

УДК 579.22:636.08

**ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS COAGULANS*
(*WEIZMANNIA COAGULANS*) - КАНДИДАТОВ ПРИ
РАЗРАБОТКЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО БИОПРЕПАРАТА**

**Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru**

**Дежаткина С.В., доктор биологических наук, профессор,
тел. 8(8422) 55-95-47, dsw1710@yandex.ru**

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Weizmannia coagulans*, *Bacillus coagulans*, кандидатные штаммы, антибиотикоустойчивость, температурный фактор, водородный показатель

*Работа посвящена изучению антибиотикочувствительности и устойчивости к температурному фактору и водородному показателю кандидатных при разработке пробиотического биопрепарата бактериальных культур *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*). Установлено, что изучаемые штаммы не устойчивы к тобрамицину, цефалексину, цефотаксиму, гентамицину и тетрациклину. Жизнеспособны при температурах культивирования в диапазоне 17-92 °С; водородный показатель в диапазоне 3,4-8,2 не влияет на жизнеспособность изучаемых бактерий.*

Введение. В связи с адаптацией бактерий к антибиотикам и появлением резистентных форм микроорганизмов, усилением их патогенности и ухудшения экологической ситуации на фоне неконтролируемого применения антибиотиков становится очевидным, что необходимо разработать и внедрить в повседневную практику промышленного животноводства кормовые добавки на основе бактериальных штаммов, обладающих пробиотическими свойствами [1]. Для профилактики здоровья молодняка сельскохозяйственных животных необходимо поддерживать популяцию полезных бактерий в

пищеварительном тракте [2]. Поэтому важно при его выращивании создавать те условия, обеспечивающие формирование собственного микробиоценоза, включая применение средств, в том числе пробиотиков, способствующих формированию микрофлоры в нужном для организма направлении [3]. Исходя из выше изложенного, возникает необходимость разработки современных средств коррекции и мер профилактики кишечных дисбиозов, предупреждающих возникновение эндогенных бактериальных инфекций в целях поддержания полезной микрофлоры.

Бактерии вида *Weizmannia coagulans* ранее классифицировалась как *Bacillus coagulans* [4]. По литературным данным, у лабораторных животных с бактериальным дисбактериозом добавка *B. coagulans* подавляет рост патогенных микроорганизмов и приводит к восстановлению желаемых облигатных желудочно-кишечных организмов до нормального уровня [5].

Цель исследований - изучение антибиотикочувствительности и устойчивости к неблагоприятным факторам кандидатных при разработке пробиотического биопрепарата бактериальных культур *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*).

Материалы и методы исследований. В работе был использован референс-штаммы из коллекции Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика» Минобрнауки России: *Bacillus coagulans* В-6668, *Bacillus coagulans* В-2270 - продуцент пуллуланы, *Bacillus coagulans* В-10468 - продуцент L+ молочной кислоты, *Bacillus coagulans* В-10473, *Bacillus coagulans* В.со. - 264, и полевые штаммы, выделенные коллективом авторов в ходе выполнения проекта из проб почвы: *Bacillus coagulans* В.со.20, *Bacillus coagulans* В.со.24, *Bacillus coagulans* В.со.80, *Bacillus coagulans* В.со.64, *Bacillus coagulans* В.со.48, *Bacillus coagulans* В.со.96.

Питательные среды: питательный бульон ТУ 10-02-02-789-176-94 (ООО «БиоКомпас-С», РФ), питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) ТУ 9398-020-78095326-2006 (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ), уксусная кислота, гидроксид натрия, рН-метр, диски с антибиотиками (НИЦФ, РФ), лабораторная посуда, термостат, водяная баня.

Методическое обеспечение исследований [6-8].

Определение антибиотикочувствительности бактерий проводили методом диффузии в агар, используя стандартные диски с антибиотиками. Для этого из суточной бульонной культуры (3-4 капли) делали газон на чашке с агаром, при этом нанесенную культуру стерильным шпателем распределяли равномерно по поверхности среды. Затем на эти чашки пинцетом распределяли диски с антибиотиками по 6 штук на одну чашку. Через 24 часа после культивирования в термостате (35 °С) измеряли штангенциркулем с точностью до 1 мм диаметр зоны отсутствия роста микроорганизмов.

Определение устойчивости к температурному фактору проводили с применением водяной бани: прогревали при заданной температурой протоколом суточную бульонную культуру, выросшую при стандартных условиях – 35 °С, и производили высеив на плотную питательную среду.

Изучение устойчивости бактериальных штаммов *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*) к различным показателям pH проводили диско-диффузным методом на твердой питательной среде – МПА (мясо-пептонном агаре). Метод основан на способности растворов кислот и щелочей диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара. Контролем были диски, пропитанные дистиллированной водой (pH 6,9). Посевы инкубировали при 35 °С в течение 24 часов. По диаметру зон задержки роста *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*) делали выводы о чувствительности. Значение более 2 мм фиксировалось нами как ингибирующее действие.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате изучения антибиотикочувствительности выделенных нами из проб почвы бактерий, которые были идентифицированы по авторской бактериологической схеме идентификации бактерий *Bacillus* с учетом биологических характеристик представителей рода *Bacillus*, описанных в «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) [9] и референс-штаммов мы установили, что тобрамицин и гентмицин оказывают ингибирующее действие на все изучаемые бактериальные штаммы *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*), из иных антимикробных препаратов

наиболее активное воздействие на бактерии оказывали гентамицин и тетрациклин. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Определение антибиотикочувствительности бактериальных штаммов *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*)

Название исследуемого бактериального агента	Ампициллин (АМП)	Бензилпенициллин (ПЕН)	Гентамицин (ГЕН)	Левомецетин (ЛЕВ)	Линкомицин (ЛИН)	Оксациллин (ОКС)	Тетрациклин (ТЕТ)	Тобрамицин(ТОБ)	Цефазолин (ЦЗ)	Цефалексин (ЦФЛ)	Цефотаксим (ЦТК)	Эритромицин (ЭРИ)
<i>Bacillus coagulans</i> B-6668	18	10	25	24	17	28	21	28	6	33	35	14
<i>Bacillus coagulans</i> B-2270	14	15	21	27	14	15	24	12	15	17	30	9
<i>Bacillus coagulans</i> B-10468	11	9	24	21	21	14	19	24	8	31	19	17
<i>Bacillus coagulans</i> B-10473	19	16	17	25	14	14	16	23	10	29	18	8
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.264	10	11	14	22	18	17	15	27	12	22	25	11
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.20	-	-	21	-	-	-	14	22	-	19	2	8
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.24	-	-	36	20	-	-	18	28	-	23	30	11
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.80	-	-	16	18	14	-	10	16	-	34	10	28
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.64	-	-	13	-	-	-	19	16	-	20	28	-
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.48	23	22	16	-	-	18	-	12	-	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.96	19	8	19	30	20	8	-	16	11	18	21	12

Был определен температурный минимум и максимум для изучаемых бактерий *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*). Результаты исследований представлены в таблицах 2-3. Установлено, что температурный диапазон для роста вышеназванных бактерий в основном составляет 17-92 °С.

Таблица 2 – Изучение максимальной и минимальной температуры роста для бактерий *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*), входящих в состав биокомпозиции

Название исследуемого бактериального агента	Температурный минимум, °С					Температурный максимум, °С						
	15	17	19	21	23	25	55	56	57	58	59	60
<i>Bacillus coagulans</i> B-6668	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B-2270	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B-10468	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B-10473	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.264	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.80	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.48	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.96	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 3 – Устойчивость бактериальных культур *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*) к воздействию высоких температур

Название исследуемого бактериального агента	Показатель температуры, °С											
	63	66	69	72	75	78	81	84	87	90	91	92
<i>Bacillus coagulans</i> B-6668	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B-2270	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B-10468	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B-10473	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.264	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Изучена жизнеспособность бактериальных штаммов *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*) при различных показателях pH среды культивирования (таблица 4).

Таблица 4 – Изучение жизнеспособности изучаемых бактериальных штаммов при различных показателях pH среды культивирования

Название исследуемого агента	Значение водородного показателя среды культивирования											
	3,4	4,0	4,4	4,8	5,5	5,8	6,4	6,8	7,4	7,8	8,2	
<i>Bacillus coagulans</i> B-6668	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B-2270	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B-10468	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B-10473	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.264	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> B.co.96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Определено, что водородный показатель в диапазоне 3,4-8,2 не влияет на жизнеспособность изучаемых бактерий.

Заключение. Проведенные нами исследования по изучению антибиотикочувствительности и устойчивости к температурному фактору и водородному показателю кандидатных бактериальных культур *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*) позволило установить, что бактерии *Bacillus coagulans* В-6668, *Bacillus coagulans* В-2270, *Bacillus coagulans* В-10468, *Bacillus coagulans* В-10473, *Bacillus coagulans* В.со.264, *Bacillus coagulans* В.со.44, *Bacillus coagulans* В.со.20, *Bacillus coagulans* В.со.24, *Bacillus coagulans* В.со.80, *Bacillus coagulans* В.со.64, *Bacillus coagulans* В.со.48, *Bacillus coagulans* В.со.96. не устойчивы к тобрамицину, цефалексину, цефотаксиму, гентамицину и тетрациклину. Вышеназванные бактерии жизнеспособны при температурах культивирования в диапазоне 17-25 и 55-60 °С, повышение температуры культивирования в течение 30 минут до 92 °С не ингибирует рост бактерий. Определено, что водородный показатель в диапазоне 3,4-8,2 не влияет на жизнеспособность изучаемых штаммов бактерий *Bacillus coagulans*.

Исследование выполнено при поддержке Программы развития Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова (Приоритет-2030).

Библиографический список:

1. Белооков, А.А. Рост и удоиные качества телочек герефордской породы под влиянием микробиологических препаратов / А. А. Белооков // Изв. Оренбургской гос. аграр. ун-та. - 2009. - № 3 (23). - С. 64-66.
2. Данилевская, Н.В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков в ветеринарии / Н.В. Данилевская // Ветеринария сельскохозяйственных животных, 2012. - № 10. - С. 8-14.
3. Хазиахметов, Ф.С. Использование пробиотика «Витафорт» в рационах молодняка сельскохозяйственных животных / Ф.С. Хазиахметов, А.Е. Андреева, А.А. Камильянов // «Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства»: материалы Международной научно-практической конференции/ Ставропольский ГАУ. - Ставрополь, 2013. - С. 72-75.

4. *Bacillus coagulans* SANK 70258 suppresses *Enterobacteriaceae* in the microbiota of ulcerative colitis in vitro and enhances butyrogenesis in healthy microbiota / K. Sasaki et al. // Appl. Microbiol. Biot. – 2020. – Vol. 104. - № 9. – P. 3859–3867.

5. Presence of *Bacillus coagulans* spores and vegetative cells in rat intestine and feces and their physiological effects / C. Saw et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 2019. – Vol. 83. - № 12. – P. 2327–2333.

6. Новомлинская, В.Н. Зависимость устойчивости бифидобактерий от pH среды в условиях in vitro / В.Н. Новомлинская, Н.В. Серикова // Вопросы науки и образования. 2017. - №6 (7). - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/zavisimost-ustoychivosti-bifidobakteriy-ot-ph-sredy-v-usloviyah-in-vitro> (дата обращения: 11.05.2022).

7. Кулешова, С.В. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар / С.В. Кулешова // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2015. - №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/opredelenie-aktivnosti-antibiotikov-metodom-diffuzii-v-agar> (дата обращения: 11.05.2022).

8. Техэксперт. ГОСТ Р 56139-2014. Продукты пищевые функциональные. Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов. Functional foods. Methods for detection and enumeration of probiotic microorganisms. - URL: <http://docs.cntd.ru/document/> (дата обращения 12.08.2022).

9. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / W. B. Whitman et al. – Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015 – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608> (дата обращения 12.07.2022).

STUDY OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES BACTERIAL STRAINS *BACILLUS COAGULANS* (*WEIZMANNIA COAGULANS*) CANDIDATES FOR PROBIOTIC BIOLOGICS

Feoktistova N.A., Dezhatkina S.V.

Key words: *Weizmannia coagulans*, *Bacillus coagulans*, candidate strains, antibiotic resistance, temperature factor, hydrogen index

The work is devoted to the study of antibiotic sensitivity and resistance to the temperature factor and hydrogen index of candidates in the development of a probiotic biological preparation of bacterial cultures Bacillus coagulans (Weizmannia coagulans). The strains under study were found not to be resistant to tobramycin, cephalixin, cefotaxime, gentamicin and tetracycline. Viable at cultivation temperatures in the range of 17-92 °C; the hydrogen index in the range of 3.4-8.2 does not affect the viability of the studied bacteria.