющим их иммуногенную активность, а также установлено, что помимо *B. subtilis* для разработки пробиотических препаратов могут быть рассмотрены виды *B. halotolerans*.

Цель исследования - осуществить поиск энтероинвазивных штаммов микроорганизмов рода *Bacillus* обеспечивающих наибольшую стимуляцию гуморального антигена в отношении аутоантигенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Используемые штаммы и среды

Используемые штаммы микроорганизмов рода *Bacillus* были представлены коллекцией культур лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН и ООО «СиБАФ». Идентификацию культур проводили методом секвенирования 16S рибосомальной РНК по Сенгеру.

Эксперименты на животных

Штаммы тестировали на иммуногенность *in vivo* на перепелах *Coturnix coturnix* породы Техас в возрасте 14 суток. Птиц разделили на 5 опытных групп и 1 контрольную, по 7 особей в каждой. Экспериментальным группам перорально вводили по 200 мкл исследуемых культур трехкратно с интервалом в неделю, контрольной группе по 200 мкл воды, затем проводили взятие крови для серологических исследований. Ежедневно проводили взвешивание птицы.

Изучение влияния энтероинвазивных

штаммов на индукцию провоспалительных сдвигов в стенке кишечника (укорочение кишечных ворсинок *Intestinum jejunum*) у лабораторных животных проводили на мышах ICR (CD-1), которых делили на одну опытную группу и одну контрольную, по 8 особей в каждой. Опытной группе первые двое суток выпаивали 100 мкл суспензии бактерий, относящихся к штамму №5.6 *B. halotolerans*. На 6-ой и 7-ой дни эксперимента повторяли выпаивание, на 8-ой день выводили животных из эксперимента.

По окончании экспериментов животных подвергали эвтаназии и с соблюдением правил асептики производили отбор проб внутренних органов и тканей для дальнейших исследований. Работа с лабораторными животными была осуществлена согласно руководству по содержанию и уходу за лабораторными животными Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях.

Скрининг иммуногенности и инвазивности культур

Напряженность гуморального иммунитета определяли с помощью иммунофлуоресцентной реакции агглютинации (ИРА) исследуемых энтероинвазивных бактерий. В раститрованные в лунках микропланшета с V – образным дном сыворотки крови шагом 1:2 вносили инактивированные нагреванием при 65 °С и окрашенные акридиновым оранжевым бактерии, инкубировали 16 часов при 37 °С, после чего оценивали светимость аутологических О антигенов (образование т.н. зонтиков) на трансиллюминаторе GelDoc BioRad. Последний зонтик является титром антител, связавшихся с О антигеном вводимых бактерий.

Для морфометрического анализа высоты кишечных ворсинок и глубины крипт кусочки тощей кишки фиксировали в 10% забуференном формалине. Проводили диффузионный люминесцентно-микроскопический анализ DLMA. Кусочки кишечника разрезали на ровные пластины и в течение 10 минут окрашивали Hoechst 33258 и 0,001% раствором эозина К, про-

мывали в 20 кратном объеме дистиллированной воды и проводили люминесцентную микроскопию тонкого окрашенного слоя клеток на поверхности слизистой с использованием люминесцентного микроскопа Imager D1 («Zeiss», Германия) и ПО AxioVision («Zeiss», Германия).

Антагонистическую активность оценивали в тестах по сокультированию бактерий с культурами *E.coli*. Подавление *E.coli* действием штаммов *Bacillus spp.* выявляли на селективной среде SDS бульон (если лунка принимала желтый цвет – отмечалось отсутствие антагонистической активности, зеленый – активность есть). ДНКазную активность оценивали с использованием шоколадного агара с ДНК и акридиновым оранжевым, визуализируя ДНКазную активность по снижению флуоресценции ДНК вокруг культур. Устойчивость к канамицину оценивали посевом на LB агар с канамицином (50

мкг/мл). Глюкуронидазную и галактозидазную активность выявляли на среде Uriselect4 («BioRad», США), утилизацию сахаров изучали с использованием тест-стрипов для идентификации API®. Согласно ОФС.1.7.2.0012.15. наличие α и β гемолиза определяли посевом на кровяной агар. Патогенность оценивали посредством внутрибрюшинного и перорального введения суспензий бактерий в дозе 10^7 КОЕ и в дальнейшем работали с непатогенными штаммами.

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали методами вариационной и непараметрической статистики при использовании ПО GraphPad Prism 10. Нормальность распределения оценивали по методу Шапиро-Уилка, статистическую значимость различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента или по методу Манна-Уитни при заданных уровнях значимости $p < 0.05$ и $p < 0.01$.

Таблица 1 – Штаммы микроорганизмов, используемые в экспериментах

Наименование вида	№ Штамма	Sequence ID (фрагмент гена 16S рибосомальной РНК)	Источник и дата изоляции
<i>B.subtilis</i>	2.1	OR668699	19.05.2022 печень мыши
<i>B.halotolerans</i>	5.6	OR668701	27.10.21 сухая почва Алтая
<i>B.subtilis</i>	3.1П	OR668695	19.05.2022 печень мыши
<i>B.atrophaeus</i>	В.а.	OR668700	26.05.2015 кишечник курицы
<i>B.subtilis</i>	19	OR668697	20.10.2011 штамм продуцент протеаз (растительная биомасса)

РЕЗУЛЬТАТЫ/ RESULTS

Исследуемые в опытном эксперименте культуры были описаны по нескольким критериям. Анализ антагонистической, гемолитической и ДНКазной активностей позволил определить штаммы, способные противодействовать патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. К ним относились *B.subtilis* №2.1, *B.subtilis* №3.1П, *B.subtilis* №19, *B.halotolerans* №5.6. Также, были дополнительно изучены иммунобиологические особенности применения штаммов, не относящихся к

виду *B.subtilis*. В частности *B.halotolerans* обладал потенциалом для возможного применения в качестве пробиотического препарата (Таблица 2) и характеризовался отсутствием факторов патогенности (таких как гемолитическая активность). В научной литературе отсутствуют данные об использовании микроорганизмов этого вида в составе пробиотиков и необходимы дополнительные исследования по его изучению для создания коммерческого продукта с его использованием.

Таблица 2 – Характеристики исследуемых штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*

№ Штамма	Вид микроорганизма	Гемолитическая активность	ДНКазная активность	Чувствительность к антибиотикам	Галактозидазная активность	Антагонистическая активность
2.1	<i>B.subtilis</i>	-	-	+	+	-
5.6	<i>B.halotolerans</i>	-	-	+	+	+
3.1П	<i>B.subtilis</i>	-	-	+	+	+
В.а.	<i>B.atrophaeus</i>	+	+	+	+	+
19	<i>B.subtilis</i>	-	-	+	+	-

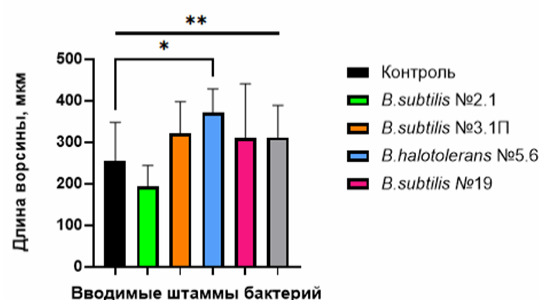


Рисунок 1 – Длина кишечных ворсинок *Intestinum jejunum*, мм (**- $p<0.01$, *- $p<0.05$, mean $\pm$ SD).

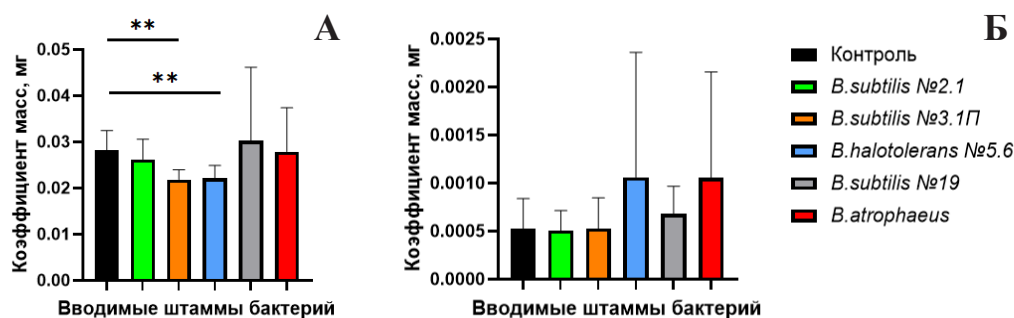


Рисунок 2 – Кoeffициент массы печени (А) и селезенки (Б) к массе тела животных, мг (**- $p<0.01$, mean $\pm$ SD).

Представители нормофлоры кишечника обладают высокой способностью к иммуногенности. В частности, под действием пробиотиков происходит регуляция созревания лимфоидного аппарата кишечника и генерализация иммунного ответа. В эксперименте было отмечено изменение длины ворсинок *Intestinum jejunum* в ответ на введение штаммов ис-

следуемых культур. По результатам однофакторного непараметрического дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса следует, что штаммы *Bacillus spp.* по-разному влияют на длину ворсинок *Intestinum jejunum* перепелов *Coturnix coturnix* ($p<0.01$). Сравнение по критерию Манна-Уитни показало статистически значимое увеличение длины ворсинок ($p<0.05$) при

пероральном введении штамма *B.halotolerans* №5.6 (Рисунок 1). Рост кишечных ворсинок и усиленная пролиферация энтероцитов оказывают влияние на кровоток в слизистой, а также обеспечивают регуляцию многих метаболических и сигнальных процессов ЖКТ. Увеличение длины ворсинок у *Coturnix coturnix* на фоне приема *B.halotolerans* №5.6 может свидетельствовать о большей поверхности всасывания за счет увеличения общей площади ворсинки, что делает его перспективным в качестве пробиотического штамма.

Для групп 5.6 и 3.1П значения коэффициента массы печени к массе тела животных являются значимыми относительно контрольной группы по критерию Манна-Уитни. Остальные группы находятся в зоне незначимости. Коэффициент массы селезенки к массе тела животных у всех опытных групп находится в зоне незначимости относительно контрольных групп (Рисунок 2).

Также, анализ Крускала-Уоллиса выявил неодинаковое влияние штаммов *Bacillus spp.* на образование антител у *Coturnix coturnix* ($p < 0.0001$). Сравнение по Т-критерию Уилкоксона показало, что пероральное введение штаммов *B.subtilis* №3.1П и *B.atrophaeus* приводит к статистически значимому увеличению титра антител. При этом *B.subtilis* №3.1П и

B.halotolerans №5.6 характеризовались большей дисперсией титров антител и вызывали образование антител к собственным О-антигенам (у интактных особей антитела к этим бактериям отсутствовали). Интерес представляет то, что наличие установленного результата инвазивности у микроорганизмов рода *Bacillus*, не отнесенных к видам *B.subtilis* и *B.atrophaeus*, могло не сопровождаться образованием антител. Т.е. появление бацилл в паренхиматозных органах не обязательно стимулировало гуморальный иммунный ответ. *B. subtilis* характеризуется наличием инвазивности у многих штаммов этого вида, что также подтверждается нашими исследованиями. По нашему мнению, именно это свойство вида - основной фактор, определяющий большинство иммуностимулирующих эффектов пробиотиков, содержащих микроорганизмы данного вида. Кроме того, эта же особенность полезна и для транспортировки вакцинных антигенов через слизистые оболочки. Однако наши исследования показали, что иммуногенность и способность преодолевать пищевую толерантность именно у *B. subtilis* обусловлена не только инвазивностью. Следовательно, существуют дополнительные механизмы, которые предстоит изучить в будущем.

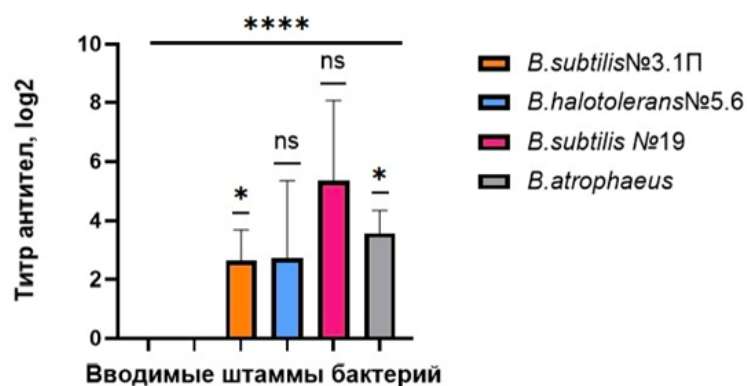
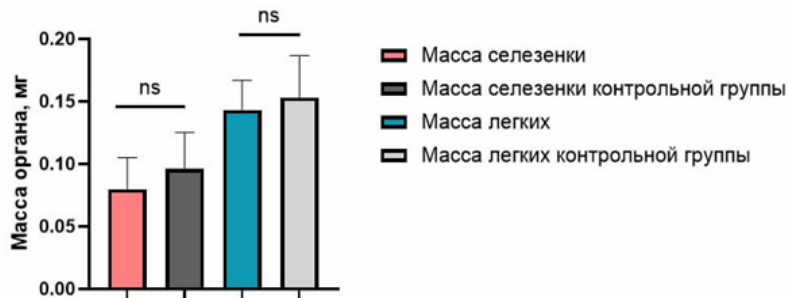
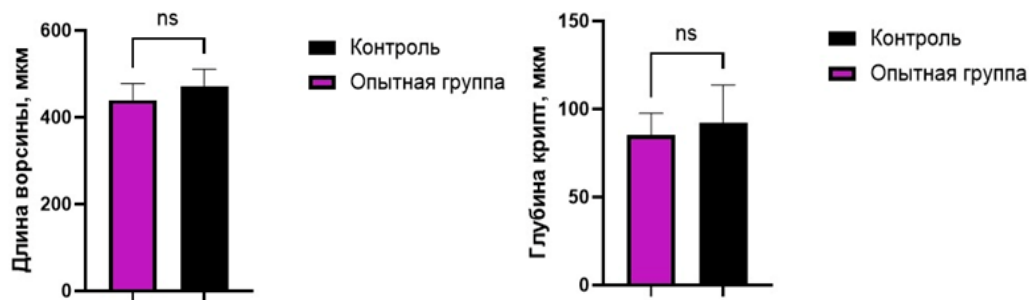


Рисунок 3 – Средний титр ИРА к О-антигенам микроорганизмов рода *Bacillus*, соответствующих экспериментальным группам (Mean±SD, ****- $p < 0.0001$).

Рисунок 4 – Масса органов *Mus musculus*, мг (Mean±SD).Рисунок 5 – Средняя длина кишечных ворсинок и глубина крипты *Mus musculus*, мкм (Mean±SD).

По результатам непараметрического анализа по Манну-Уитни, применение пробиотического штамма *B. halotolerans* №5.6 не приводит к существенным изменениям массы легких и селезенки мышей ICR ($p>0.05$) относительно контрольной группы (Рисунок 4). Также, пероральное введение *B. halotolerans* №5.6 не влияло на длину кишечных ворсинок и глубину крипты *Intestinum jejunum* ($p>0.05$) у мышей линии ICR (Рисунок 5), что может говорить о менее активном иммуностимулирующем эффекте данного микроорганизма в отношении слизистой кишечника (в отличие от *B. subtilis*).

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Среди изученных штаммов рода *Bacillus* отвечающими требованиям, предъявляемым к пробиотическим микроорганизмам, являлись *B. subtilis* №2.1, *B. subtilis* №3.1П, *B. subtilis* №19, *B. halotolerans* №5.6. Штамм №5.6 *B. halotolerans* при пероральном введении приводил к удлинению кишечных ворси-

нок в 1,5 раза у перепелов *Coturnix coturnix* ($p<0.05$), но при этом не оказывал влияния на слизистую оболочку тощей кишки у мышей ICR ($p>0.05$). Не все изученные нами штаммы *B. subtilis*, обладающие способностью к диссеминации во внутренние органы при пероральном введении, обладали способностью к индукции гуморального иммунного ответа на аутологичные О-антигены, что позволяет отвергнуть гипотезу о том, что основным и единственным фактором, определяющим иммуномодулирующую активность *B. subtilis*, является инвазивность.

THE STUDY OF THE INFLUENCE OF PROBIOTIC STRAINS OF THE GENUS BACILLUS ON THE STATE OF INTERNAL ORGANS AND HUMORAL IMMUNITY OF COTURNIX COTURNIX AND MUS MUSCULUS

An K.V.¹ – Junior Researcher, Molecular Biology Sector (ORCID 0009-0003-0354-1697); Mironova T.E.^{1, 2} – Junior Re-

researcher, Molecular Biology Sector, Researcher, Center for Veterinary Immunology and Biotechnology (ORCID 0000-0003-0860-1778); **Kilp A.S.**^{1, 2*} – Researcher, Molecular Biology Sector, Head of Center for Veterinary Immunology and Biotechnology (ORCID 0000-0002-9501-4485); **Afonyushkin V.N.**^{1,2} – PhD in Biology, Head of Molecular Biology Sector, Assoc. Prof., Department of Animal Microbiology and Hygiene (ORCID 0000-0001-5177-4733); **Afonyushkin A.V.**² – student.

¹FGBUN "Siberian Federal Center for Agrobiotechnology SFNCA RAS"

²FGBOU VO "Novosibirsk State Agrarian University"

*bobikova.anna97@gmail.com

ABSTRACT

Studies of *Bacillus* microorganisms open up broad opportunities for the use of probiotic strains in various fields of biotechnology. *Bacillus* microorganisms exhibit antiallergic and antioxidant effects, and produce antibacterial substances, bacteriocins and enzymes, which makes them promising for use as dietary supplements in agriculture and the food industry. *Bacillus*-based probiotics, especially in spore form, are resistant to aggressive conditions and are able to activate a nonspecific cellular immune response. In our study, we evaluated 5 cultures of *Bacillus* microorganisms for the development of probiotic drugs, with a focus on stimulating the humoral antigen response. The studies were conducted on *Coturnix coturnix* quails of the Texas breed (aged 14 days), the birds were divided into 5 experimental groups and 1 control (n = 7), as well as on ICR mice (CD-1), which were divided into one experimental group and one control (n = 8). Antagonistic, hemolytic, galactosidase and DNase activities, as well as sensitivity to kanamycin, were studied. Immunogenicity and invasiveness of cultures were screened by evaluating sera in the immunofluorescence agglutination reaction. The length of intestinal villi in experimental animals was determined, and organs were weighed to determine mass coefficients. It was found that *B.*

halotolerans strain No. 5.6 effectively lengthens intestinal villi in quails, but does not affect the mucous membrane in mice. Our studies confirmed that many *B. subtilis* strains are invasive, which is considered to be the main factor determining their immunostimulatory effects. This property is also useful for delivering vaccine antigens through mucous membranes, but the results showed that immunogenicity and the ability to overcome food tolerance in *B. subtilis* do not depend solely on invasiveness. Other *Bacillus* species, such as *B. halotolerans*, may hold promise for probiotic development.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Федорова О. В. и др. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* // Вестник Казанского технологического университета. – 2016. – Т. 19. – №. 15. – С. 170-174.
2. Батаева Ю. и др. Оценка некоторых фенологических показателей рода *Gossypium hirsutum* (malvaceae) при воздействии биостимуляторов разной природы // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 1 (123). – С. 70-76.
3. Mercado V., Olmos J. Bacteriocin production by *Bacillus* species: Isolation, characterization, and application // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2022. – Т. 14. – №. 6. – С. 1151-1169.
4. Dehghanifar S., Keyhanfar M., Emtiazi G. Production and partial purification of thermostable bacteriocins from *Bacillus pumilus* ZED17 and DFAR8 strains with antifungal activity // Molecular biology research communications. – 2019. – Т. 8. – №. 1. – С. 41.
5. Афонюшкин В.Н. и др. "Малая" биотехнология или хозяйственно-ориентированная биотехнология в ветеринарии - аналог персонализированной медицины. // ВЕТЕРИНАРИЯ. – №. 11. – С. 28-34.
6. Amuguni H., Tzipori S. *Bacillus subtilis*: a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens // Human vaccines & immunotherapeutics. – 2012. – Т. 8. – №. 7. – С. 979-986.

7. Barnes A. G. C. et al. Bacillus subtilis spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen //European journal of immunology. – 2007. – T. 37. – №. 6. – C. 1538-1547.
8. Ashraf R., Shah N. P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms // Critical reviews in food science and nutrition. – 2014. – T. 54. – №. 7. – C. 938-956.
9. Raheem A. et al. Modulatory effects of probiotics during pathogenic infections with emphasis on immune regulation //Frontiers in immunology. – 2021. – T. 12. – C. 616713.
10. Huang J. M. et al. Immunostimulatory activity of Bacillus spores //FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 2008. – T. 53. – №. 2. – C. 195-203.
1. Fedorova O. V. et al. Probiotic preparations based on microorganisms of the genus Bacillus // Bulletin of the Kazan Technological University. - 2016. - Vol. 19. - No. 15. - P. 170-174 (In Russ.).
2. Bataeva Yu. et al. Evaluation of some phenological indicators of the genus Gossypium hirsutum (malvaceae) under the influence of biostimulants of different nature // Bulletin of the Altai State Agrarian University. - 2015. - No. 1 (123). - P. 70-76 (In Russ.).
3. Mercado V., Olmos J. Bacteriocin production by Bacillus species: Isolation, characterization, and application // Probiotics and Antimicrobial Proteins. - 2022. - Vol. 14. - No. 6. – P. 1151-1169.
4. Dehghanifar S., Keyhanfar M., Emtiazi G. Production and partial purification of thermostable bacteriocins from Bacillus pumilus ZED17 and DFAR8 strains with antifungal activity // Molecular biology research communications. – 2019. – Vol. 8. – No. 1. – P. 41.
5. Afonyushkin V.N. et al. "Small" biotechnology or farm-oriented biotechnology in veterinary medicine - an analogue of personalized medicine. // VETERINARY SCIENCE. – No. 11. – P. 28-34 (In Russ.).
6. Amuguni H., Tzipori S. Bacillus subtilis: a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens // Human vaccines & immunotherapeutics. – 2012. – Vol. 8. – No. 7. – pp. 979-986.
7. Barnes A. G. C. et al. Bacillus subtilis spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen //European journal of immunology. – 2007. – T. 37. – No. 6. – pp. 1538-1547.
8. Ashraf R., Shah N.P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms // Critical reviews in food science and nutrition. – 2014. – T. 54. – No. 7. – pp. 938-956.
9. Raheem A. et al. Modulatory effects of probiotics during pathogenic infections with emphasis on immune regulation //Frontiers in immunology. – 2021. – T. 12. – P. 616713.
10. Huang J. M. et al. Immunostimulatory activity of Bacillus spores //FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 2008. – T. 53. – No. 2. – pp. 195-203.
10. Huang J. M. et al. Immunostimulatory activity of Bacillus spores //FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 2008. – T. 53. – No. 2. – pp. 195-203.