

SYNTHESIS OF SUBUNIT B OF *ESCHERICHIA COLI* THERMOLABILE TOXIN USING BACTERIAL CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS SYSTEM

*I. S. KAZLOUSKI¹, I. V. BELSKAYA², A. V. SOLOVYOVA³,
A. I. ZINCHENKO¹, O. N. NOVIKOVA³, Yu. V. LOMAKO³*

*¹Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
zinch@mbio.bas-net.by*

*²The Republican Research and Practical Center for Epidemiology
and Microbiology, Minsk, Belarus, labsanvir@gmail.com*

*³The S. N. Vyshelsky Institute of Experimental Veterinary Medicine,
Minsk, Belarus, bievmtut@tut.by*

Feasibility of producing the recombinant B subunit of *Escherichia coli* thermolabile toxin by cell-free biosynthesis procedure as an alternative to classical submerged fermentation method was evaluated in the present investigation. Chimeric RNA polymerase of T7 bacteriophage, S30-cell extract of *E. coli* and commercial plasmid vector pET42(+) with the inserted *eLTB* gene were engaged for protein synthesis. The authors demonstrated the first successful synthesis of subunit B in the cell-free system. The volumetric yield of the end product under optimized process conditions equaled 1.6 mg/ml of the reaction mixture.

Поступила в редакцию 07.05.2020

УДК 579.62

СКРИНИНГ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ – ОСНОВЫ ПРЕПАРАТА ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ РУБЦОВОГО ПИЩЕВАРЕНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*К. В. КАНТОР¹, Н. В. НАХАЕВА¹, Т. В. РОМАНОВСКАЯ¹,
Н. В. СВЕРЧКОВА¹, А. Н. МИХАЛЮК², Э. И. КОЛОМИЕЦ¹*

*¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
microbio@mbio.bas-net.by*

*²Гродненский государственный аграрный университет,
alex-vet@mail.ru*

Выделено около 200 изолятов спорообразующих бактерий рода *Bacillus* из содержимого рубцов крупного рогатого скота, диких животных и подстилки животноводческих ферм. Исследована их ферментативная активность, оцене-

но антимикробное действие в отношении условно-патогенной микробиоты животных. Отобраны и идентифицированы штаммы, характеризующиеся наиболее высокими показателями ферментативной и антагонистической активности, перспективные в качестве основы пробиотической кормовой добавки для нормализации рубцового пищеварения крупного рогатого скота.

Введение. Молочная отрасль является одной из наиболее значимых в системе агропромышленного комплекса республики. Производство молока в Беларуси из года в год стабильно увеличивается и к 2025 г., согласно стратегии развития молочной отрасли, составит свыше 9 млн т [1]. Очевидно, что это достижимо только при условии сохранения численности поголовья коров и снижения уровня их непроемственного выбытия, которое, как правило, связано с различными нарушениями обмена веществ. Наиболее частым и тяжелым из них является ацидоз, поражающий до 75 % поголовья. Причиной возникновения этого заболевания служит добавление в рацион коров с целью повышения надоев большого количества концентрированных и консервированных кормов, богатых протеином и крахмалом [2]. При их использовании происходит активное развитие в рубце бактерий лактат-синтезаторов, гидролизующих крахмал с образованием в качестве промежуточного продукта молочной кислоты, которая в дальнейшем трансформируется в пропионат – основной субстрат глюконеогенеза. Однако при избытке молочной кислоты процесс преобразования реализуется не до конца, вследствие чего происходит ее накопление в рубце и тканях организма, вызывая нарушение кислотно-щелочного равновесия, что является основным патогенетическим механизмом развития ламинита, гепатоза, поражения почек, остеомалации и артритов [3–5]. Кроме того, на фоне нарушения обмена веществ ослабляется иммунитет животного и повышается чувствительность организма к возбудителям инфекций. Избыток молочной кислоты приводит также к нарушению рубцового пищеварения: снижается моторика рубца и других преджелудков, развивается руминаторный стаз [6, 7]. При повышенной кислотности содержимого рубца подавляется жизнедеятельность полезной микробиоты, в частности, целлюлолитических бактерий [6], обеспечивающих гидролиз клетчатки растительных кормов и способствующих ее усвоению. Сле-

дует отметить, что эволюционно сложившийся процесс пищеварения коров направлен на переваривание большого количества грубых волокон, основу которых составляет именно клетчатка, так как благодаря ей поддерживается жевание жвачки и выделение слюны, необходимой для нормального функционирования рубца [7]. Снижение переваримости кормов, вызванное уменьшением численности бактерий с целлюлолитической активностью, приводит к низкой молочной продуктивности коров и ухудшению качества молока.

В настоящее время для лечения и профилактики ацидотических состояний помимо оптимизации рационов применяют раскислители (питьевая сода, оксид магния, доломитовая мука), буферные смеси, ферментные препараты («Протосубтилин», «Амилосубтилин») и пробиотические средства [8]. Однако использование раскислителей не всегда эффективно и часто оказывает негативное влияние на состояние слизистой рубца и развитие рубцовой микрофлоры, применение буферных смесей повышает pH лишь незначительно (до 0,2 ед.), а введение ферментных препаратов во многом ограничено тем, что микроорганизмы рубца активно их разрушают [8].

Наиболее целесообразным для профилактики ацидозных состояний является использование пробиотических препаратов на основе специально подобранных культур микроорганизмов, обеспечивающих нормализацию pH рубца, повышение переваримости сырой клетчатки и, как следствие, увеличение суточной продуктивности животных и улучшение качества молока. В качестве основы пробиотиков выступают микроорганизмы различных систематических групп. Так, широко известны препараты на основе живых культур дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: «БиоСпринт» (Biochem, Германия), «И-сак» (Alltech, США), «Левисел SC» (Lallemand Animal Nutrition, Канада) [9–12]. Дрожжи поглощают кислород, создавая анаэробные условия среды, оптимальные для развития целлюлолитической микробиоты, а также поддерживают уровень pH рубцовой жидкости.

Известны кормовые пробиотики «Пропиовит», «Целлобактерин» (Россия), «Румибакт» (Беларусь) [8, 13, 14], механизм действия которых основан на снижении концентрации молочной

кислоты в рубце за счет ее непосредственной утилизации пропионовокислыми бактериями, входящими в состав препаратов. Однако их использование в кормопроизводстве имеет ряд недостатков: они чувствительны к повышенным температурам и не способны обеспечить эффективную переваримость трудно-гидролизуемых кормов.

В связи с этим для профилактики ацидозов в настоящее время всё чаще находят применение пробиотические кормовые добавки на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, которые способны нормализовать микробиоту желудочно-кишечного тракта животных за счет контроля патогенных и условно-патогенных бактерий, характеризуются высокой ферментативной активностью и осуществляют гидролиз концентрированных кормов без образования молочной кислоты. К известным коммерческим препаратам вышеуказанного действия, успешно применяемым для контроля ацидотических состояний, относятся «БиоПлюс 2Б», «ГаллиПро», «Тойоцерин» (Германия), «Бацелл-М», «Олин» (Россия) [15–17]. В Республике Беларусь кормовые добавки на основе бактерий рода *Bacillus* для профилактики и лечения ацидозов не разработаны, а закупка зарубежных аналогов требует значительных финансовых средств, что инициирует исследования, направленные на получение высокоактивных штаммов бактерий рода *Bacillus* в качестве основы отечественного биопрепарата для нормализации рубцового пищеварения крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Объектами исследования служили изоляты и коллекционные (референтные) штаммы спорообразующих бактерий, входящие в состав кормовой добавки «Споро-бакт», обладающие ферментативной и антагонистической активностью.

В качестве тест-объектов использовали условно-патогенные бактерии *Escherichia coli* A-39 и *Staphylococcus aureus* B-107.

Изоляты спорообразующих бактерий выделяли из содержимого рубцов диких животных (олень, косули, лося), крупного рогатого скота, подстилки животноводческих комплексов. Для этого навески образцов ресуспендировали в физиологическом растворе и готовили серию разведений (10^3 – 10^6). Для выделения бацилл пробирики с разведениями прогревали в течение 10 мин при 80 °C

на водяной бане, после чего по 0,1 мл суспензии каждого разведения высевали на чашки с мясопептонным агаром. Чашки инкубировали при 30 °С в течение 24 ч.

Глубинное культивирование спорообразующих бактерий осуществляли на модифицированной среде Мейнелла в колбах на качалке (30 °С, 180–200 об/мин).

Предварительную оценку ферментативной активности изолятов проводили чашечным методом на агаризованных питательных средах со специфическими субстратами (картофельный крахмал – для определения α -амилазной активности, β -глюкан ячменя – β -глюканазной активности, Na-КМЦ – целлюлолитической активности, казеинат кальция – протеолитической активности). Об уровне продукции ферментов судили по окончании инкубирования (72 ч при 30 °С) по появлению зон гидролиза вокруг выросших колоний. Для визуализации результатов использовали красители конго красный (эндо-1,4- β -глюканазная и КМЦ-азная активность) и раствор Люголя (α -амилазная активность). Активность ферментов оценивали по соотношению диаметра зон гидролиза к диаметру колонии [18, 19].

Количественно продукцию гидролитических ферментов (α -амилазы, эндо-1,4- β -глюканазы и эндо-1,4- β -ксилазы) определяли фотометрически с использованием хромогенных субстратов. За единицу активности (U/ml) в обоих случаях принимали количество фермента, катализирующего гидролиз субстрата с образованием 1 мкмоль окрашенных низкомолекулярных фрагментов в условиях опыта за 1 мин [20].

Бактериальные изоляты, обладающие комплексной ферментативной активностью, проверяли методом лунок на способность подавлять рост условно-патогенных микроорганизмов [21].

Идентификацию наиболее активных бактериальных изолятов осуществляли по схеме, приведенной в руководствах [22–24]. Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки исследовали общепринятыми методами [23, 24].

Таксономическое положение выделенных бактерий устанавливали по Берджи, а также посредством анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с использованием универсальных эубактериальных праймеров 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3')

и 1492r (5'-ggttaccttggttacgactt-3'). Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК отобранных изолятов выполнен в лаборатории «Коллекция микроорганизмов» Института микробиологии НАН Беларуси.

Исследование токсичности, безвредности и аллергенности бактерий проводили сотрудники УО «Гродненский государственный аграрный университет». Для определения безвредности культуру бактерий вводили орально белым крысам массой 180–220 г в дозе 3 мл и проводили наблюдения в течение 14 дн. на предмет выявления гибели особей, отклонения в их поведении, двигательной активности, а также в поедаемости корма и состоянии шерстного покрова. Для определения токсикогенности культуру бактерий вводили в область стопы задней правой лапки в дозе 0,05 мл, в качестве контроля использовали стерильную питательную среду, которую вводили в область стопы задней левой лапки. Наблюдение проводили в течение 5 сут. Наличие токсичных свойств устанавливали путем введения штамма внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл с последующим наблюдением в течение 14 дн. Для определения аллергенности штамм вводили внутрикожно в дозе 0,05 мл в течение 3 сут, обследуя место инъекции на наличие аллергических отеков или некроза тканей.

Полученные данные статистически обработаны с помощью программы Microsoft Excel. При статистической обработке результатов экспериментов проводили определение средних арифметических и их доверительных интервалов для уровня вероятности 95 %.

Результаты и обсуждение. Из рубцов крупного рогатого скота, диких животных и подстилки животноводческих комплексов было выделено порядка 200 изолятов. При оценке их ферментативной активности чашечным методом на агаризованных средах со специфическими субстратами установлено, что 71 % полученных изолятов способны продуцировать комплекс амилаз, целлюлаз и протеаз. Из них на первом этапе скрининга отобрано 20 наиболее активных изолятов (табл. 1), в том числе: изоляты 7л, 2к и 8о, характеризующиеся наибольшей протеолитической; изоляты 3-1, 7л, 45 – КМЦ-азной; изоляты 7л, 4-2 и 36 – β -глюканазной; изоляты 7л, 45 и 19 – α -амилазной активностью.

Т а б л и ц а 1. Ферментативная активность отобранных изолятов

Изолят	Протеолитическая активность	α -амилазная активность	β -глюканазная активность	КМЦ-азная активность
15	2,1	2,8	5,0	4,0
19	3,4	4,2	5,3	4,0
21	1,9	1,7	5,0	5,0
29	2,9	1,6	4,5	4,0
35	2,1	3,3	5,5	4,3
36	3,0	3,0	6,3	4,0
38	1,1	2,6	4,8	3,8
40	4,4	3,3	4,2	4,3
45	4,5	3,9	4,6	6,5
2-1	1,7	3,7	4,0	3,2
4-1	2,7	3,8	4,3	4,0
4-2	5,2	3,7	7,0	4,9
1л	4,6	3,1	3,0	3,6
4л	5,0	2,9	4,0	4,5
7л	5,4	4,8	6,4	5,7
1кс	3,4	3,8	2,4	3,2
1о	3,8	3,6	2,8	4,4
4о	3,8	3,0	4,2	4,3
8о	4,8	3,4	4,2	4,3
2к	5,3	3,7	3,9	4,2

П р и м е ч а н и е. Интенсивность синтеза ферментов тестировали чашечным методом по величине отношения диаметра зоны гидролиза (просветления) субстратов к диаметру колонии.

Для количественной оценки ферментативной активности (эндо-1,4- β -ксилазной, эндо-1,4- β -глюканазной и α -амилазной) использовали двухсуточные культуры выделенных бактерий и производственного штамма *Bacillus subtilis* БИМ В-713 Д с высокой гидролазной активностью, входящего в состав кормовой добавки «Споробакт» (контроль), выращенные в колбах на качалке.

Установлено, что у изолятов 7л, 4-2 и 45 продукция эндо-1,4- β -ксилазы превышала соответствующий показатель референтного штамма на 43,8 % (3,48 ед./мл), 24 % (3,00 ед./мл) и 21,1 % (2,93 ед./мл) соответственно, а значение эндо-1,4- β -

глюканазной активности изолятов 45 и 7л было выше более чем в два раза (1,37 и 1,09 ед./мл).

Изоляты 2к и 8о проявляли наиболее высокую α -амилазную активность (0,76 и 0,72 ед./мл), сопоставимую с активностью референтной культуры (0,72 ед./мл).

При оценке антагонистической активности отобранных изолятов в качестве референтного штамма использовали производственный штамм *B. subtilis* БИМ В-497 Д с высоким антимикробным действием, входящий в состав кормовой добавки «Споробакт» (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Антагонистическая активность отобранных изолятов

Изолят	Антагонистическая активность, мм	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
15	27 ^н ± 0,3	34 ^н ± 0,4
19	23 ^н ± 0,5	25 ^н ± 0,4
21	19 ^н ± 0,3	30 ^н ± 0,3
29	16 ^н ± 0,6	18 ^н ± 0,5
35	23 ^н ± 0,5	21 ^н ± 0,6
36	20 ^н ± 0,4	22 ^н ± 0,5
38	17 ^н ± 0,4	29 ^н ± 0,4
40	21 ^н ± 0,6	26 ^н ± 0,3
45	26 ^н ± 0,3	22 ^н ± 0,4
2-1	25 ^н ± 0,4	30 ^н ± 0,5
4-1	21 ^н ± 0,6	29 ^н ± 0,5
4-2	24 ^н ± 0,5	20 ^н ± 0,6
1л	25 ^н ± 0,4	19 ^н ± 0,4
4л	19 ^н ± 0,3	20 ^н ± 0,5
7л	29 ^н ± 0,3	22 ^н ± 0,4
1кс	22 ^н ± 0,6	22 ^н ± 0,5
1о	26 ^н ± 0,4	23 ^н ± 0,3
4о	27 ^н ± 0,5	14 ^н ± 0,4
8о	22 ^н ± 0,4	20 ^н ± 0,5
2к	30 ^н ± 0,5	22 ^н ± 0,3
<i>B. subtilis</i> БИМ В-497 Д	29 ^н ± 0,3	20 ^н ± 0,4

П р и м е ч а н и е. Обозначения: ^н – диаметр зон нарастания антагониста на газон патогена; ^л – диаметр зон лизиса тест-объекта.

Установлено, что из 20 исследованных культур 16 образуют зоны лизиса на газоне *E. coli*, однако по уровню антимикробной активности только изолят 2к превосходит референтный штамм *B. subtilis* БИМ В-497 Д, а изоляты 7л, 4о, 1о сопоставимы с ним. Наиболее активное подавление роста условно-патогенных бактерий *S. aureus* отмечено под действием изолятов 45, 36, 35, 4л и 4-2, причем по диаметру зон ингибирования выделенные культуры не уступали референтному штамму. Наиболее высокой антагонистической активностью в отношении *E. coli* характеризуются референтный штамм *B. subtilis* БИМ В-497 Д и изоляты 2к и 7л, в отношении *S. aureus* – *B. subtilis* БИМ В-497 Д и изоляты 45 и 36.

Поскольку в задачи исследования входил отбор штаммов с комплексной целлюлолитической и антимикробной активностью, наибольший интерес для дальнейшей работы представляли изоляты 7л, 45, 4-2, 2к, 8о, сочетающие эти два показателя (табл. 3). С целью идентификации отобранных бактерий изучены их морфологические, физиолого-биохимические свойства и генетические особенности. Установлено, что выделенные штаммы бактерий представляют собой подвижные грамположительные палочки. Клетки на ранней стадии роста культуры находятся в цепочках, после созревания расположены преимущественно одиночно

Т а б л и ц а 3. Сравнительная характеристика ферментативной и антагонистической активности отобранных изолятов и коллекционных штаммов

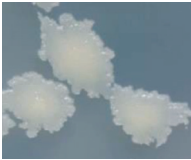
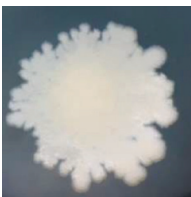
Изолят, штамм	Ферментативная активность, ед./мл			Антагонистическая активность, мм	
	эндо-1,4-β-ксилаза	эндо-1,4-β-глюканаза	α-амилаза	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
7л	3,48	1,09	0,47	29 ^л ± 0,3	22 ^н ± 0,4
45	2,93	1,37	0,50	26 ^л ± 0,3	22 ^л ± 0,4
4-2	3,00	0,89	0,58	24 ^л ± 0,5	20 ^л ± 0,6
2к	2,08	0,50	0,76	30 ^л ± 0,5	22 ^н ± 0,3
8о	2,21	0,68	0,72	22 ^л ± 0,4	20 ^н ± 0,5
<i>B. subtilis</i> БИМ В-713 Д	2,42	0,49	0,72	22 ^н ± 0,4	20 ^л ± 0,3
<i>B. subtilis</i> БИМ В-497 Д	1,80	0,40	0,41	29 ^л ± 0,3	20 ^л ± 0,4

П р и м е ч а н и е. Обозначения: ^н – диаметр зон нарастания антагониста на тест-объект; ^л – диаметр зон лизиса тест-объекта.

или попарно. Споры эллипсовидные, занимают центральное или терминальное положение. Морфология колоний при культивировании на мясопептонном агаре приведена в табл. 4.

Исследованные изоляты являются аэробами или факультативными анаэробами с преимущественно окислительным или

Т а б л и ц а 4. **Морфология колоний отобранных изолятов**

Изолят	Описание колоний*	Фото
7л	Беловатые плотные колонии неправильной формы с волнистым краем; поверхность гладкая, непрозрачная, матовая; профиль плоский	
4-2	Беловатые слизистые колонии округлой формы с ровным краем; поверхность гладкая, непрозрачная, матовая; профиль выпуклый	
45	Беловатые сухие плотные колонии округлой формы с лопастным краем; поверхность шероховатая, непрозрачная, матовая; профиль плоский	
8о	Беловатые округлые колонии с зубчатым краем; поверхность шероховатая, непрозрачная; профиль кратерообразный	
2к	Прозрачные округлые колонии с ровным краем; поверхность гладкая, матовая; профиль плоский	

* Согласно практическому руководству «Микробиология: культивирование и рост бактерий» (И. И. Концевая).

бродильным типом метаболизма. Они способны расти в широких пределах температуры и pH и синтезировать ферменты класса оксидоредуктаз (в частности, каталазу) и гидролаз (утилизируют казеин, мочевины). Все, кроме изолята 2к, гидролизуют желатин. Изучаемые изоляты используют в качестве источников углерода цитрат (кроме 4-2), глюкозу, маннозу, мальтозу, арабинозу, галактозу, сорбит.

В соответствии с морфологическими, культуральными и физиолого-биохимическими свойствами выделенные бактерии отнесены к роду *Bacillus*. В результате анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК исследуемых изолятов они были идентифицированы как *Bacillus amyloliquefaciens*.

Согласно результатам ветеринарно-токсикологических исследований, штаммы *B. amyloliquefaciens* 45, *B. amyloliquefaciens* 4-2, *B. amyloliquefaciens* 2к, *B. amyloliquefaciens* 7л и *B. amyloliquefaciens* 8о являются непатогенными и безвредными для лабораторных животных, не обладают токсичностью, токсигенностью и аллергенностью, что в совокупности с выраженными пробиотическими свойствами позволяет сделать вывод об их перспективности для использования в качестве основы кормовых добавок.

Заключение. По результатам скрининга из 200 культур спорообразующих бактерий, выделенных из образцов подстилки и рубцов сельскохозяйственных и диких животных, отобрано пять изолятов (7л, 45, 4-2, 2к, 8о), характеризующихся комплексной ферментативной активностью и способностью подавлять *in vitro* рост основных представителей патогенной и условно-патогенной микробиоты крупного рогатого скота. Исследуемые изоляты идентифицированы как *B. amyloliquefaciens*, установлена их безвредность для лабораторных животных. Показан высокий уровень продукции целлюлазы, амилазы и ксиланазы отобранными штаммами, свидетельствующий о перспективности их использования в качестве основы кормовых добавок, обеспечивающих эффективную переваримость трудногидролизуемых кормов и нормализацию рубцового пищеварения крупного рогатого скота.

Литература

1. В Беларуси растет валовое производство молока [Электронный ресурс] // Беларусь сегодня. – Режим доступа: <https://www.sb.by/articles/v-belarusi-rastet-valovoe-proizvodstvo-moloka.html>. – Дата доступа: 08.05.2020.
2. Безопасное кормление. Раскисляем рацион коровы [Электронный ресурс] // Белорус. сел. хоз-во. – Режим доступа: <http://agriculture.by/articles/zhivotnovodstvo/bezopasnoe-kormlenie-raskisljaem-racion-korovy>. – Дата доступа: 08.05.2020.
3. Анализ причин выбытия и решение проблемы сохранности высокопродуктивных коров / С. Л. Борознов [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : науч.-практ. журн. – 2006. – Т. 42, № 1. – С. 142–144.
4. Евглевский, А. А. Состояние и проблемы обеспечения здоровья коров в молочном животноводстве и практические подходы их решения / А. А. Евглевский, С. Н. Турнаев // Вестн. Рос. акад. с.-х. наук. – 2012. – № 9. – С. 67–69.
5. Мищенко, В. А. Проблема сохранности высокопродуктивных коров / В. А. Мищенко, Н. А. Яременко // Ветеринар. патология. – 2005. – № 3. – С. 95–99.
6. Петрова, О. Г. Причины болезней высокопродуктивных коров / О. Г. Петрова, М. И. Барашкин // Аграр. вестн. Урала. – 2013. – № 1 (107). – С. 28–30.
7. Михайлова, И. И. Профилактика метаболического ацидоза у коров при силосно-концентратном типе кормления / И. И. Михайлова, А. А. Евглевский // Рос. ветеринар. журн. – 2017. – № 4. – С. 5–7.
8. Сехин, А. А. Производственные испытания кормовой добавки «Румибакт» в условиях СПК им. Деньщикова Гродненского района / А. А. Сехин, А. Н. Михалюк // Современные технологии сельскохозяйственного производства : материалы XX Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 2019 г. / Гродн. гос. аграр. ун-т ; редкол.: В. В. Пешко [и др.]. – Гродно, 2019. – С. 174–178.
9. Живые дрожжи БиоСпринт и защищенный азот НитроШур в рационах высокопродуктивных коров [Электронный ресурс] // The Dairy News: новости молочного рынка каждый день. – Режим доступа: <https://www.dairynews.ru/news/zhivye-drozhzhi-biosprint-i-zashchishchenny-azot.html>. – Дата доступа: 08.05.2020.
10. Морозков, Н. А. Эффективность использования дрожжевой пробиотической добавки Левисел SC Плюс в кормлении дойных коров / Н. А. Морозков, С. В. Третьяков // Изв. Оренбург. гос. аграр. ун-та. – 2015. – № 5. – С. 130–132.
11. Гуляева, М. Е. Влияние скармливания протеиновой добавки И-Сак 1026 на пищеварительный статус и поведенческие реакции коров / М. Е. Гуляева, Л. В. Смирнова // Молочнохозяйств. вестн. – 2012. – № 1. – С. 16–20.
12. Ли, В. Препарат И-Сак 1026 – залог здоровья и продуктивности коров / В. Ли // Животноводство России. – 2011. – № 4. – С. 42–48.
13. Способ получения бактериального препарата «Пропиовит» : пат. СССР 1469613: МПК А61К 35/66 (2006), А23С 9/13 (2006) / Н. Т. Волкова, А. В. Платонов, В. В. Микалевич. – Оpubл. 30.10.1993.

14. Кислюк, С. М. Ферментативный пробиотик Целлобактерин – ответ на многие вопросы / С. М. Кислюк, Н. И. Новикова // Аграр. эксперт. – 2008. – № 1. – С. 26–27.

15. Оноприенко, Н. А. Влияние пробиотического препарата «Бацелл-М» на молочную продуктивность / Н. А. Оноприенко, В. В. Оноприенко // Сб. науч. тр. Краснодар. науч. центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2016. – № 5. – С. 95–100.

16. Пробиотик OLIN для КРС [Электронный ресурс] // ProBiotic. – Режим доступа: <http://probiotic-plus.ru/product/probiotik-olin-dlya-krv-400g>. – Дата доступа: 08.05.2020.

17. Способ производства пробиотического препарата на основе спорообразующих штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* : пат. RU 2432393, МПК C12N 1/20 (2006), A23K 1/165 (2006), C12R 1/07 (2006) / А. А. Иваненко. – Оubl. 27.10.2011.

18. Смирнов, В. В. Споровые аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В. В. Смирнов. – Киев : Наук. думка, 1983. – С. 103–109.

19. ОФС.1.7.2.0012.15. Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков [Электронный ресурс] // Фармакоп.рф. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0012-15-proizvodstvennye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov>. – Дата доступа: 08.05.2020.

20. Endo-Cellulase assay procedure [Electronic resource] // Megazyme.com. – Mode of access: <https://www.megazyme.com/endo-cellulase-assay-kit>. – Date of access: 08.05.2020.

21. Егоров, Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н. С. Егоров. – М. : Высш. шк., 1965. – С. 38–42.

22. Bergey's manual of systematic bacteriology / S. T. Williams [et al.]. – Baltimore : Williams and Wilkins, 1989. – Vol. 4. – 2545 p.

23. Методы общей бактериологии : в 3 т. / под ред. Ф. Герхарда. – М. : Мир, 1984. – Т. 3.

24. Егоров, Н. С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Н. С. Егоров. – М. : МГУ, 1983. – 128 с.

SCREENING OF SPORULATING BACTERIA AS THE BASIS OF BIOPREPARATION TO NORMALIZE RUMEN DIGESTION IN CATTLE

K. V. KANTOR¹, N. V. NAKHAEVA¹, T. V. RAMANOUSKAYA¹,
N. V. SVERCHKOVA¹, A. N. MIKHALYUK², E. I. KALAMIYETS¹

¹Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
microbio@mbio.bas-net.by

²Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus, alex-vet@mail.ru

About 200 cultures of sporulating bacteria of genus *Bacillus* were isolated from cattle rumens, stomachs of wild animals and farm litter. Microbial enzymatic

activities were assayed and antagonistic action toward opportunistic species of gut microbiota was evaluated. The conducted screening allowed to select and identify strains characterized by the maximal enzymatic and antagonistic activities to be further used as the basis of probiotic feed additive normalizing rumen digestion in cattle.

Поступила в редакцию 21.05.2020

УДК 579.22

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТЕРМОФИЛЬНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

*Е. И. ЛАДУТЬКО, Д. Е. ГУЛЯЕВА, С. И. ЛЕОНОВИЧ,
А. В. СИДОРЕНКО*

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
collection@mbio.bas-net.by*

Из природных источников выделено 9 культур термофильных спорообразующих бактерий, идентифицированных как *Aeribacillus pallidus*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus thermodenitrificans*. Охарактеризованы морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства выделенных бактерий. Показано, что большинство из них развиваются при температуре 70–90 °С, относятся к экстремальным термофилам, растут в широком диапазоне солёности среды.

Введение. В последнее время изучению термофильных бактерий уделяется большое внимание. Данные прокариотические организмы могут обитать в различных биотопах и утилизировать широкий спектр субстратов: растительные углеводы, алифатические и ароматические углеводороды, пептиды и жиры животного происхождения [1]. Спорообразующие термофильные бактерии привлекательны для биотехнологии как источники термостабильных ферментов (липаз, гликозидгидролаз, нитрилаз, трансаминаз, N-ацилгомосеринлактоназ, полимераз, протеаз) [2], продуктов деградации лигноцеллюлозы [3], а также как деструк-