

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРЭСНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ, ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Д. С. БОРИСОВЕЦ, Д. В. БУЧУКУРИ, Е. С. ЖУРАВЛЕВА, А. М. МОРОЗОВ, И. А. КУРБАТ

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелецкого»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220063

П. А. КРАСОЧКО, Я. П. ЯРОМЧИК

УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

(Поступила в редакцию 12.10.2020)

Объектом исследования являлись 3 штамма бактерий рода *Bacillus* – *B. licheniformis* 2-1(2)-2, *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1, *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2), выделенные из донных отложений пресноводных водоемов Республики Беларусь в процессе предыдущих исследований. Данные штаммы являлись безвредными и нетоксичными для лабораторных животных, обладали высокой амило- и целлюлолитической активностью, а также широким спектром антибактериальной активности.

Цель настоящего исследования – определить стабильность отобранных штаммов бактерий рода *Bacillus* в процессе пассирования и лиофильного высушивания.

В процессе исследований установлено, что отобранные штаммы в течение 18 пассажей обладали однородными морфологическими, тинкториальными, культуральными свойствами без признаков диссоциации. Отобранные изоляты *B. licheniformis* 2-1(2)-2, *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1, *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2) характеризовались стабильностью амилолитической активности в диапазоне значений от 3,11 до 5,41 ед., целлюлолитической активностью – 1,87-5,39 ед, а также выраженной антибактериальной активностью, которая практически оставалась без изменений в процессе пассирования.

По результатам проведенных исследований штаммы паспортизированы и депонированы в коллекции штаммов микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого» под номерами: *B. licheniformis* 2-1(2)-2 – КМИЭВ – В 209; *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1 – КМИЭВ – В 210; *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2) – КМИЭВ – В 208.

Ключевые слова: пресноводные водоемы, донные отложения, изоляты бактерий рода *Bacillus*, продуценты, пробиотики, биологически активные соединения.

The object of the study was 3 bacterial strains of the genus Bacillus – B. licheniformis 2-1 (2) -2, B. megaterium 3-1 (1) -2 2-1, B. subtilis No. 3-1 (1) -2 1 (2), isolated from bottom sediments of freshwater reservoirs of the Republic of Belarus in the course of previous studies. These strains were harmless and non-toxic for laboratory animals, possessed high amylo- and cellulolytic activity, as well as a wide spectrum of antibacterial activity.

The purpose of this study is to determine the stability of the selected strains of bacteria of the genus Bacillus in the process of passaging and freeze drying.

During the research, it was found that the selected strains for 18 passages had homogeneous morphological, tinctorial, cultural properties without signs of dissociation. The selected isolates of B. licheniformis 2-1 (2) -2, B. megaterium 3-1 (1) -2 2-1, B. subtilis No. 3-1 (1) -2 1 (2) were characterized by the stability of amylolytic activity in the range of values from 3.11 to 5.41 units, cellulolytic activity – 1.87-5.39 units, as well as pronounced antibacterial activity, which practically remained unchanged during the passaging process.

According to the results of the studies, the strains were certified and deposited in the collection of microorganism strains of the RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vyshellessky» under the numbers: B. licheniformis 2-1 (2) – 2-КМИЭВ – В 209; B. megaterium 3-1 (1) – 2 2-1 - КМИЭВ – В 210; B. subtilis No. 3-1 (1) – 2 1 (2) – КМИЭВ – В 208.

Key words: freshwater reservoirs, bottom sediments, isolates of bacteria of the genus *Bacillus*, producers, probiotics, biologically active compounds.

Введение

По уровню биотехнологических исследований и разработок, их внедрения в промышленное производство Республика Беларусь отстает от развитых зарубежных стран. Недостаточны объемы производства биотехнологической продукции, которая закупается за рубежом. Отечественные биопрепараты значительно дешевле иностранных, однако более 70 процентов потребностей республики в них удовлетворяются за счет дорогостоящего импорта. Рынок биотехнологической продукции Республики Беларусь составляет около 400 млн. долларов США, из них продукция отечественного производства составляет менее 20 процентов. Ежегодно закупается за рубежом более 200 наименований средств защиты растений, пробиотиков, премиксов, кормовых аминокислот, консервантов кормов, ветеринарных вакцин на общую сумму около 300 млн. долларов США. Неблагоприятная ситуация сложилась и в области микробиологической промышленности, ввиду того, что выпускаемая продукция в ряде случаев малорентабельна из-за низкой активности исходных микробиологических штаммов [1–3].

Сложившаяся ситуация создает предпосылки для выделения природных форм микроорганизмов рода *Bacillus*, обладающих полезными свойствами (синтез ценных биологически активных соедине-

ний, высокая скорость роста) и перспективных в пробиотическом отношении, их селекции и дальнейшего улучшения.

В ранее проведенных нами исследованиях отобрано 11 образцов тонко- и грубодетритных донных отложений пресноводных водоемов Гомельской, Витебской и Минской областей Республики Беларусь, из которых выделено 15 природных изолятов бактерий. Среди полученных микроорганизмов по культурально-морфологическим признакам было идентифицировано 12 изолятов (*B. subtilis* – 4 изолята, *B. licheniformis* – 3, *B. cereus* – 2, *Bacillus megaterium* – 2, *Lysinibacillus sphaericus* – 1 изучены морфолого-культуральные и физиологические особенности, установлен химический состав продуктов метаболизма выделенных штаммов (содержание белка, количество аминокислот, витаминов, ферментов и т.д.) [4].

По показателям безвредности и при определении острой токсичности на белых мышах для дальнейшего применения из 12 изолятов бактерий рода *Bacillus* отобраны три культуры бактерий: *B. licheniformis* 2-1(2)-2, *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1 и *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2), которые могут быть применены при конструировании пробиотических препаратов, предназначенных для лечения болезней желудочно-кишечного тракта молодняка сельскохозяйственных животных, так как обладают амило- и целлюлолитической активностью, а также широким спектром антибактериального действия [5].

Цель настоящей работы – определить стабильность отобранных штаммов бактерий рода *Bacillus* в процессе пассирования и лиофильного высушивания.

Основная часть

Стабильность отобранных штаммов бактерий рода *Bacillus* изучали в течение 18 пассажей и 18 циклов лиофильного высушивания.

Культивирование отобранных штаммов бацилл проводили на оптимизированной питательной среде SMS с добавлением мелассы в концентрации 30 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в количестве 2,5 г/л, солей $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ в концентрации 30 г/л.

Накопление биомассы проводили методом погруженного культивирования каждого штамма в шейкерных колбах объемом 250 мл и в ферментере РФ-2.10 объемом 10 л.

Для засева готовили микробную культуру с концентрацией 1 млрд. м. т./см³ объемом 400 мл, которую вносили в ферментер. Условия культивирования:

Bacillus megaterium – 38°C, pH 6,6, аэрация 150 об/мин;

Bacillus licheniformis – 37°C, pH 7,0, аэрация 150 об/мин;

Bacillus subtilis – 42°C, pH 6,8, аэрация 150 об/мин.

Культивирование проводили в течение 48 часов для получения высоких спорных титров выделенных культур, контролируя температуру, pH и аэрацию.

В процессе культивирования проводили отбор проб культуральной жидкости, в которой определяли численность жизнеспособных бактерий (м.т./мл) методом серийных разведений с последующим высевом на агаризованную питательную среду.

Для лиофильного высушивания выращенных штаммов готовили стабилизирующую среду высушивания, в состав которой входили гидролизат лактальбумина (20 %), сахароза (50 %) и желатоза (10 %) в соотношении 5:2:1. Смешивание производили в соотношении среда высушивания:бактериальный антиген – 40:60. Бактериальную взвесь выдерживали со стабилизационной средой при температуре плюс 6–10 °С не менее 60–90 мин, а затем расфасовывали в пенфлаконы.

Для контроля стабильности селекционированных штаммов после лиофильного высушивания проводили отбор проб каждого штамма с целью изучения их морфолого-культуральных свойств, а также амило-, целлюло-, и антибактериальной активности.

Морфолого-культуральные свойства отобранных штаммов рода *Bacillus* изучали с помощью общепринятых микробиологических методов – фиксировали цвет, размер, консистенцию колоний на плотной среде, гладкость краёв, прозрачность, проводили окрашивание мазков по Граму методом Fluка, а также окраску бактериальных спор по методу Шеффера-Фултона.

Определение амило- и целлюлолитической активности. Для определения сахаролитического фермента амилазы готовили субстратную смесь следующего состава: 0,5 мл 2 % раствора крахмала и 0,5 мл 0,2 М фосфатного буфера (pH 7,0).

Для определения целлюлолитического фермента целлюлазы готовили субстратную смесь: 0,5 мл 2 % раствора КМЦ и 0,5 мл 0,2 М фосфатного буфера (pH 7,0).

Концентрацию образовавшихся восстанавливающих сахаров определяли по калибровочному графику, построенному с использованием 0,1 % раствора глюкозы (100–800 мкг/мл).

Определение антибактериальной активности. Субстратная смесь – сердечно-мозговой агар с концентрацией агара 1,2 и 2 % (pH 6,8–7,0). Тест-культура – *Salmonella dublin*. Пробойником из инокулированных бактериями агаровых пластинок вырезали диски диаметром 10 мм, получая на каждой

чашке Петри по 2 симметрично расположенных отверстия, в которые вносили по 0,2 мл 24-часовой бульонной культуры каждого бактериального штамма, затем чашки Петри устанавливали в холодильник при плюс 10 °С для диффузии и спустя 2–3 ч переносили в термостат с температурой (37±1)°С. Через 24 ч измеряли диаметр образовавшихся вокруг лунок зон ингибирования роста тест-культуры.

За окончательный результат испытания принимали среднее арифметическое значение величины диаметра зоны ингибирования роста тест-объекта, рассчитанное по данным, полученным на пяти чашках Петри.

При культивировании в оптимизированной питательной среде на протяжении 18 пассажей штаммы *B. licheniformis* 2-1(2)-2, *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1, *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2) характеризовались стабильно высокой продуктивностью и скоростью роста, при которой уровень накопления штаммов бацилл увеличивался на 36,4-48% через 12 часов культивирования в сравнении с исходной питательной средой и составлял в пределах $7,4 \cdot 10^9 - 8,2 \cdot 10^9$ м.т./см³.

Оптимальной температурой роста в условиях погруженного культивирования *Bacillus subtilis* являлось значение 42 °С, *Bacillus licheniformis* – 37 °С, *Bacillus megaterium* – диапазон от 36 до 39 °С. Оптимальной pH роста *Bacillus subtilis* являлось значение pH 6,7 – 7,3, *Bacillus licheniformis* – значение pH 6,8 – 7,2, *Bacillus megaterium* – pH 6,4 – 6,9, при этом степень накопления штаммов при данных оптимальных параметрах температуры и pH оставалась стабильной на протяжении проведенных 18 пассажей.

Было установлено, что отобранные штаммы в течение 18 пассажей обладали однородными морфологическими, тинкториальными, культуральными свойствами без признаков диссоциации (табл. 1).

Таблица 1. Морфолого-культуральные свойства выделенных изолятов бактерий рода *Bacillus* в процессе пассирования

Штамм	Морфология колоний					Морфология клеток		Грампринадлежность	Наличие спор
	Форма	Размер, мм	Цвет	Профиль	Край	Морфотип клеток	Размеры клеток, мкм		
<i>B. subtilis</i> № 3-1(1)-2 1(2)	округлая	2,5–3,0	кремовые	мелкоморщинистые	волнистый	Короткие, септированные палочки	2,0–5,0 × 0,4–0,6	+	+
<i>B. licheniformis</i> 2-1(2)-2	округлая	4,0–6,0	непрозрачные белесые	слабовыпуклые сухие	волнистый	Длинные, тонкие, септированные палочки	0,5–0,8 × 1,5–3,0	+	+
<i>B. megaterium</i> 3-1(1)-2 2-1	округлая	3,0–5,0	кремовые	плоские шероховатые матовые	волнистый	Крупные, толстые, равномерно окрашенные палочки	1,2–2,0 × 3,0–5,0	+	+

Результаты определения амило- и целлюлолитической активности выделенных изолятов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Амило- и целлюлолитическая активность выделенных изолятов бактерий рода *Bacillus* в процессе пассирования

№ п/п	Штамм	Амилолитическая активность, ед.			Целлюлолитическая активность, ед.		
		6 пассаж	12 пассаж	18 пассаж	6 пассаж	12 пассаж	18 пассаж
1	<i>B. licheniformis</i> 2-1(2)-2	3,11	3,24	3,15	1,95	1,87	1,98
2	<i>B. megaterium</i> 3-1(1)-2 2-1	5,41	5,15	5,2	5,39	5,24	5,2
3	<i>B. subtilis</i> № 3-1(1)-2 1(2)	5,02	5,03	4,98	2,9	2,87	2,83

По данным табл. 2 отобранные изоляты *B. licheniformis* 2-1(2)-2, *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1, *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2) характеризовались стабильностью амилолитической активности в диапазоне значений от 3,11 до 5,41 ед., целлюлолитической активностью – 1,87–5,39 ед.

Результаты определения антибактериальной активности отобранных изолятов *B. licheniformis* 2-1(2)-2, *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1, *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2) в процессе пассирования представлены в табл. 3.

Таблица 3. Антибактериальная активность выделенных изолятов бактерий рода *Bacillus* в процессе пассирования

Тест-культура	Зоны задержки роста, мм								
	<i>B. licheniformis</i> 2-1(2)-2			<i>B. megaterium</i> 3-1(1)-2 2-1			<i>B. subtilis</i> № 3-1(1)-2 1(2)		
	6 пассаж	12 пассаж	18 пассаж	6 пассаж	12 пассаж	18 пассаж	6 пассаж	12 пассаж	18 пассаж
<i>Salmonella dublin</i>	18	23	20	23	20	22	21	21	20

Данные табл. 3 свидетельствуют о выраженной антибактериальной активности отобранных изолятов бактерий рода *Bacillus*, которая практически остается без изменений в процессе пассирования.

Таким образом, селекционированные штаммы *B. licheniformis* 2-1(2)-2, *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1, *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2) характеризуются стабильностью морфолого-культуральных свойств, а также постоянной амило-, целлюлолитической, и антибактериальной активностью в процессе пассивации и лиофильного высушивания.

По результатам проведенных исследований штаммы паспортизированы и депонированы в коллекции штаммов микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского». Депонированным штаммам присвоены следующие номера:

- *B. licheniformis* 2-1(2)-2 – КМИЭВ – В 209;
- *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1 – КМИЭВ – В 210;
- *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2) – КМИЭВ – В 208.

Заключение

Анализ настоящих, а также ранее опубликованных [4, 5] исследований показывает, что селекционированные штаммы *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis* являются безвредными и нетоксичными для лабораторных животных; обладают широким спектром антибактериальной активности в отношении грам+ и грам- микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella dublin*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) с зонами задержки роста – 15–28 мм; обладают выраженной амило- и целлюлолитической активностью.

Установленные свойства выделенных штаммов в сочетании со стабильно высокой продуктивностью и скоростью роста, однородными морфологическими, тинкториальными, культуральными, физиолого-биохимическими и генетическими свойствами, позволят их использовать для конструирования комплексных про- и пребиотических препаратов, применяемых в комплексной терапии и профилактике инфекционной желудочно-кишечной и респираторной патологии телят, ацидозно-кетозных состояний коров, а также в составе кормовых добавок для повышения прироста массы тела животных.

Установленные биологические свойства выделенных штаммов позволяют определить перспективы их дальнейшего практического использования в биотехнологической отрасли в качестве штаммов-продуцентов биологически активных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние препарата на основе фитолектинов и пробиотиков «Метафитохит» на обменные процессы телят при энтеритах / П. А. Красочко, Е. С. Журавлева, И. А. Красочко, Д. С. Борисовец, И. А. Курбат // Актуальные проблемы и инновации в современной ветеринарной фармакологии и токсикологии : материалы V Международного съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов, Витебск, 26–30 мая 2015 г. / УО ВГАВМ; редкол. А. И. Ятусевич (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2015. – С. 105–109.
2. Идентификация и изучение свойств природных микроорганизмов, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов / П. А. Красочко, Д. С. Борисовец, Т. А. Зуйкевич, А. М. Морозов, Т. М. Прокопенкова, И. Н. Деревянко // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 26–27 ноября 2015 г. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелеского»; редкол. П. А. Красочко (гл. ред.) [и др.]. – Минск: ИВЦ Минфина, 2015. – С. 97–100.
3. Лечебная и профилактическая эффективность про- и пребиотических препаратов при инфекционных энтеритах телят / П. А. Красочко, Д. С. Борисовец, Т. А. Зуйкевич, В. В. Черняк, А. М. Морозов // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 26–27 ноября 2015 г. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелеского»; редкол. П. А. Красочко (гл. ред.) [и др.]. – Минск: ИВЦ Минфина, 2015. – С. 114–117.
4. Выделение штаммов бактерий рода *Bacillus* spp. из донных отложений пресноводных водоемов Республики Беларусь и изучение их биологических свойств / Д. С. Борисовец, Е. С. Журавлева, А. М. Морозов, Д. А. Кривец // Экология и живот. мир. – 2019. – № 2. – С. 59–67.
5. Биологические свойства штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов / Д. С. Борисовец, Е. С. Журавлева, П. А. Красочко, Я. П. Яромчик, А. М. Морозов, И. А. Курбат // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: научно-практический журнал. – Витебск, 2020. – Т. 56, вып. 2. – С. 121–128.