

РАЗРАБОТКА БИОКОМПОЗИЦИИ КАК КОМПОНЕНТА БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МИКРОЭКОЛОГИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ПРОДУКТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦЫ

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Дежаткина Светлана Васильева, доктор биологических наук, профессор кафедры «Морфология, физиология и патология животных»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, дом 1: тел.: 89603621517

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Bacillus coagulans*, *Weizmannia coagulans*, биокомпозиция, экспрессия, гены, лактат-пермеаза (*lutP*), коагулин (*CoaD*.)

В статье представлены результаты исследований по разработке бактериальной биокомпозиции для коррекции микроэкологии желудочно-кишечного тракта продуктивных животных и птицы векторного действия. В работе были использованы референс-штаммы *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*) из коллекции ФГБУ «ГосНИИгенетика» и полевые штаммы, выделенные из проб почвы.

В системе NCBI были определены структурные нуклеотидные последовательности генов лактат-пермеазы (*lutP*) – выработка L(+) молочной кислоты (левоповорачивающийся изомер) – и коагулина (*CoaD*) – бактериостатическое и/или бактерицидное действие в отношении бактерий родов *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Listeria*, *Pediococcus* и т.п. Был проведен анализ структуры данных генов (BLAST nucleotide и PRIMER BLAST), разработаны системы детекции гена лактат-пермеазы (праймеры: forward GCGTGCCGAACAAAA-CATTG, reverse ATCAACGGCGCACACACC) и гена коагулина (праймеры: forward AATTATCCGGGGCTTACGGG, reverse ATGCTTTATGCACAACCGGC), оптимизированы условия ПЦР- RT, проведен анализ уровня РНК относительно ДНК. Анализ экспрессии генов сопровождался нормализацией реакции. Полученные данные позволяют сформировать пробиотическую биокомпозицию из бактерий *Bacillus coagulans* с прогнозируемым эффектом, так как экспериментально установлено, что кандидатные бактерии характеризуются высокими показателями экспрессии гена лактат-пермеазы (*lutP*) – это штаммы *Bacillus coagulans* B.co.24, *Bacillus coagulans* B.co.80 и *Bacillus coagulans* B.co.48. и гена коагулина (*CoaD*) – это штаммы *Bacillus coagulans* B.co.20, *Bacillus coagulans* B.co.80 и *Bacillus coagulans* B.co.64 и *Bacillus coagulans* B.co.96. Векторное действие разрабатываемого биопрепарата подтверждается высокой степенью экспрессии кандидатными бактериальными штаммами генов, кодирующих производство активных метаболитов лактат-пермеазы (*lutP*) и коагулина (*CoaD*), что позволяет сформировать биопрепарат из штаммов B.co.24, B.co.48, B.co.80, B.co.96.

Введение

Ветеринарная наука находится в состоянии постоянного поиска оптимальной стратегии и тактики борьбы за поддержание здоровья продуктивных животных, за обеспечение продовольственной безопасности и получение экологически чистой и качественной продукции животноводства [1]. Поэтому в настоящее время актуальным остается применение научно обоснованной системы повышения ветеринарного благополучия продуктивных животных с помощью физиологических методов коррекции микроэкологии животных, как пробиотики [2]. По литературным данным естественная защитная система желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных кроме иммунной системы, эпителия кишечника и слизистого барьера представлена также микрофлорой кишечника, обуславливающей барьерный эффект. «Заселение» пищеварительного тракта микроорганизмами, экспресси-

рующими гены бактериоцинов приводит к формированию биоценоза, обеспечивающего колонизационную резистентность макроорганизма к возбудителям кишечных инфекций. В настоящее время колонизационная резистентность является фактором неспецифической защиты [3]. Ключевой особенностью *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans* таксономическая номенклатура вида *Bacillus coagulans* до 7-го издания Bergey's) является способность вырабатывать l-лактат посредством гомоферментативного метаболизма. Автономное присутствие предполагаемого гена, кодирующего лактат-пермеазу (*lutP*), и гена, кодирующего его регулятор (*lutR*) у продуцентов L-лактата, доказано некоторыми исследователями [4-6], отмечена их ключевая функция в производстве лактата. *Bacillus coagulans* способна ферментативно гидролизовать целлюлозу с образованием целлобиозы и глюкозы [7-9]. Однако, согласно некоторым

авторам не все штаммы способны фенотипически проявлять данное свойство [10]. *Bacillus coagulans* является активным продуцентом бактериоцинов [11-13]. Наиболее широко представленным из них является коагулин. Данный бактериоцин (*Coa A,B,C,D*) имеет аминокислотную последовательность, аналогичную описанной для педиоцинов, продуцируемых различными штаммами *Pediococcus acidilactici*, отличающаяся только одной аминокислотой на их С-конце [11]. Согласно некоторым исследователям [14] он обладает активностью в отношении бактерий родов *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Listeria* и *Pediococcus*.

При разработке бактериальной биокомпозиции для коррекции микроэкологии ЖКТ продуктивных животных и птицы одной из задач был анализ экспрессии генов бактериоцинов (лактат-пермеазы и коагулина) у кандидатных штаммов *Bacillus coagulans*.

Материалы и методы исследований

Для подбора и оптимизации праймеров, специфичных в отношении изучаемых бактерий, были использованы ресурсы NCBI: BLAST nucleotide и PRIMER BLAST. Выделение нуклеиновых кислот бактерий проводили при помощи набора РеалБест УниМаг («Вектор Бест», РФ). Для очистки РНК от фрагментов ДНК использовали ДНКазу («Синтол», РФ), для получения очищенной ДНК от РНК применяли РНКазу («Синтол», РФ). Все исследования проводили согласно инструкции производителей. В данных исследованиях нормализация РНК, определяющих уровень экспрессии, была проведена на ДНК исследуемых генов. В работе были использованы референс-штаммы из коллекции Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика» Минобрнауки России: *Bacillus coagulans* В-6668, В-2270, В-10268, В-10468, В-3042, В-4521 В-10473, В.со. - 264, и полевые штаммы, выделенные авторами из проб почвы при выполнении научных исследований при поддержке Программы развития Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова (Приоритет-2030)»: В.со.44, В.со.88, В.со.12, В.со.13, В.со.14, В.со.16, В.со.20, В.со.24, В.со.80, В.со.64, В.со.48, В.со.96, В.со.84. Бактерии культивировали на МПБ и LB-бульоне («Диаэм», РФ) в течение 24 часов при 35°C, количественную

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain CGD018 chromosome	Weizmannia coagulans	3092	3092	100%	0.0	100.00%	3037825	CP015174.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain 150 chromosome complete genome	Weizmannia coagulans	3092	3092	100%	0.0	100.00%	3367025	CP107276.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus coagulans DSM 1 = ATCC 7050 complete genome	Weizmannia coagulans DSM 1 = ATCC 7050	3092	3092	100%	0.0	100.00%	3366965	CP009709.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain FDAOARGOS_1160 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	3092	3092	100%	0.0	100.00%	3342828	CP086054.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain 19-1-JSR1_34-1 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	3059	3059	100%	0.0	99.64%	3065541	CP014488.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain CACC_834 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	3059	3059	100%	0.0	99.64%	3077319	CP076587.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus coagulans 2-6 complete genome Weizmannia coagulans 2-6	Weizmannia coagulans 2-6	3037	3037	100%	0.0	99.40%	3073079	CP028472.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain TM3 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2815	2815	100%	0.0	97.01%	3113653	CP011311.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain JBY26.3 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2748	2748	100%	0.0	96.30%	3506359	CP104390.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain DSM 2314 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3628651	CP033887.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain IDCC1201 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3642415	CP035305.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus coagulans LA204 complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3642571	CP025437.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain R11 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3602752	CP026649.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain LBSC chromosome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3635602	CP022701.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain BC-HY1 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3596077	CP017888.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus coagulans strain S-lac complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3694837	CP011938.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus coagulans strain HM-08 complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3624641	CP010525.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain VHEubi C08 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3666784	CP080329.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain BC21 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3564910	CP064767.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus coagulans 3601 complete genome Weizmannia coagulans 3601	Weizmannia coagulans 3601	2737	2737	100%	0.0	96.18%	3552226	CP003056.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weizmannia coagulans strain ASRS217 chromosome complete genome Weizmannia coagulans	Weizmannia coagulans	2732	2732	100%	0.0	96.12%	3514330	CP058594.1

Рис. 1 - Анализ специфичности гена лактат-пермеазы (*lutP*) для *Bacillus coagulans*

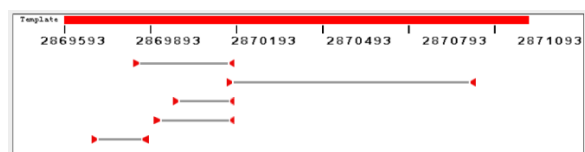


Рис. 2 - Специфичные системы олигонуклеотидов для гена лактат-пермеазы (*lutP*)

оценку концентрации бактерий в одном миллилитре среды проводили при использовании спектрофотометра Eppendorf BioSpectrometer kinetic («Eppendorf», Германия). Оценка количества бактерий проводилась согласно протоколу прибора. Для изучения экспрессии целевых участков гена был использован «Набор реагентов для проведения ПЦР совмещенной с реакцией обратной транскрипции (ПЦР-ОТ) («Синтол», РФ).

Результаты исследований

В системе NCBI был проведен анализ специфичности гена лактат-пермеазы (*lutP*). По данным BLAST доказана уникальность его нуклеотидной последовательности (рис. 1) для *Bacillus coagulans*. С использованием ресурсов Primer-BLAST были определены оптимальные праймеры и зонды для проведения ПЦР (рис. 2-3). Исходя из задач исследований по определению экспрессии гена лактат-пермеазы (*lutP*) для предварительной реакции обратной транскрипции, нами было принято решение использования гексамерных и декамерных рандомных праймеров в соотношении 3:1. Экстракция нуклеиновых кислот была проведена с использованием коммерческих наборов реагентов в соответствии с инструкцией производителя. Для определения РНК после экстракции нуклеиновых кислот 1 часть аликвоты проб была обработана ДНК-азой, для исключения в реакции ДНК; 2 часть аликвот была предварительно об-

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCGTGCCGAACAAAACATTG	Plus	20	2869842	2869861	59.50	50.00	3.00	
Reverse primer	ATCAACGGCGCACACACC	Minus	18	2870193	2870176	61.35	61.11	4.00	3.00
Internal oligo	GCGGAGCCCAATGCCAATG	Plus	20	2869942	2869961	59.91	65.00		0.00
Product length	352								

Products on intended targets

>CP107276.1 Weizmannia coagulans strain 150 chromosome, complete genome

product length =	352		
Forward primer	1	GCGTGCCGAACAAAACATTG	28
Template	2869870	2869889
Reverse primer	1	ATCAACGGCGCACACACC	18
Template	2870221	2870204

Рис. 3 - Система детекции гена лактат-пермеазы (*lutP*) для ПЦР- RT

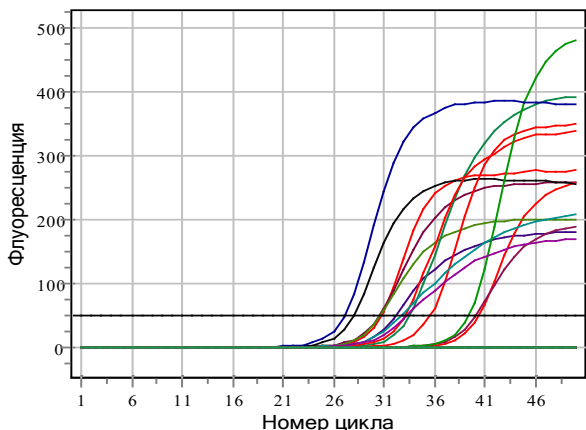


Рис. 4 - График амплификации РНК фрагмента гена лактат-пермеазы (*lutP*) после ОТ

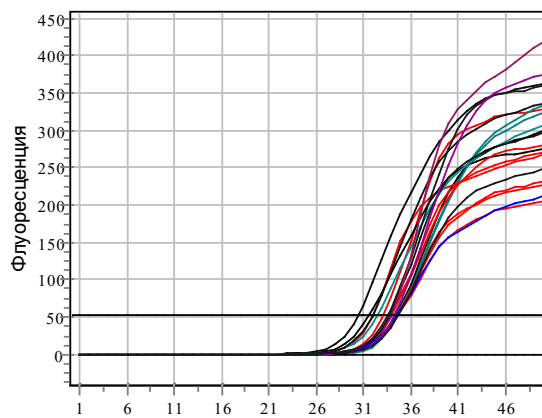


Рис. 5 - График амплификации ДНК фрагмента гена лактат-пермеазы (*lutP*)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E-value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓ Weizmannia coagulans strain CG2018 chromosome	Weizmannia coagulans	898	898	100%	0.0	100.00%	3037825	CP107276.1
✓ Weizmannia coagulans strain 150 chromosome, complete genome	Weizmannia coagulans	898	898	100%	0.0	100.00%	3307025	CP107276.1
✓ Bacillus coagulans DSM 1 - ATCC 7950, complete genome	Weizmannia coagulans DSM 1 - ATCC 7950	898	898	100%	0.0	100.00%	3389995	W009209.1
✓ Weizmannia coagulans strain F0AARGOS_1190 chromosome, complete genome	Weizmannia coagulans	898	898	100%	0.0	100.00%	3342828	CP08804.1
✓ Weizmannia coagulans strain X02 chromosome, complete genome	Weizmannia coagulans	887	887	100%	0.0	99.99%	3296021	CP110483.1
✓ Weizmannia coagulans strain TX0 chromosome, complete genome	Weizmannia coagulans	870	870	100%	0.0	99.97%	3113633	CP091131.1
✓ Bacillus coagulans 2.0, complete genome	Weizmannia coagulans 2.0	854	854	100%	0.0	98.95%	3073079	CP020272.1
✓ Weizmannia coagulans strain 19_LJSR_34.1 chromosome, complete genome	Weizmannia coagulans	826	826	100%	0.0	97.33%	3095441	CP091868.1
✓ Weizmannia coagulans strain ECC2201 chromosome, complete genome	Weizmannia coagulans	798	798	100%	0.0	96.30%	3094215	CP030305.1
✓ Weizmannia coagulans strain LBSC chromosome	Weizmannia coagulans	798	798	100%	0.0	96.30%	3039002	CP022701.1
✓ Bacillus coagulans strain S-lac, complete genome	Weizmannia coagulans	798	798	100%	0.0	96.30%	3094837	CP110939.1
✓ Weizmannia sp. W001 chromosome, complete genome	Weizmannia sp. W001	798	798	100%	0.0	96.30%	3099995	CP106618.1
✓ Bacillus coagulans strain HM.08, complete genome	Weizmannia coagulans	798	798	100%	0.0	96.30%	3024541	CP106025.1
✓ Weizmannia coagulans strain V0ProB_C08 chromosome, complete genome	Weizmannia coagulans	798	798	100%	0.0	96.30%	3095744	CP106025.1
✓ Weizmannia coagulans strain RT1 chromosome, complete genome	Weizmannia coagulans	797	797	100%	0.0	96.30%	3002732	CP106049.1
✓ Weizmannia coagulans strain DSM 2114 chromosome, complete genome	Weizmannia coagulans	793	793	100%	0.0	96.09%	3028651	CP030687.1

Рис. 6 - Анализ специфичности гена коагулина (*CoaD*) для *Bacillus coagulans*



Рис. 7 - Специфичные системы олигонуклеотидов для гена коагулина (*CoaD*)

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AATTATCCGGGCTTACGGG	Plus	20	36169	36188	59.60	55.00	4.00	0.00
Reverse primer	ATGCTTTATGCACACCCGGC	Minus	20	36374	36355	59.83	50.00	6.00	2.00
Internal oligo	TGCAGCTGACGTCATGAAACCG	Plus	22	36213	36234	59.74	59.09		
Product length	206								

Products on intended targets
>CP107276.1 Weizmannia coagulans strain 150 chromosome, complete genome

product length =	206		
Forward primer	1	AATTATCCGGGCTTACGGG	20
Template	36167	36186
Reverse primer	1	ATGCTTTATGCACACCCGGC	20
Template	36372	36353

Рис. 8 - Система детекции гена коагулина (*CoaD*) для ПЦР-RT

работана РНК-азой для реакции нормализации. В результате проведенных исследований были получены результаты (рис. 4-5). В таблице 3 представлен анализ результатов экспрессии гена лактат-пермеазы (*lutP*).

В результате анализа полученных данных амплификации выявлена экспрессия гена лактат-пермеазы у штаммов *Bacillus coagulans* B-6668, B-2270, B-10468, B-4521, B-10473, B.co.264, B.co.44, B.co.13, B.co.16, B.co.24, B.co.80, B.co.48 с коэффициентом $1,01 \pm 0,13$.

В системе NCBI был проведен анализ специфичности гена коагулина (*CoaD*). По данным BLAST доказана уникальность его нуклеотидной последовательности (рис. 6) для *Bacillus coagulans*.

С использованием ресурсов Primer-BLAST были определены оптимальные праймеры и зонды для проведения ПЦР (рис. 7-8).

При решении задачи по определению экспрессии гена коагулина (*CoaD*) для предварительной реакции обратной транскрипции были использованы рандом-

Таблица 1

Расчеты коэффициента экспрессии гена лактат-пермеазы (при нормализации на ДНК этого же гена)

№	Наименование штамма	Ct РНК (после ОТ)	Ct ДНК	коэфф. экс-прес-сии
1	<i>Bacillus coagulans</i> B-6668	30,1	33,1	0,91
2	<i>Bacillus coagulans</i> B-2270	31,8	34,7	0,92
3	<i>Bacillus coagulans</i> B-10268		30,2	0,00
4	<i>Bacillus coagulans</i> B-10468	27,9	32,7	0,85
5	<i>Bacillus coagulans</i> B-3042		31,9	0,00
6	<i>Bacillus coagulans</i> B-4521	28,2	31,2	0,90
7	<i>Bacillus coagulans</i> B-10473	33,1	33,6	0,99
8	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.264	30,4	33,2	0,92
9	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.44	32,0	34,6	0,92
10	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.88		32,9	0,00
11	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.12		33,0	0,00
12	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.13	33,2	35,7	0,93
13	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.14		31,5	0,00
14	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.16	40,3	35,1	1,15
15	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.20		34,4	0,00
16	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.24	40,5	33,1	1,22
17	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.80	35,8	32,7	1,09
18	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.64		32,9	0,00
19	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.48	40,7	31,1	1,31
20	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.96		35,0	0,00
21	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.84		34,2	0,00

ные праймеры. Экстракция нуклеиновых кислот была проведена с использованием коммерческих наборов реагентов в соответствии с инструкцией производителя. Для определения РНК после экстракции нуклеиновых кислот 1 часть аликвоты проб была обработана ДНК-азой, для исключения в реакции ДНК; 2 часть аликвот была предварительно обработана РНК-азой для реакции нормализации. Результаты экспериментов представлены на рисунках 9-10. В таблице 2 представлен анализ результатов экспрессии гена коагулина (*CoaD*).

При проведении амплификации установлена экспрессия гена коагулина (*CoaD*) у штаммов *Bacillus coagulans* B-6668, B-2270, B-10268, B-10468, B.co.44, B.co.20, B.co.80, B.co.64, B.co.48, B.co.96, B.co.84 с коэффициентом $0,98 \pm 0,10$. В результате проведенных экспериментов по определению экспрессии генов активных метаболитов, кодирующих выработку молочной кислоты и синтез бактериоцина – коагулина, были определены штаммы *Bacillus coagulans*, являющиеся потенци-

Таблица 2

Расчеты коэффициента экспрессии гена коагулина (при нормализации на ДНК этого же гена)

№	Наименование штамма	Ct РНК (после ОТ)	Ct ДНК	коэфф. экс-прес-сии
1	<i>Bacillus coagulans</i> B-6668	25,9	32,6	0,79
2	<i>Bacillus coagulans</i> B-2270	31,2	33,0	0,95
3	<i>Bacillus coagulans</i> B-10268	31,8	33,2	0,96
4	<i>Bacillus coagulans</i> B-10468	26,9	32,3	0,83
5	<i>Bacillus coagulans</i> B-3042		33,6	0,00
6	<i>Bacillus coagulans</i> B-4521		33,1	0,00
7	<i>Bacillus coagulans</i> B-10473		29,9	0,00
8	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.264		32,9	0,00
9	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.44	27,9	32,1	0,87
10	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.88		29,9	0,00
11	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.12		32,5	0,00
12	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.13		32,5	0,00
13	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.14		31,9	0,00
14	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.16		32,2	0,00
15	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.20	33,9	33,3	1,02
16	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.24		25,6	0,00
17	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.80	25,4	22,2	1,14
18	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.64	26,4	25,0	1,06
19	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.48	30,7	32,7	0,94
20	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.96	32,8	26,4	1,24
21	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.84	26,1	27,6	0,95

альными кандидатами для разработки пробиотического биопрепарата. Определены штаммы с выявленной экспрессией 2-х генов (табл. 3).

Установлены штаммы бактерий с высоким показателем экспрессии гена лактат-пермеазы (продукция молочной кислоты) – это штаммы *Bacillus coagulans* B.co.24, *Bacillus coagulans* B.co.80 и *Bacillus coagulans* B.co.48. Выявлены штаммы бактерий с высоким показателем экспрессии гена коагулина (бактериоцин) – это штаммы *Bacillus coagulans* B.co.20, *Bacillus coagulans* B.co.80 и *Bacillus coagulans* B.co.64 и *Bacillus coagulans* B.co.96.

Обсуждение

В основе определения прогнозируемого

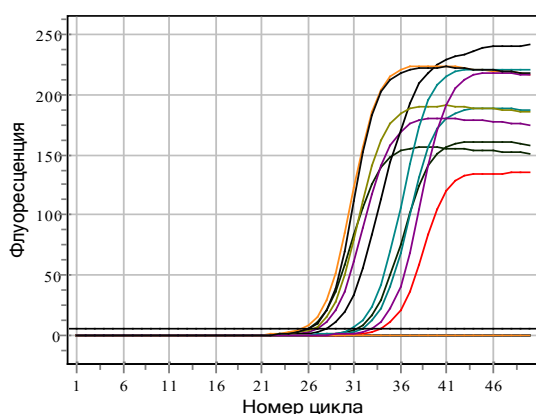


Рис. 9 - График амплификации РНК фрагмента гена коагулина (CoaD) после ОТ

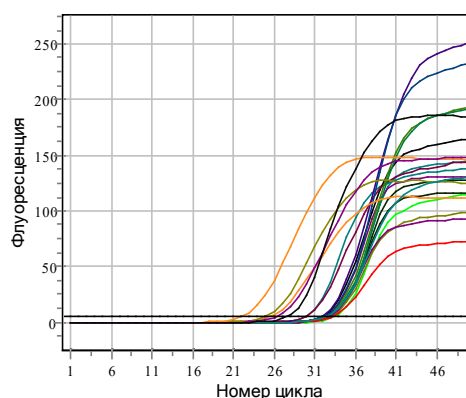


Рис. 10 - График амплификации ДНК фрагмента гена коагулина (CoaD)

Таблица 3

Бактерии *Bacillus coagulans*, с активной экспрессией генов лактат-пермеазы и коагулина

№	Наименование штамма	коэфф. экспрессии лактат-пермеазы	коэфф. экспрессии коагулина
1	<i>Bacillus coagulans</i> B-6668	0,91	0,79
2	<i>Bacillus coagulans</i> B-2270	0,92	0,95
3	<i>Bacillus coagulans</i> B-10268		0,96
4	<i>Bacillus coagulans</i> B-10468	0,85	0,83
5	<i>Bacillus coagulans</i> B-3042		
6	<i>Bacillus coagulans</i> B-4521	0,90	
7	<i>Bacillus coagulans</i> B-10473	0,99	
8	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.264	0,92	
9	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.44	0,92	0,87
10	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.88		
11	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.12		
12	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.13	0,93	
13	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.14		
14	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.16	1,15	
15	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.20		1,02
16	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.24	1,22	
17	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.80	1,09	1,14
18	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.64		1,06
19	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.48	1,31	0,94
20	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.96		1,24
21	<i>Bacillus coagulans</i> B.co.84		0,95

проявления пробиотических свойств бактерий рода *Bacillus* лежит применение молекулярно-генетического метода определения экспрессии генов изучаемых свойств при изменении условий их культивирования. Применение метода ПЦР по сравнению с классическими методами культивирования при определении метаболической бактериальной активности имеет преимущество по времени получения результатов, усиления сигнала экспрессируемых генов, огра-

ниченного периодом действия стимулятора (ростовых и т.п. факторов), временем наибольшей экспрессии генов активных метаболитов и составляет не более 4 часов. Основное значение в данном исследовании имеют мРНК исследуемых фрагментов бактериального генома бактерий, входящих в состав пробиотической композиции. Для установления уровня экспрессии в качестве нормирования было использовано определение ДНК указанных генов. На основании проведенных экспериментов были получены данные по оптимизации протоколов проведения молекулярно-генетических исследований генов активных метаболитов, кодирующих выработку молочной кислоты и синтез коагулина.

Полученные данные позволяют нам сформировать пробиотическую биокомпозицию из бактерий *Bacillus coagulans* с прогнозируемым эффектом, так как экспериментально установлено, что кандидатные бактерии продуцируют бактериоцины – вещества, повреждающие мембраны, нарушающие синтез белков и ДНК в патогенных бактериях. Кроме того, выделяют L(+) молочную кислоту (левовращающий изомер), которая в недиссоциированной (т.е. нейтральной) форме свободно проникает через мембраны и снижает внутриклеточное значение pH в патогенных бактериальных штаммах. Это, в свою очередь, ведет к нарушению метаболических процессов, таких как окислительное фосфорилирование, и к гибели патогенов.

Заключение

Разработана биокомпозиция для биопрепарата векторного действия для коррекции микробиологии желудочно-кишечного тракта продуктивных животных и птицы, эффективность которого теоретически подтверждается высокой степенью экспрессии кандидатными бактериальными штаммами B.co.24, B.co.48, B.co.80,

В.со.96 генов, кодирующих производство активных метаболитов лактат-пермеазы (*lutP*) и коагулина (*CoaD*).

Библиографический список

1. Оценка продовольственной безопасности России / И. Н. Сафиуллин, Б. Г. Зиганшин, Э. Ф. Амирова [и др.] // Вестник Казанского государственного аграрного университета. – 2021 – Т. 16 – № 2(62). – С. 124-132. – DOI 10.12737/2073-0462-2021-124-132. – EDN FKWBPM.

2. Молянова, Г. В. Воздействие препарата на основе *Bacillus subtilis* на росто-весовые параметры телят голштино-фризской породы / Г. В. Молянова, М. П. Ноготков // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2021 – № 1 – С. 46-51. – EDN WNCXHO.

3. Баймишева, С. А. Иммунологический статус коров в зависимости от дозы иммуномодулирующего средства / С. А. Баймишева // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020 – № 1 – С. 45-50.

4. Elucidating the role and regulation of a lactate permease as lactate transporter in *Bacillus coagulans* DSM1 / Y. Wang et al. // Applied and environmental microbiology. – 2019. – Т. 85. – №. 14. – P. e00672-19.

5. Transcriptional regulation of the l-lactate permease gene *lutP* by the *LutR* repressor of *Bacillus subtilis* RO-NN-1 / K. Chiu et al. // Microbiology. – 2014. – Т. 160. – №. 10. – P. 2178-2189.

6. Comparative transcriptome analysis reveals different molecular mechanisms of *Bacillus coagulans* 2-6 response to sodium lactate and calcium lactate during lactic acid production / J. Qin et al. // PloS. one. – 2015. – Vol. – №. 4. – P. e0124316.

7. Гусаков, А.В. Биокатализаторы на основе грибных целлюлаз: фундаментальные и приклад-

ные аспекты : дис. – Москва: МГУ им. МВ Ломоносова, 2005. – С.13.

8. Biochemical characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* strain and its effect on digestibility and structural modifications of lignocellulose rich biomass / W.A. Malik, S. Javed // Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2021. – Vol. 9. – P. 122-129.

9. Thermophilic *Bacillus coagulans* requires less cellulases for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to products than mesophilic microbial biocatalysts / M.S. Ou et al. // Applied biochemistry and biotechnology. – 2009. – Vol. 155. – №. 1. – P. 76-82.

10. Complete genome sequence of a thermotolerant sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans* strain 36D1 / M.S. Rhee et al. // Standards in Genomic Sciences. – 2011. – Vol. 5. – №. 3. – P. 331-340.

11. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4 / C. Le Marrec et al. // Applied and environmental microbiology. – 2000. – Vol. 66. – №. 12. – P. 5213-5220.

12. Characterization and antibacterial modes of action of bacteriocins from *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 against *Listeria monocytogenes* / J. Zhang et al. // LWT. – 2022. – Vol. 160. – P. 113272.

13. Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050 / S. Riaz et al. // Journal of applied microbiology. – 2009. – Vol. 106. – №. 4. – P. 1370-1377.

14. Marrec, L. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4 / L. Marrec // Journal of applied microbiology. – 1998. – Vol. 85. – №. 1. – P. 42-50.

DEVELOPMENT OF A BIOCOMPOSITION AS A COMPONENT OF A BIOLOGICAL PRODUCT FOR CORRECTION OF THE MICROECOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT OF PRODUCTIVE ANIMALS AND POULTRY

Feoktistova N.A., Dezhatkina S.V.

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ulyanovsk State Agrarian University
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, building 1: tel.: 89603621517
e-mail: feokna@yandex.ru*

Key words: *Bacillus coagulans*, *Weizmannia coagulans*, biocomposition, expression, genes, lactate permease (*lutP*), coagulin (*CoaD*.)

The article presents results of the research on development of a bacterial biocomposition for correction of the microecology of the gastrointestinal tract of productive animals and poultry of vector action. Reference strains of *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*) from the collection of FSBI State Research Institute of Genetics and field strains isolated from soil samples were used in the work.

Structural nucleotide sequences of the lactate permease (*lutP*) genes were determined in the NCBI system - the production of L (+) lactic acid (left-handed isomer) - and coagulin (*CoaD*) - bacteriostatic and / or bactericidal action against bacteria of *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Listeria*, *Pediococcus*, etc genera. The analysis of the structure of these genes (BLAST nucleotide and PRIMER BLAST) was carried out, systems for detection of lactate permease gene (primers: forward GCGTGCCGAACAAAACATTG, reverse ATCAACGGCGCACACACC) and coagulin gene (primers: forward AATTATCCGGGGCTTTACGGG, reverse ATGCTTTATGCACAACCGGC) were developed, PCR-RT conditions were improved, analysis of RNA level in relation to DNA was performed. Analysis of gene expression was accompanied by reaction normalization. The data obtained allow to form a probiotic biocomposition from *Bacillus coagulans* bacteria with a predictable effect, since it was experimentally established that candidate bacteria are characterized by high levels of lactate permease (*lutP*) gene expression - these are strains of *Bacillus coagulans* B.co.24, *Bacillus coagulans* B.co. 80 and *Bacillus coagulans* B.co. 48. and coagulin gene (*CoaD*) are strains of *Bacillus coagulans* B.co.20, *Bacillus coagulans* B.co.80 and *Bacillus coagulans* B.co.64 and *Bacillus coagulans* B.co.96. The vector effect of the developed

biological product is confirmed by high degree of expression by candidate bacterial strains of the genes encoding the production of active metabolites of lactate permease (*lutP*) and coagulins (*CoaD*), which enable to form a biological product from strains B.co.24, B.co.48, B.co.80, B.co.96.

Bibliography:

1. Safiullin I. N. Assessment of food security of Russia / I. N. Safiullin, B. G. Ziganshin, E. F. Amirova [and others] // Vestnik of Kazan State Agrarian University. - 2021 - Vol. 16 - № 2(62). - P. 124-132. – DOI 10.12737/2073-0462-2021-124-132. – EDN FKWBPM.
2. Molyanova, G.V. Effect of a preparation based on *Bacillus subtilis* on growth and weight parameters of Holstein-Friesian calves / G. V. Molyanova, M. P. Nogotkov // Izvestiya of Samara State Agricultural Academy. - 2021 - № 1 - P. 46-51. – EDN WNCXXO.
3. Baimisheva, S. A. Immunological status of cows depending on the dose of an immunomodulating agent / S. A. Baimisheva // Izvestiya of Samara State Agricultural Academy. - 2020 - № 1 - P. 45-50.
4. Elucidating the role and regulation of a lactate permease as lactate transporter in *Bacillus coagulans* DSM1 / Y. Wang et al. // Applied and environmental microbiology. - 2019. - V. 85. - № 14. - P. e00672-19.
5. Transcriptional regulation of the *l*-lactate permease gene *lutP* by the *LutR* repressor of *Bacillus subtilis* RO-NN-1 / K. Chiu et. al. // Microbiology. - 2014. - T. 160. - № 10. - P. 2178-2189.
6. Comparative transcriptome analysis reveals different molecular mechanisms of *Bacillus coagulans* 2-6 response to sodium lactate and calcium lactate during lactic acid production / J. Qin et al. // PLoS. one. - 2015. - Vol. 10. - № 4. – P. e0124316.
7. Gusakov, A.V. Biocatalysts based on fungal cellulases: fundamental and applied aspects: dis. - Moscow: Moscow State University named after M.V. Lomonosov, 2005. - P.13.
8. Biochemical characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* strain and its effect on digestibility and structural modifications of lignocellulose rich biomass / W.A. Malik, S. Javed // Frontiers in bioengineering and biotechnology. - 2021. - Vol. 9. - P. 122-129.
9. Thermophilic *Bacillus coagulans* requires less cellulases for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to products than mesophilic microbial biocatalysts / M.S. Ou et al. // Applied biochemistry and biotechnology. - 2009. - Vol. 155. - № 1. - P. 76-82.
10. Complete genome sequence of a thermotolerant sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans* strain 36D1 / M.S. Rhee et al. // Standards in Genomic Sciences. - 2011. - Vol. 5. - № 3. - P. 331-340.
11. Biochemical and genetic characterization of coagulins, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4 / C. Le Marrec et al. // Applied and environmental microbiology. - 2000. - Vol. 66. - № 12. - P. 5213-5220.
12. Characterization and antibacterial modes of action of bacteriocins from *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 against *Listeria monocytogenes* / J. Zhang et al. // L.W.T. - 2022. - Vol. 160. - P. 113272.
13. Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050 / S. Riaz et al. // Journal of applied microbiology. - 2009. - Vol. 106. - № 4. - P. 1370-1377.
14. Marrec, L. Coagulins, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4 / L. Marrec // Journal of applied microbiology. - 1998. - Vol. 85. - № 1. - P. 42-50.