

**Наталья Владимировна Донкова**

Красноярский государственный аграрный университет, заведующая кафедрой анатомии, патологической анатомии и хирургии, доктор ветеринарных наук, профессор, Красноярск, Россия

E-mail: dnv-23@mail.ru

**Сергей Александрович Донков**

Красноярский государственный аграрный университет, доцент кафедры анатомии, патологической анатомии и хирургии, кандидат биологических наук, Красноярск, Россия

E-mail: dnv-23@mail.ru

**ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ ИЗ РОДА *BACILLUS*  
ПРИ ГИДРОЛИЗЕ КРАХМАЛСОДЕРЖАЩЕГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Цель исследования – изучение сравнительной амилолитической активности у различных видов бацилл из рода *Bacillus*. Задачи исследования – изучение амилолитической активности у *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, а также установление числа спор у данных видов микроорганизмов, проявляющих максимальный амилолитический эффект. Исследование выполнено в условиях научно-производственной лаборатории «Биотехнология кормовых добавок» кафедры анатомии, патологической анатомии и хирургии Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины, а также в научно-исследовательском испытательном центре (НИИЦ) Красноярского ГАУ. Микроорганизмы выделены и идентифицированы до вида из представленного нами материала в ФГУП ГосНИИ Генетика (Москва). Споры бацилл были получены в условиях научно-производственной лаборатории кафедры «Биотехнология кормовых добавок». Подсчет числа спор *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*; *Bacillus licheniformis*, содержащихся в культуральных жидкостях, проводили согласно методике ОФС.1.7.2.0008.15 «Определение концентрации микробных клеток» с применением счетной камеры Горяева. Исследование проводили с 3-кратной повторяемостью для получения статистически достоверных результатов. Зоны обесцвечивания йода вокруг капель культуральной жидкости у разных видов бацилл имели различный диаметр, что говорит о различной амилолитической активности фермента, продуцируемого *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*. Наибольшей амилолитической активностью обладает *Bacillus subtilis*. Несколько меньшая амилолитическая активность выявлена у *Bacillus licheniformis*, а самая низкая амилолитическая активность определялась у *Bacillus cereus*. *Bacillus subtilis* используется нами в качестве активного продуцента амилолитического фермента для ферментативного гидролиза крахмалсодержащего растительного сырья при получении из него сахаросодержащей кормовой добавки, предназначенной для молодняка сельскохозяйственных животных. Число спор, дающих максимальный амилолитический эффект у *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus cereus*, составило 125 000 спор/мл.

**Ключевые слова:** пробиотик, амилолитическая активность, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*.

**Natalya V. Donkova**

Krasnoyarsk State Agrarian University, Head of Department of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Krasnoyarsk, Russia

E-mail: dnv-23@mail.ru

**Sergei A. Donkov**

Krasnoyarsk State Agrarian University, Associate Professor of Department of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, candidate of biological sciences, Krasnoyarsk, Russia

E-mail: dnv-23@mail.ru

## ENZYMATIC ACTIVITY OF BACTERIA FROM GENUS *BACILLUS* DURING HYDROLYSIS OF STARCH-CONTAINING VEGETABLE RAW MATERIALS

The aim of research was to study the comparative amyolytic activity in different species of bacilli from the genus *Bacillus*. The objectives of the study were to research the amyolytic activity in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, as well as to establish the number of spores in these types of microorganisms that exhibit the maximum amyolytic effect. The study was carried out in the research and production laboratory "Biotechnology of feed additives" of the Department of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery of the Institute of Applied Biotechnology and Veterinary Medicine, as well as in the Research and Testing Center (SRIC) of the Krasnoyarsk State Agrarian University. Microorganisms were separated out and identified to species from the material presented by us at the Federal State Unitary Enterprise State Research Institution Genetics (Moscow). Spores of bacilli were obtained in the conditions of the research and production laboratory of the department "Biotechnology of feed additives". Counting the number of spores of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*; *Bacillus licheniformis* contained in culture fluids was carried out according to the method of General Pharmacopoeia Monograph.1.7.2.0008.15 "Determination of microbial cells concentration" using a Goryaev counting chamber. The study was carried out with 3-fold repeatability to obtain statistically significant results. The zones of iodine discoloration around the droplets of the culture fluid in different bacilli species had different diameters, which indicate different amyolytic activity of the enzyme produced by *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* has the highest amyolytic activity; slightly lower amyolytic activity was found in *Bacillus licheniformis*, and the lowest amyolytic activity was found in *Bacillus cereus*. We used *Bacillus subtilis* as an active producer of amyolytic enzyme for enzymatic hydrolysis of starch-containing plant raw materials when obtaining from it a sugar-containing feed additive intended for young farm animals. The number of spores giving the maximum amyolytic effect in *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus cereus* was 125,000 spores/ml.

**Keywords:** probiotic, amyolytic activity, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*.

**Введение.** В нашей стране и за рубежом для производства препаратов, обладающих пробиотическими свойствами, широко использовались микроорганизмы из семейств *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также спорообразующие бактерии из рода *Bacillus*.

Выявленная способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотический эффект привела к разработке препаратов, отнесенных к поколению «самоэлиминирующихся антагонистов», т. е. бактерий, не являющихся постоянными обитателями пищеварительного тракта и быстро выводящиеся (элиминирующиеся) из организма. На основе спорообразующих бактерий в настоящее время в мире создано более пятидесяти препаратов, обладающих пробиотическими свойствами. В Российской Федерации на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* разработаны более двадцати пробиотических препаратов, широко используемых в том числе и в ветеринарной медицине [1]. Пробиотические пре-

параты данной группы представляют собой различные штаммы живых бактерий рода *Bacillus subtilis*, которые подвергаются лиофилизации и представляют собой сыпучую взвесь или могут быть в жидкой форме, являясь по сути культуральной жидкостью с микроорганизмами. Микроорганизмы проявляют устойчивость к антибиотикам и обладают выраженной антагонистической активностью по отношению к энтеропатогенным бактериям. Пробиотики, изготовленные на основе бактерий рода *Bacillus subtilis*, используют при дисбактериозе различной этиологии, а также после антибиотикотерапии с целью нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

На основе применения *Bac. subtilis* якутскими учеными разработан препарат «Сахабактисубтил», который кроме лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний рекомендовано применять для коррекции микробиоценоза гениталий у коров.

В последнее время в ряде пробиотических препаратов кроме *Bacillus subtilis* стали использовать другие виды бацилл. Например, в препарате «Бактисубтил» (Франция) действующим веществом являются споры *Bacillus cereus*, а пробиотики «БиоПлюс» (Германия) и «Биоспорин» (Россия) в своем составе содержат живые лиофилизированные клетки спорообразующих бактерий *Bacillus licheniformis*.

Представители рода *Bacillus* способны активно продуцировать целый ряд ферментов, расщепляющих крахмал, целлюлозу, белки, жиры [2], что определяет широкий спектр их биологической активности.

Установлено, что амилазная активность микробов является результатом сложного преобразования генетической программы клетки [3]. При этом основным фактором, подтверждающим способность микроорганизмов подвергать гидролизу крахмал, является экспериментальное обнаружение амилазной активности, а не наличие в его геноме гена  $\alpha$ -амилазы. Такой подход определяет приоритет функциональной активности амилолитических ферментов над их генетической детерминантой и обуславливает важность разработки методов исследования оценки выработки амилаз микробными клетками рода *Bacillus* [4].

**Цель исследования:** изучение сравнительной амилолитической активности у различных видов бацилл из рода *Bacillus*.

**Задача исследования:** изучение амилолитической активности у *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, а также установление числа спор у данных видов микроорганизмов, проявляющих максимальный амилолитический эффект.

**Материал и методы исследования.** Исследование выполнено в условиях научно-производственной лаборатории «Биотехнология кормовых добавок» кафедры анатомии, патологической анатомии и хирургии Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины, а также в научно-исследовательском испытательном центре (НИИЦ) Красноярского ГАУ. Амилолитическую активность изучали у трех видов бацилл: *Bacillus subtilis*, *Bacillus ce-*

*reus* и *Bacillus licheniformis*. Микроорганизмы выделены и идентифицированы до вида из предоставленного материала в ФГУП ГосНИИ Генетика (Москва). Было установлено, что все виды бацилл продуцировали амилолитический фермент, при этом уровень амилолитической активности каждого вида бацилл не был установлен.

Из изученных микроорганизмов нами используется *Bacillus subtilis*. На основе его использования разрабатывается технология получения из зернового сырья кормовой добавки для молодняка сельскохозяйственных животных в виде сахаросодержащего продукта, обладающего пробиотическими свойствами. Добавка содержит в своем составе до 70 % сахаров. Ранее установлено, что введение ее в рацион телят увеличивает привесы и повышает сохранность. Сохранность телят связана с лечебно-профилактическим действием, обусловленным наличием в добавке *Bacillus subtilis*, которая также продуцирует амилолитический фермент, расщепляющий сложные сахара до простых, и обладает антагонистической активностью в отношении ряда энтеропатогенных микроорганизмов [5].

Тестирование амилолитической активности *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* проводили согласно методике, представленной в [6], в нашей модификации. Для этого в чашки Петри наливали горячую питательную среду, состоящую из 1,5 %-го агар-агара и 1 %-го крахмального клейстера. На застывшую поверхность накапывали по капле культуральной жидкости *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*. Чашки Петри помещали в термостат на 24 ч при температуре 39 °С. На следующий день чашки извлекали из термостата и наливали на поверхность среды раствор Люголя, разведенный дистиллированной водой в соотношении 1 : 10. Медленным покачиванием распределяли раствор Люголя по всей поверхности плотной питательной среды. Избыток раствора Люголя сливали. Среда приобретала темно-синий цвет за исключением тех зон, где под действием фермента крахмал расщепился. Амилолитическую активность каждого вида бацилл оценивали

по величине диаметра зоны обесцвечивания йода вокруг капель.

Контрольной пробой служила чашка Петри с плотной питательной средой и йодом, но вместо культуральной жидкости вносили каплю дистиллированной воды.

Споры бацилл были получены в условиях научно-производственной лаборатории кафедры «Биотехнология кормовых добавок».

Подсчет числа спор *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, содержащихся в культуральных жидкостях, проводили согласно методике, изложенной в [7], с применением счетной камеры Горяева.

Все исследования проводили с 3-кратной повторяемостью для получения статистически достоверных результатов.

Микроскопию мазков и микрофотосъемку изучаемого материала проводили при помощи микроскопа Levenhuk с тринокулярной насадкой и цифровой камеры к нему, с выводом изображения на монитор. Достоверность полученных результатов определялась при помощи программы Statistica и уровня достоверности различий.

**Результаты исследования.** В контрольных чашках Петри вокруг капель дистиллированной воды не наблюдали зон обесцвечивания йода.

Данные по изучению амилалитической активности различных видов бацилл представлены на рисунках 1, 2 и в таблице.

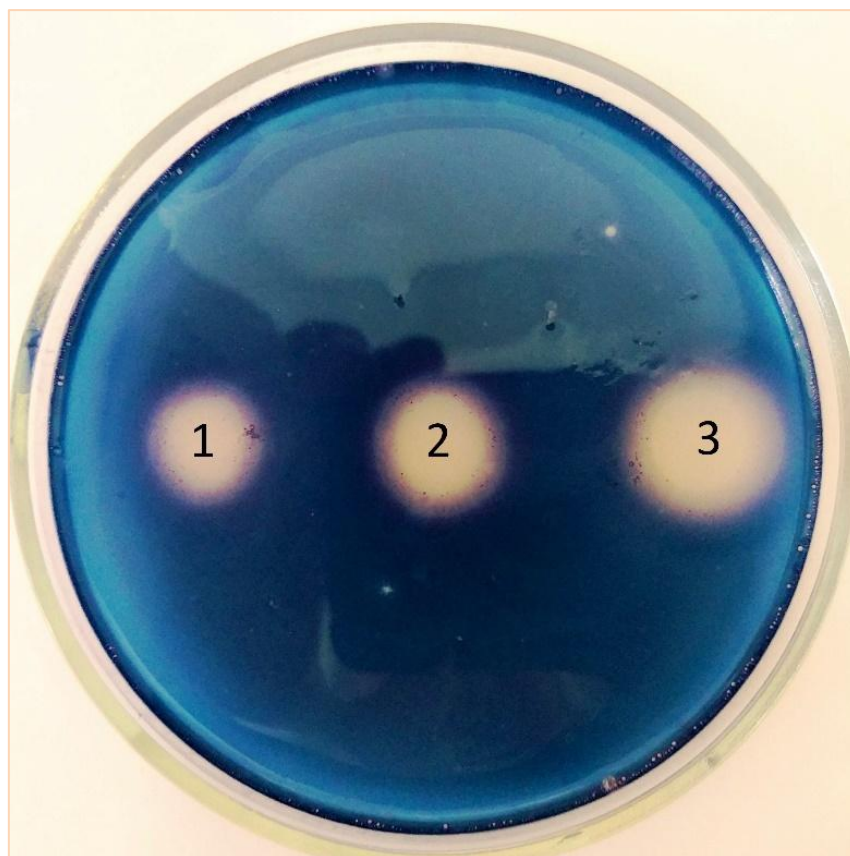


Рис. 1. Зоны обесцвечивания йода различными видами бацилл:  
1 – *Bacillus cereus*; 2 – *Bacillus licheniformis*; 3 – *Bacillus subtilis*

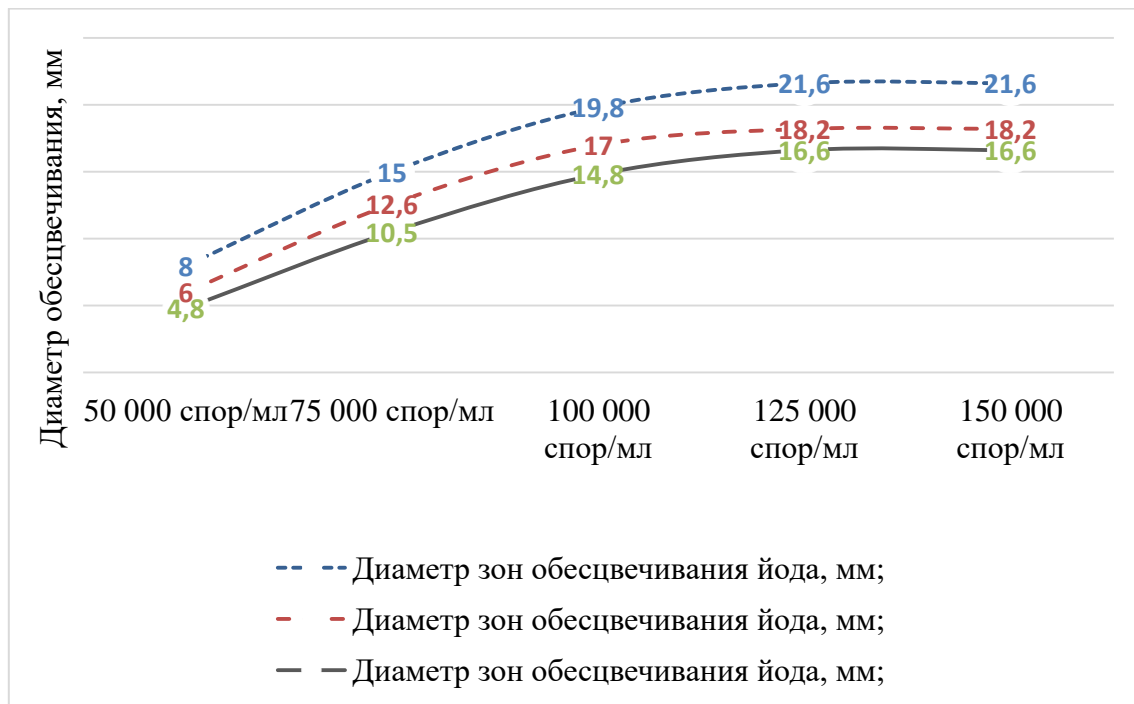


Рис. 2. Зависимость диаметра зон обесцвечивания йода от количества спор в 1 мл культуральной жидкости

Зоны обесцвечивания йода вокруг капель культуральной жидкости у разных видов бацилл имели различный диаметр, что говорит о различной амилолитической активности фермента, продуцируемого *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*.

Результаты измерения диаметров зон обесцвечивания крахмала вокруг капель культуральной жидкости в зависимости от количества содержащихся в них спор бацилл представлены в таблице.

#### Размер диаметра зон обесцвечивания йода у разных видов бацилл

Кол-во внесенных спор, спор/мл	Диаметр зон обесцвечивания йода, мм		
	<i>Bac. subtilis</i>	<i>Bac. licheniformis</i>	<i>Bac. cereus</i>
50 000	8±0,5	6±0,4	4,8±0,7
75 000	15±0,8	12,6±0,5	10,5±0,6
100 000	19,8±0,8	17±0,6	14,8±0,9
125 000	21,6±0,5	18,2±0,9	16,6±1,8
150 000	21,6±0,5	18,2±0,9	16,6±1,8

Как следует из данных, представленных в таблице, максимальные зоны обесцвечивания йода были у всех изучаемых видов бацилл при содержании в 1 мл культуральной жидкости 125 000 спор. Наибольший диаметр зоны обесцвечивания йода был у *Bacillus subtilis*, он составил 21,6±0,5 мм. Несколько меньший диаметр зоны обесцвечивания йода был у *Bacillus licheniformis*, а наименьший диаметр зоны обесцвечивания йода – у *Bacillus cereus*.

Несмотря на то, что диаметр зоны обесцвечивания йода у *Bacillus licheniformis* был несколько больше, чем у *Bacillus cereus*, эти различия были не достоверны ( $p \geq 0,05$ ), а вот различия в диаметре зоны обесцвечивания у *Bacillus subtilis* были достоверно больше, чем у других видов бацилл ( $p \leq 0,05$ ).

Диаметр зоны обесцвечивания у всех видов бацилл коррелировал с количеством спор, имевшихся в капле, т. е. чем больше спор было в

капле культуральной жидкости, тем больше был диаметр зоны обесцвечивания йода.

Зависимость диаметра зон обесцвечивания йода от количества спор, содержащихся в 1 мл культуральной жидкости у разных видов бацилл, представлена на графике рисунка 2.

Представленные результаты свидетельствуют, что по мере увеличения количества спор увеличивается и зона обесцвечивания йода.

Максимальные диаметры зон обесцвечивания йода, определяющие максимальную амилитическую активность у изучаемых видов бацилл, были установлены в количестве 125 000 спор/мл. При этом у *Bacillus cereus* диаметр зоны обесцвечивания составил  $16,6 \pm 1,8$  мм; у *Bacillus licheniformis* –  $18,2 \pm 0,9$ ; а у *Bacillus subtilis* –  $21,6 \pm 0,5$  мм.

Дальнейшее возрастание числа вносимых спор у всех видов бацилл, превышающих 125 000 спор на 1 мл, не приводило к увеличению зоны обесцвечивания йода.

### Выводы

1. По степени ферментативной (амилитической) активности бациллы располагались в следующем убывающем порядке: *Bacillus subtilis*, затем *Bacillus licheniformis* и наименьшая амилитическая активность определялась у *Bacillus cereus*.

2. Число спор, дающих максимальный амилитический эффект у *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus cereus*, составило 125 000 спор/мл.

### Литература

1. Овсянников Ю.С., Тихонов Г.И., Голунова О.В. Пробиотики в ветеринарии // Ветеринарная медицина. 2009. № 1-2. С. 66–68.
2. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. 2007. № 2. С. 32–33.

3. Бруслик Н.Л., Каюмов А.Р., Богачев М.И. и др. Сравнительная характеристика амилитической активности грамположительных бактерий // Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2014. № 2. С. 47–51.
4. Свердлов Е.Д. Микрокосм гена // Молекулярная биология. 1999. Т. 33. С. 917–940.
5. Донкова Н.В., Донков С.А. Изучение антагонистической активности амилитических штаммов *Bacillus subtilis* // Международный вестник ветеринарии. 2016. № 2. С. 46–50.
6. ОФС 42. Требования к штаммам микроорганизмов, используемые для производства пробиотиков для медицинского применения. URL: <https://garant.ru>.
7. ОФС.1.7.2.0008.15. Определение концентрации микробных клеток. URL: <http://garant.ru>.

### Literatura

1. Ovsyannikov Yu.S., Tihonov G.I., Golunova O.V. Probiotiki v veterinarii // Veterinarnaya medicina. 2009. № 1-2. S. 66–68.
2. Pohilenko V.D., Perelygin V.V. Probiotiki na osnove sporoobrazuyuschih bakteriy i ih bezopasnost' // Himicheskaya i biologicheskaya bezopasnost'. 2007. № 2. S. 32–33.
3. Bruslik N.L., Kayumov A.R., Bogachev M.I. i dr. Sravnitel'naya harakteristika amilolicheskoy aktivnosti grampolozhitel'nyh bakteriy // Vestnik VGU. Ser. Himiya. Biologiya. Farmaciya. 2014. № 2. S. 47–51.
4. Sverdlov E.D. Mikrokosm gena // Molekulyarnaya biologiya. 1999. T. 33. S. 917–940.
5. Donkova N.V., Donkov S.A. Izuchenie antagonistscheskoy aktivnosti amilolicheskikh shtammov *Bacillus subtilis* // Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii. 2016. № 2. S. 46–50.
6. OFS 42. Trebovaniya k shtammam mikroorganizmov, ispol'zuemye dlya proizvodstva probiotikov dlya medicinskogo primeneniya. URL: <https://garant.ru>.
7. OFS.1.7.2.0008.15. Opredelenie koncentracii mikrobnnyh kletok. URL: <http://garant.ru>.