



## АМИЛОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИКРОБИОТЫ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ\*

✉ Павлов А.Г.

Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова  
Республика Саха (Якутия), Якутск, Россия

✉ e-mail: agronii@mail.ru

В настоящее время изучение ферментативного потенциала бактерий *Bacillus subtilis* является востребованным в силу того, что на их основе создаются пробиотические и ферментативные препараты для использования их в животноводстве. Представлены результаты исследования амилолитической активности 10 изолятов бактерий *B. subtilis*, выделенных из микробиоты диких животных, на амилопектин. Определение активности бактериальных ферментов производили методом Шомоди – Нельсона. В качестве ферментного препарата взяты супернатанты культуральной жидкости посевов 1, 2, 3 и 7-го дня. Изоляты с высокими качественными показателями исследовали количественно с использованием спектрофотометра. Отобраны два изолята с лучшими показателями. Концентрацию белков определяли методом Брэдфорда. Кроме изучения супернатантов изолятов, которые показали внеклеточную ферментативную активность, проведены исследования на внутриклеточные ферменты. Разрушение клеток производилось с помощью ультразвукового дезинтегратора, в котором растворенный осадок содержался в стеклянном флаконе, находящемся в колбе со льдом. Наилучшие качественные показатели выявлены у изолятов *B. subtilis* 2СП и *B. subtilis* 5СП, имеющих высокую активность по амилопектину начиная с первого дня, поэтому дальнейшие количественные исследования продолжены с ними. Концентрация белка у указанных изолятов прогрессировала по дням посевов. Удельная активность тоже соответственно увеличивалась и на 7-й день у изолята *B. subtilis* 2СП составила 2,75 ед./мг, у *B. subtilis* 5СП – 2,67 ед./мг. Изучение активности внутриклеточных ферментов у данных изолятов подтвердили аналогичные качественные показатели. По результатам исследований отобраны перспективные для разработки ферментных препаратов два изолята *B. subtilis*, выделенные из микробиоты диких животных Крайнего Севера.

**Ключевые слова:** дикие животные, микробиота, *Bacillus subtilis*, амилопектин, фермент, супернатант

## AMYLOLYTIC ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* ISOLATES OBTAINED FROM WILDLIFE MICROBIOTA\*

✉ Pavlov A.G.

Yakut Scientific Research Institute of Agriculture named after M.G. Safronov  
Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia

✉ e-mail: agronii@mail.ru

At present, the study of the enzymatic potential of *Bacillus subtilis* bacteria is in demand due to the fact that probiotic and enzymatic preparations are created on their basis for their use in animal husbandry. The results of the study of amylolytic activity of 10 isolates of *B. subtilis* bacteria iso-

\*Научный руководитель – доктор ветеринарных наук, профессор М.П. Неустроев.

\*Supervisor - Doctor of Science in Veterinary Medicine, Professor M.P. Neustroev.

lated from wildlife microbiota for amylopectin are presented. Determination of bacterial enzyme activity was performed by the Schomodi-Nelson method. The supernatants of the culture liquid of the 1st, 2nd, 3rd, and 7th day cultures were taken as enzyme preparation. Isolates with high qualitative indices were examined quantitatively using a spectrophotometer. The two isolates with the best performance were selected. Protein concentration was determined by the Bradford method. In addition to studying supernatants of isolates that showed extracellular enzymatic activity, studies were performed on intracellular enzymes. Cell destruction was performed using an ultrasonic disintegrator, in which the dissolved sediment was contained in a glass vial in a flask with ice. The best qualitative indicators were found in *B. subtilis* 2SP and *B. subtilis* 5SP isolates, which had high amylopectin activity from day one, so further quantitative studies were continued with them. Protein concentrations in the above isolates progressed by the days of seeding. The specific activity also increased accordingly and on day 7, the *B. subtilis* 2SP isolate was 2.75 units/mg, *B. subtilis* 5SP 2.67 units/mg. The study of the activity of intracellular enzymes in these isolates confirmed similar qualitative indicators. Two *B. subtilis* isolates were selected as promising for the development of enzyme preparations isolated from the microbiota of wild animals of the Far North.

**Keywords:** wild animals, microbiota, *Bacillus subtilis*, amylopectin, enzyme, supernatant

**Для цитирования:** Павлов А.Г. Амилолитическая активность изолятов бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из микробиоты диких животных // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2022. Т. 52. № 5. С. 130–135. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2022-5-16>

**For citation:** Pavlov A.G. Amylolytic activity of *Bacillus subtilis* isolates obtained from wildlife microbiota. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki* = *Siberian Herald of Agricultural Science*, 2022, vol. 52, no. 5, pp. 130–135. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2022-5-16>

**Конфликт интересов**

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest**

The author declares no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

*Bacillus subtilis* – аэробная грамположительная почвенная бактерия, которая используется для производства гетерологичных белков. Она выделяет многочисленные ферменты для деградации различных субстратов, что позволяет бактериям выживать в почвенной среде, а также в ризосфере растений [1]. Этот вид и некоторые его близкородственные виды бактерий обладают отличной способностью секретировать белки, что делает их важными производителями лекарственных белков и промышленных ферментов. Кроме того, она имеет прекрасные физиологические характеристики и высоко адаптируемый метаболизм, что позволяет легко культивировать ее на дешевых субстратах. *B. subtilis* быстро растет, цикл ферментации короткий (обычно около 48 ч), в то время как цикл ферментации *Saccharomyces cerevisiae* составляет около 180 ч [2].

В России и за рубежом *B. subtilis* применяют в качестве пробиотических препаратов [3]. В Якутском научно-исследовательском институте сельского хозяйства (ЯНИИСХ) разработан препарат «Сахабактисубтил» на основе штаммов бактерий *B. subtilis* «ТНП-3 ДЕП» и *B. subtilis* «ТНП-5 ДЕП», выделенных из мерзлотных почв Якутии. Данный препарат обладает выраженным антагонистическим действием против многих патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, нормализует микробиоценоз кишечника животных, обостряет иммунобиологическую реактивность организма [4]. По данным литературы, в микробиоте диких животных севера доминируют бактерии рода *Bacillus* [5–7].

Бактерии рода *Bacillus* являются перспективными микроорганизмами, которые широко применяют в животноводстве. На их основе создают кормовые добавки, в которых *Bacillus* выступает в качестве источника

гидролаз. В настоящее время для увеличения питательной ценности кормов, повышения перевариваемости используют ферментные препараты амила субтилин, протосубтилин, моноспорин и др. Ферментные препараты на основе бацилл положительно влияют на пищеварение и обмен веществ у сельскохозяйственных птиц и животных [8].

Промышленное использование *B. subtilis* быстро развивается в последние десятилетия. Это один из основных микроорганизмов для производства многих промышленных продуктов. Химические вещества, продуцируемые *B. subtilis*, также играют важную роль в различных областях, например в производстве продуктов питания, кормовых добавок, косметических средств, химикатов, а также в фармацевтике [9]. *B. subtilis* классифицируется как общепризнанно безопасная бактерия (GRAS), которую можно использовать в виде безопасного пищевого продукта [10].

Расшифровка геномных детерминант гидролиза крахмала на основе компьютерного моделирования показала, что амилалитическая активность у грамположительных бактерий зависит от сложного преобразования генетической программы клетки. В то же время достоверно подтверждено, что способность бактерии расщеплять крахмал зависит не от наличия гена  $\alpha$ -амилазы в его геноме, а от амилазной активности [11].

Цель работы – изучить ферментативную активность изолятов бактерий *B. subtilis*, выделенных их микробиоты диких животных, на амилопектин.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены в 2022 г. в лаборатории разработки микробных препаратов ЯНИИСХ и в лаборатории химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова. Изоляты *B. subtilis* – 3, 4, 5, 8, 11, 16, 24, 25, 2сп и 5сп, выделенные из микробиоты диких животных, взяты из рабочей коллекции микроорганизмов ЯНИИСХ. Для посевов бактерий использован мясопептонный бульон. Для насыщения кислородом его инкубировали на качалке в колбах с ват-

но-марлевой пробкой при комнатной температуре.

При проведении исследований для определения активности бактериальных ферментов использовали метод Шомоди – Нельсона. Концентрацию белков определяли методом Брэдфорда.

Отобранные от посевной культуры аликваты центрифугировали при 4500 об./мин в течение 15 мин. Из полученных супернатантов сделали смеси E + S (фермент с субстратом), E + H<sub>2</sub>O (фермент-контроль), S + H<sub>2</sub>O (субстрат-контроль), 100 и 200 мкл соответственно. Смесь дистиллированной воды с супернатантом показывает интенсивность расщепления собственных сахаров, с субстратом – возможное расщепление сахаров без участия фермента. Время ферментации в термостате при 37 °C составило ~18 ч. После ферментации для определения активности бактериальных ферментов использовали метод Шомоди – Нельсона с добавлением 300 мкл раствора Нельсона A + B в смеси E + S, E + H<sub>2</sub>O и S + H<sub>2</sub>O. Далее ставили в термостат при 99 °C на 15 мин, добавили 300 мкл раствора Нельсона C и 500 мкл дистиллированной воды. По итогам исследований методом Нельсона определяли качественные показатели изолятов. С высокими качественными показателями исследовали количественно с использованием спектрофотометра при длине волны 750 нм. Концентрацию белков определяли методом Брэдфорда при 595 нм. В качестве субстрата использовали раствор амилопектина в сукцинатном буферном растворе (pH 6,0) в концентрации 1 мг/мл. Кроме изучения супернатантов изолятов, которые показали внеклеточную ферментативную активность, проведены исследования на внутриклеточные ферменты. Для этого после центрифугирования односуточной посевной культуры брали осадок и растворяли в сукцинатном буферном растворе (pH 6,0). Разрушение клеток производилось с помощью ультразвукового дезинтегратора, в котором растворенный осадок содержался в стеклянном флаконе, находящемся в колбе со льдом. Дезинтегратор выключался с периодичностью в 2 мин на протяжении 20 мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам исследований выявлена амилолитическая активность супернатантов изолятов *B. subtilis* на 1, 2, 3 и 7-й день посева на амилопектин (см. таблицу). Контроль-субстраты были прозрачными, не имели голубой окраски, что подтверждает достоверность результатов.

По результатам наших исследований, наилучшие качественные показатели выявлены у изолятов *B. subtilis* 2СП и *B. subtilis* 5СП. Они имели высокую активность по амилопектину начиная с первого дня, поэтому дальнейшие количественные исследования продолжены с ними.

Как показывают данные рис. 1 и 2, качественные показатели изолятов подтвердились количественными исследованиями. Концентрация белка изолятов прогрессировала по дням посевов (см. рис. 1). Удельная активность тоже соответственно увеличивалась и на 7-й день у *B. subtilis* 2СП составила 2,75 ед./мг, у *B. subtilis* 5СП – 2,67 ед./мг (см. рис. 2).

При исследовании внутриклеточных ферментов активность на фермент-контроле не наблюдали, поэтому можно предположить, что изоляты штаммов *B. subtilis* 2СП и *B. subtilis* 5СП расщепили именно субстрат амилопектина без примесей своих сахаров. Этот ме-

Качественные показатели амилолитической активности супернатантов *B. subtilis* по дням посевов  
Qualitative indices of amylolytic activity of *B. subtilis* supernatants by days of planting

| Изолят            | Амилопектин | Е + H <sub>2</sub> O | Амилопектин | Е + H <sub>2</sub> O | Амилопектин | Е + H <sub>2</sub> O | Амилопектин | Е + H <sub>2</sub> O |
|-------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|
|                   | 1-й день    |                      | 2-й день    |                      | 3-й день    |                      | 7-й день    |                      |
| 11                | –           | –                    | –           | –                    | +           | –                    | ±           | ±                    |
| 25                | –           | –                    | –           | –                    | ±           | –                    | ±           | ±                    |
| 3                 | –           | –                    | –           | –                    | ±           | –                    | ±           | ±                    |
| 5                 | –           | –                    | –           | –                    | ±           | –                    | ±           | ±                    |
| 16                | –           | –                    | ±           | –                    | ++          | –                    | ±           | ±                    |
| 2СП               | +++         | +                    | +++         | +                    | +++         | +                    | +++         | +                    |
| 24                | –           | –                    | –           | –                    | ±           | –                    | ±           | ±                    |
| 8                 | –           | –                    | –           | –                    | +±          | –                    | ±           | ±                    |
| 4                 | ±           | –                    | ±           | –                    | +±          | –                    | ±           | ±                    |
| 5СП               | +++         | +                    | +++         | +                    | +++         | +                    | +++         | +                    |
| Контроль-субстрат | –           |                      | –           |                      | –           |                      | –           |                      |

Примечание. «–» – активность отсутствует, «±» – небольшая активность, «+» – средняя активность, «++» – невысокая активность, «+++» – высокая активность.

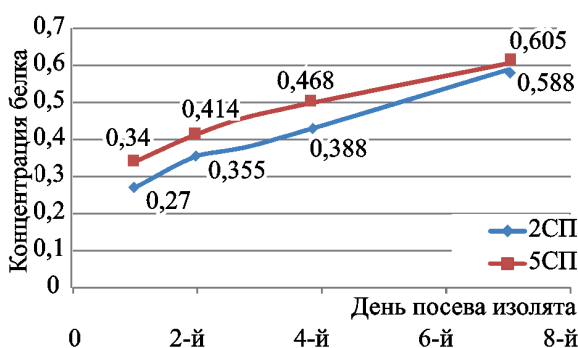


Рис. 1. Концентрация белка изолятов *B. subtilis* 2СП и *B. subtilis* 5СП по дням посевов, мг/мл

Fig. 1. Protein concentration of *B. subtilis* 2SP and *B. subtilis* 5SP isolates by days of planting, mg/ml

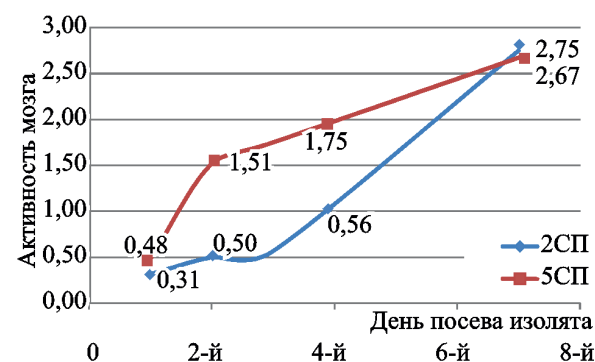


Рис. 2. Удельная активность лизатов на амилопектин по дням посевов, ед./мг белка

Fig. 2. Specific activity of lysates for amylopectin by days of planting, units/mg protein

тод оказался мало информативен, за исключением того, что у изолятов не было активности в фермент-контроле, когда как качественные показатели по Нельсону на амилопектин сопоставимы с исследованиями супернатантов на спектрофотометре.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для дальнейших исследований и разработки ферментных препаратов отобраны два перспективных изолята *B. subtilis* 2СП и *B. subtilis* 5СП, выделенные из микробиоты диких животных Крайнего Севера, с амилалитической активностью 2,75 и 2,67 ед./мг соответственно.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Донкова Н.В., Донков С.А. Ферментативная активность бактерий из рода *Bacillus* при гидролизе крахмалсодержащего растительного сырья // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2021. № 5 (170). С. 174–179. DOI: 10.36718/1819-4036-2021-5-174-179.
2. Earl A.M., Losick R., Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis* // Trends in Microbiology. 2008. Vol. 16. P. 69–75. DOI: 10.1016/j.tim.2008.03.004.
3. Новик Я.В., Ноздрин Г.А., Ноздрин А.Г. Влияние пробиотических препаратов на основе *Bacillus subtilis* на массу гусят // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2022. № 2 (208). С. 55–58. DOI: 10.53083/1996-4277-2022-208-2-55-58.
4. Николаева Н.А., Тарабукина Н.П., Степанова А.М., Борисова П.П., Алексеева Н.М., Парникова С.И. Применение кормовых добавок в кормлении телок симментальской породы // Международный сельскохозяйственный журнал. 2021. № 5. С. 78–82. DOI: 10.24411/2587-6740-2020-11015.
5. Лайшев К.А., Ильина Л.А., Ёылдырым Е.А., Филиппова В.А. Микробиота рубца у северных оленей (*Rangifer tarandus*) с клиническими проявлениями некробактериозов // Сельскохозяйственная биология. 2019. № 4. С. 744–753. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.4.744rus.
6. Кудреватых И.А., Шумилина Н.Н. Оценка микробного пейзажа кишечника крольчат // Пермский аграрный вестник. 2018. № 1 (21). С. 121–124.

7. Тарабукина Н.П., Неустроев М.П., Степанова А.М., Парникова С.И., Дулова С.В., Скрябина М.П., Обоева Н.А. Бактерицидная активность санитарно-гигиенического средства на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis* // Гигиена и санитария. 2020. № 3. С. 265–269. DOI: 10.33029/0016-9900-2020-99-3-265-269.
8. Мухаммадиев Р.С., Мухаммадиев Р.С. Ферментативная активность ксиланаз и целлюлаз пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* // Ветеринарный врач. 2019. № 3. С. 19–23. DOI: 10.33632/1998-698X.2019-3-19-24.
9. Su Y., Liu C., Fang H. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine // Microbial Cell Factories. 2020. Vol. 19. DOI: 10.1186/s12934-020-01436-8.
10. Yao D., Su L., Li N. Enhanced extracellular expression of *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis* through signal peptide optimization, chaperone overexpression and  $\alpha$ -amylase mutant selection // Microbial Cell Factories. 2019. Vol. 18. DOI: 10.1186/s12934-019-1119-8.
11. Бруслик Н.Л., Каюмов А.Р., Богачев М.И., Яруллина Д.Р. Сравнительная характеристика амилалитической активности грамположительных бактерий // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2014. № 2. С. 47–51.

## REFERENCES

1. Donkova N.V., Donkov S.A. Enzymatic activity of bacteria from genus *Bacillus* during hydrolysis of starch-containing vegetable raw materials. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* = *Vestnik KrasGAU*, 2021, no. 5 (170), pp. 174–179. (In Russian). DOI: 10.36718/1819-4036-2021-5-174-179.
2. Earl A.M., Losick R., Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 2008, vol. 16, pp. 69–75. DOI: 10.1016/j.tim.2008.03.004.
3. Novik YA.V., Nozdryn G.A., Nozdryn A.G. Effect of probiotic products based on *Bacillus subtilis* on gosling weight. *Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* = *Bulletin of Altai State Agricultural University*, 2022, no. 2 (208), pp. 55–58. (In Russian). DOI: 10.53083/1996-4277-2022-208-2-55-58.
4. Nikolaeva N.A., Tarabukina N.P., Stepanova A.M., Borisova P.P., Alekseeva N.M., Parnikova S.I. The use of feed additives in the feeding of heifers of the Simmental breed. *Mezhdunarodnyi sel'skokhozyaistvennyi zhurnal* = *International*

- Agricultural Journal*, 2021, no. 5, pp. 78–82. (In Russian). DOI: 10.24411/2587-6740-2020-11015.
5. Lajshev K.A., Il'ina L.A., Jyldyrym E.A., Filipova V.A. The rumen microbiota of reindeer (*Rangifer tarandus*) with clinical manifestations of necrobacteriosis. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*, 2019, no. 4, pp. 744–753. (In Russian). DOI: 10.15389/agrobiology.2019.4.744rus.
  6. Kudrevatyh I.A., Shumilina N.N. Evaluation of microbial landscape of the intestine in rabbits. *Permskij agrarnyj vestnik = Perm Agrarian Journal*, 2018, no. 1 (21), pp. 121–124. (In Russian).
  7. Tarabukina N.P., Neustroev M.P., Stepanova A.M., Parnikova S.I., Dulova S.V., Skryabina M.P., Oboeva N.A. Bactericidal activity of a sanitary and hygienic product based on *Bacillus subtilis* bacteria strains. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2020, no. 3, pp. 265–269. DOI: 10.33029/0016-9900-2020-99-3-265-269.
  8. Muhammadiev Rish.S., Muhammadiev Rin.S. Enzymatic activity of xylanases and cellulases of probiotic strains *Bacillus subtilis*. *Veterinarnyj vrach = Veterinarny Vrach*, 2019, no. 3, pp. 19–23. (In Russian). DOI: 10.33632/1998-698X.2019-3-19-24.
  9. Su Y., Liu C., Fang H. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 2020, vol. 19. DOI: 10.1186/s12934-020-01436-8.
  10. Yao D., Su L., Li N. Enhanced extracellular expression of *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis* through signal peptide optimization, chaperone overexpression and  $\alpha$ -amylase mutant selection. *Microbial Cell Factories*, 2019, vol. 18. DOI: 10.1186/s12934-019-1119-8.
  11. Bruslik N.L., Kayumov A.R., Bogachev M.I., Yarullina D.R. Comparative analysis of amylolytic activity in gram-positive bacteria. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2014, no 2, pp. 47–51 (In Russian).

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

✉ **Павлов А.Г.**, аспирант; **адрес для переписки:** Россия, 677001, Республика Саха (Якутия), Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, 23/1; e-mail: agronii@mail.ru

## AUTHOR INFORMATION

✉ **Ayal G. Pavlov**, Postgraduate Student, **address:** 23/1, Bestuzheva-Marlinskogo St., Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), 677001, Russia; e-mail: agronii@mail.ru

Дата поступления статьи / Received by the editors 18.08.2022  
Дата принятия к публикации / Accepted for publication 17.10.2022  
Дата публикации / Published 25.11.2022