

Bacillus amyloliquefaciens – общая характеристика и применение в промышленном птицеводстве

2017

Материал для сайта svetmix.com

Bacillus amyloliquefaciens - это бактерии из рода *Bacillus*, относятся к факультативным аэробным палочковидным бактериям. Размеры палочек бактерий у типового штамма (F) 0,7-0,9x1,8-3,0 мкм, споры овальной формы размером 0,6-0,8x1,0-1,4 мкм. Температурный оптимум роста составляет 30-40°C, рост прекращается при температурах ниже 15°C и выше 50°C [1]. Эти параметры как правило сохраняются и у других штаммов, с незначительными вариациями. ДНК типового штамма F (Fukomoto strain F) содержит 46,4 моль% нуклеотидных пар гуанин-цитозин, размер генома - 3,96 мегабаз. Среди близких видов – *B. Subtilis*, есть много совпадений в геноме. Идентичность геномов составляет менее 25%, что позволило выделить и охарактеризовать *B. Amyloliquefaciens* как отдельный вид.

B. amyloliquefaciens были выделены из почвы и промышленных ферментеров амилазы и в первую очередь являются стимулятором роста для растений. Они способны подавлять растительные патогены. *B. amyloliquefaciens* разлагают фитат (миоинозитолгексакисфосфат), переводя таким образом фосфор в доступную для растений форму.

Большие перспективы использования протеолитических ферментов диктуют необходимость поиска как новых продуцентов, так и путей увеличения промышленного выхода протеаз, на которые приходится до 40% от мирового объема производства всех ферментов. Как и другие представители рода бацилл, *Bacillus amyloliquefaciens* - активные продуценты протеолитических ферментов, в том числе альфа-амилазы [2,3] и субтилизина (аналог трипсина) [17, 18]. Кроме того, они производят и другие вещества, в том числе бацилломицин, сурфактин, итурин, амилолизин, фенгицин. Также синтезируют *bamH1* рестриктазу и собственный антибиотик барназу (рибонуклеаза, 89 а.к.), плантазолицин.

Помимо типового штамма F (Fukomoto strain), селекционировано много коммерческих штаммов *B. Amyloliquefaciens* с различной специализацией на продукцию того или иного компонента. Штаммы отечественной селекции депонированы в том числе и во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) ГНИИ Генетик, на их основе разрабатывают препараты и кормовые добавки [22].

B. Amyloliquefaciens обладает бактерицидной, фунгицидной и вирулицидной активностью и широко применяется для восстановления микробиоценозов почвы.

Растениеводство - основная, но не единственная сфера применения *B. amyloliquefaciens*. Они используются в пищевой промышленности, лабораторных исследованиях, животноводстве. Используют как непосредственно вещества, которые продуцируют эти бактерии, так и их споры самих бактерий. Из *B. amyloliquefaciens* выделяют большое число ферментов (в основном протеаз) для коммерческого использования, также на их основе создают биодобавки и пробиотики, споры бактерий добавляют в кормовые смеси. В данном обзоре *B. amyloliquefaciens* рассматривается как полезный мульти-продуцент применительно к птицеводству.

1. Протеазы *B. amyloliquefaciens*

B. amyloliquefaciens вырабатывает большое количество протеаз. Многие из них находят применение в промышленности, сельском хозяйстве и лабораторных исследованиях.

Альфа-амилаза

B. amyloliquefaciens является продуцентом протеолитического фермента альфа-амилазы. Фермент имеет специфичность к гидролизу 1,4-альфа-Д-гликозидных связей

полисахаридов, содержащих 3 и более молекул глюкозы. Альфа-амилаза используется в научных исследованиях, лабораторных анализах, а также в пищевой и агро-промышленности.

Ген альфа-амилазы из *B. amyloliquefaciens* был выделен и клонирован еще в 80-е годы XX века. Так, например, в 1882 году были проведены научные работы по изучению различных свойств его геномной последовательности с применениями методов генной инженерии [2]. Ген альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens* был локализован, выделен и клонирован в *B. subtilis*. Активность полученной альфа-амилазы была 5 раз выше по сравнению с активностью нативного фермента *B. amyloliquefaciens* и в 2500 раз превышала активность собственной альфа-амилазы *B. subtilis*. В более поздних работах 2010 года проводилось подробное изучение кристаллической структуры альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens* и ее влияние на термостабильность фермента [3].

Стандартные коммерческие альфа-амилазы (4-альфа-Д-глюканаминогидролаза) из *B. amyloliquefaciens* могут значительно отличаться по своей удельной активности (~50-900 ед/мг фермента) и оптимальным условиям для применения – это зависит от конкретного штамма. Так, активность альфа-амилазы производства Megazyme составляет 50 ед/мг, рабочий оптимум pH=6,5 и температура 40°C. Sigma-Aldrich выпускает фермент с активностью ≥ 250 ед/мл для работы в диапазоне pH 5,5-6,5 (оптимум 5,9) при температурах 70-90 °C. Один из отечественных штаммов ВКПМ В-10291 обладает активностью 900 едГОСТ/мл [21].

Амилолизин

Амилолизин относится к группе так называемых лантибиотиков (lantibiotics). Лантибиотики – это небольшие по размеру термостабильные пептиды, содержащие характеристические аминокислотные остатки с серой- лантотионин (димер цистеина с серой) и метил-тионин. Лантибиотики способны избирательно ингибировать рост некоторых грамм-положительных бактерий патогенной микрофлоры - листерий (*Listeria monocytogenes*), стафилококков (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*).

До сих пор лантибиотики выделяли в основном из лактобактерий. *B. amyloliquefaciens* является новым альтернативным продуцентом этих полезных пептидов. В частности, недавно открытый пептид амилолизин, получаемый из них, показал высокую ингибиторную активность в отношении грамм-положительных патогенных бактерий, включая даже устойчивые к метициллину *S. aureus* и листерий. Кластер генов, отвечающих за кодирование структуры амилолизина, модификации, синтез и транспорт готового пептида, а также регуляторные последовательности, уже хорошо теоретически и экспериментально охарактеризован методами секвенирования ДНК, кластерного анализа и ПЦР [15, 16]. Ингибиторная активность амилолизина из *B. amyloliquefaciens* в отношении указанных видов патогенов экспериментально показана в том числе и для цыплят-бройлеров [7].

Субтилизин

B. amyloliquefaciens продуцируют субтилизин – фибринолитический фермент. Субтилизин – это протеаза серинового класса, используется в кормах с/х животных и птицы как самостоятельно, так и в составе комплексных ферментных препаратов, например, ТехноЗим РХР производства «Biochem», Германия.

Субтилизин из *B. amyloliquefaciens* выделен, клонирован и экспериментально охарактеризован по своим генетическим, морфологическим и физико-химическим свойствам и параметрам ферментативной активности. В качестве примера можно привести работы Bott R. et al Wells A J. et al [17,18].

Приведенные примеры - не полный список вырабатываемых *B. amyloliquefaciens* протеаз. Кроме уже перечисленных, из различных штаммов бактерии получают следующие протеазы для коммерческого использования:

Ацетолактитдекарбоксилаза
альфа-амилаза
арил-эстераза
гликозилтрансфераза
арилаза
эндоклюканаза
глутаминаза
гемицеллюлаза
мальтаза
пектиназа
молочная протеаза
сульфгидрилоксидаза
ксиланаза
и другие.

Как правило, те же виды протеаз можно получить и из *B. subtilis*.

2. Фунгицидная активность *B. amyloliquefaciens*

Была показана фунгицидная активность *B. amyloliquefaciens* в отношении некоторых видов грибов- патогенов для с/х растений, животных и человека.

Зеараленон – грибной патоген нестероидного ряда, выделяемого грибами *Fusarium*. Эти грибы могут размножаться в пищевых продуктах и приносить вред сельскому хозяйству, выделяя опасные для человека и с/х животных вещества. В работе Lee A. Et al показана эффективность *B. amyloliquefaciens* против данного вида грибных токсинов [5].

В одной из новых работ (июль 2017) показана эффективность штамма *B. amyloliquefaciens* против *Fusarium graminearum* еще одного патогенного вида грибов, паразитирующего на пшенице и barley. Коммерческий штамм FZB42 выделяет бацитомин D, разрушающий клеточные стенки гриба [6].

B. amyloliquefaciens продуцируют вещество итурин. Итурины – это семейство белков (липопептидов), которые продуцируются бактериями рода *Bacillus* и обладают антигрибковой и хемолитической активностью. Одним из основных продуцентов итуринов является *B.subtilis* – они вырабатывают мукосубтиллин. Итурин из *B. amyloliquefaciens* несколько отличается от того, который вырабатывает *B.subtilis*. Итурин *B. amyloliquefaciens* был выделен, охарактеризован по своей морфологии и свойствам. Было экспериментально показано, что итурин из *B. amyloliquefaciens* проявляет избирательную фунгицидную активность в отношении *Rhizoctonia solani*, а также некоторых других видов грибов [4].

3. Применение *B. amyloliquefaciens* в борьбе с некротическим энтеритом бройлеров

Некротический энтерит бройлеров, вызываемый бактерией *Clostridium perfringens* – распространенное и очень неприятное заболевание бройлеров, которое приводит к большим экономическим потерям в индустрии. Традиционно для борьбы с энтеритами применяют антибиотики. Однако постоянное использование антибиотиков, особенно в повышенной концентрации имеет ряд недостатков – побочные эффекты, такие как дисбактериоз, приводят к ухудшению качества птицы по ряду других показателей, а также снижают экологичность получаемых продуктов. В связи с этим существует острая потребность в разработке эффективной и нетоксичной альтернативы традиционно применяемым для борьбы с энтеритами антибиотикам, что позволит если не исключить полностью необходимость их применения, то уменьшить необходимые количества.

Одним из альтернативных способов борьбы с энтеритом являются пробиотики – то есть микробиотические добавки, которые улучшают состояние кишечной микрофлоры [14].

Эффективность родственного вида - *B. subtilis* - против некротического энтерита бройлеров уже была показана в ряде исследований, в том числе в работе Тео А. У. М. and Тан Н. М., организованной Kemin Industries (Asia) Pvt. Ltd. [12]. Штаммы *B. subtilis* выделяют бактериоцин – именно он обеспечивает противоэнтеритную активность *B. subtilis*. В работе отмечено выраженное противоэнтеритное действие *B. subtilis* – их антикlostридиальная активность. Известно, что *B. amyloliquefaciens* тоже является продуцентом бактериоцина. Противоэнтеритные свойства *B. amyloliquefaciens* изучались в работе А. Jerzele et al впервые [13]. В работе использовали кормовые добавки производства Norel S. A (Испания): BP70 (защищенный концентрат бутирата натрия Экобиол (Eco Biol)), суспензию спор *B. amyloliquefaciens* в концентрации 109 КОЕ/г, 1% эфирные масла (содержат масло имбиря и карвакрол – монотерпеноид, предположительно из орегано – обладает антибактериальными свойствами). Такое сочетание премикса обеспечивало хороший противоэнтеритный эффект.

В этом пилотном исследовании собственной противоэнтеритной активности у *B. Amiloliquefaciens* выявлено не было. Противоэнтеритный эффект обеспечивали бутират и эфирные масла. Добавление к премиксу *B. amyloliquefaciens* значительно улучшало состояние микроворсинок эпителия ЖКТ (увеличение длины ворсинок). То есть это скорее пробиотические свойства. Противоэнтеритные свойства *B. amyloliquefaciens* требуют дальнейшего изучения.

4. *Bacillus amyloliquefaciens* как пробиотик

B. amyloliquefaciens применяют как пробиотик в кормлении с/х животных и птицы, в том числе в кормлении цыплят-бройлеров (как правило в виде высушенных спор бактерий). Эффективность *B. amyloliquefaciens* как пробиотика подтверждена в том числе и результатами экспериментальных работ.

Так, в работе Sonya Ahmed et al, 2014 изучали влияние *B. amyloliquefaciens* в качестве кормовой добавки (пробиотика) на показатели роста, параметры кишечной микрофлоры и помета у цыплят-бройлеров [8]. 400 1-дневных цыплят бройлеров кросса Росс 308 были поделены на 5 экспериментальных групп. В этих группах птицы получали с кормом разное количество пробиотика – по 0, 1, 5, 10 и 20 г/кг корма. Было показано, что в целом введение в рацион *B. amyloliquefaciens* улучшает показатели цыплят. Однако при увеличении дозировки ведет к проблемам с выделением NH_3 и H_2S с пометом, при этом наблюдается угнетение активности и снижение популяции *E. coli*. По результатам эксперимента, оптимальное содержание *B. amyloliquefaciens* составляет 5 г/кг корма.

В другом эксперименте, проведенном в 2014 году группой Lei et al эффект применения *B. amyloliquefaciens* как пробиотика изучали на кроссе бройлеров Arbor Acres [9]. У птиц оценивали ростовые показатели, переваримость питательных компонентов, состояние кишечной микрофлоры и морфологию кишечника. Всего в эксперименте было 4 группы цыплят: отрицательный контроль (без пробиотиков), положительный контроль (стандартный пробиотик - бацитрацин) и 2 группы, получавшие *B. amyloliquefaciens*. Одна из групп получала пробиотик *B. amyloliquefaciens* с 1 до 21 день, а затем стандартный бацитрацин, другая группа получала в начале бацитрацин (1-21 день), а затем пробиотик *B. amyloliquefaciens* (22-42 день). В приведенной рецептуре пробиотик добавляли в количестве 200 мг/кг корма. Результаты эксперимента показали, что добавление *Bacillus amyloliquefaciens* к корму увеличивает переваримость корма, улучшает состояние кишечной микрофлоры и ростовые показатели цыплят.

В еще одной работе той же группы ученых 2015 года эффективность *B. amyloliquefaciens* как пробиотика и альтернативы стандартным кормовым антибиотикам получила последующее подтверждение [10]. Всего в эксперимент было взято 288 цыплят кросса Arbor Acres и распределено по 4 экспериментальным группам. Группа 1 (контроль) получала рацион установленного состава без добавления антибиотика/пробиотика. Группа

2 в качестве добавки получала виргиномицин (антибиотик стимулятор роста) по 15 мг/кг кормосмеси. Группа 3 и 4 получали пробиотик *B. amyloliquefaciens*, соответственно, по 30 и 60 мг/кг кормосмеси.

Измерение параметров проводили на 21-й и 42-й день. На стартерной фазе (к 21 дню) бройлеры показали улучшенную конверсию корма по сравнению с контролем ($p < 0,01$). При подсчете показателей за весь период (1-42 день), как ростовые показатели, так и конверсия корма были лучше в группах, получавших пробиотик *B. amyloliquefaciens*, по сравнению с группой, получавшей антибиотик, и контролем ($p < 0,05$). В группах, получавших пробиотик, морфологические показатели кишечника были существенно лучше по сравнению с контролем: длина ворсинок кишечного эпителия, глубина крипт и соотношение длины ворсинок к глубине крипт были значительно выше ($p < 0,05$). Также при добавлении пробиотика у цыплят возрастала численность популяции полезных лактобактерий (*Lactobacillus*), по сравнению с группой, получавшей антибиотика, и контрольной ($p < 0,01$). На основании полученных результатов авторы рекомендуют *Bacillus amyloliquefaciens* как хорошую альтернативу синтетических антибиотиков-стимуляторов роста.

B. amyloliquefaciens - полезный в производстве и сельском хозяйстве бактерия-полипродуцент, вырабатывает целый ряд ценных веществ для кормовой индустрии, в том числе птицеводческой отрасли (итурин, альфа-амилаза, субтилизин, фитаза [11]) и обладает доказанными бактерицидными, фунгицидными свойствами, источник протеолитических ферментов, натуральный стимулятор роста и пробиотик.

5. Продукты с *B. amyloliquefaciens*

На сегодняшний день на кормовом рынке уже есть ряд продуктов на основе *B. amyloliquefaciens*. Помимо отдельных ферментов (см выше), *B. amyloliquefaciens* входит в состав пробиотиков, комплексных кормовых добавок, выпускаются коммерческие бактериальные штаммы.

Препараты на основе штаммов *B. amyloliquefaciens* рекомендуется использовать в птицеводстве и животноводстве для:

- профилактики и лечения дисбактериозов;
- повышения естественной резистентности организма;
- устранения иммунодефицитных состояний, вызванных инфекционными (вирусы, бактерии, простейшие, внутриклеточные паразиты и грибы) и неинфекционными (некачественные корма, скученное содержание, стресс вследствие несоблюдения температурных режимов содержания) факторами;
- увеличения сохранности поголовья и яйценоскости;
- получения дополнительных привесов бройлеров;
- улучшения показателей конверсии кормов;
- уменьшения времени выращивания птицы;
- улучшения качества мяса и яйца бройлеров.

Пробиотики и препараты на основе *B. amyloliquefaciens* для птицеводства и животноводства производят: компания BioChem (Технозим), BioCat Microbials, Exotic Biosolutions Pvt. Ltd., Rudra Bioventures Pvt. Ltd и другие. Среди препаратов отечественного производства – Ветом 1, Ветом 2, Ветом 3, Ветом 4, Эндоспорин, продукт ООО «ПробиотикПлюс» [21] и другие препараты на основе отечественных штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-10642, *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643 [22].

Препараты *B. amyloliquefaciens* могут быть поли-ферментативными. Так, препарат Технозим содержит не менее 15 ферментных активностей, 5 из которых измерены и зарегистрированы в продукте. Это эндо-1,4-β-ксилаза, эндо-1,3(4)-β-глюканаза, α-амилаза, протеаза (субтилизин) и новая β-фитаза. Кроме этих ферментов, в состав Технозим РХР входят: 1,4-β-глюканаза, β-ксилозидаза, α-L-арабинофуранозидаза, эндо-1,5-α-

арабиназа, ферулоил-эстераза, целлюбиогидролаза/экзо-глюканаза, ксило-глюканаза, β -глюкозидаза, глюкоамилаза, β -манназа, β -маннозидаза, α -галактозидаза [журнал Ценовик, (07)2016].

Литература:

1. F. G. Priest et al - *Bacillus amyloliquefaciens* sp. Nov. Norn. Rev. - International Journal of Systematic Bacteriology - 37(1) - January 1987 - pp. 69-71.
2. Palva I. - Molecular cloning of α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. Subtilis* - GENE - 19(1) - July - August 1982 – pp. 81-87.
3. Alikhajesh J. et al - Structure of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase at high resolution: implications for thermal stability - Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. - February 2010 Feb - 66(2) - pp. 121-129.
4. Yu G. Y. - Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani* - Soil Biology and Biochemistry - 34(7) - July 2002 - pp. 955-963.
5. Lee A. et al - Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic potential – PloS One – August 2017.
6. Qin Gu et al - Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum* – Applied and Environmental Microbiology – July 2017.
7. Halimi B. et al - Antilisterial Activity on Poultry Meat of Amylolysin, a Bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1- Probiotics and Antimicrobial Proteins - 2(2) - June 2010 - pp 120–125.
8. Sonia Ahmed T. et al - Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens - Poultry Science - 93(8) - August 2014 – pp. 1963–1971.
9. Xinjian Lei et al - Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbials and antibiotic on performance, nutrient digestibility, cecal microflora, and intestinal morphology in broiler chickens - The Journal of Applied Poultry Research - 23(3) - September 2014 – pp. 486–493.
10. Xinjian Lei et al - Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens - Asian-Australas J Anim Sci. - February 2015 - 28(2): 239–246.
11. Byung-Chul Oh et al - Calcium-Dependent Catalytic Activity of a Novel Phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 – Biochemistry – 2001 - 40 (32) – pp. 9669–9676.
12. Teo A. Y. M. and Tan H. M. - Inhibition of *Clostridium perfringens* by a Novel Strain of *Bacillus subtilis* Isolated from the Gastrointestinal Tracts of Healthy Chickens - Applied and environmental microbiology – 71(8) - August 2005 - pp. 4185–4190.
13. A. Jerzsele et al - Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers - Poultry Science - 91(4) - April 2012 – pp. 837–843.
14. Caly L. D. et al - Alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiologist's Perspective – Frontiers in Microbiology – December 2015 – 6(1336).
15. Arguelles A. A. et al - Characterization of amylolysin, a novel lantibiotic from *Bacillus amyloliquefaciens* GA - PloS One - December 2013.
16. Arguelles A. A. et al - Amylolysin: A Type-B Lantibiotic Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 - Protein and Peptide Letters - 21 (4) - April 2014.
17. Bott R. et al - The three-dimensional structure of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin at 1.8 Å and an analysis of the structural consequences of peroxide inactivation - The Journal of Biological Chemistry – June 1988 – 263(16) - pp. 7895-7906.
18. Wells A. J. et al - Cloning, sequencing, and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis* – Nucleic Acids Research - 11(22) -1983 – pp. 7911-7925.
19. Маликова Л. А. - Питательная среда для эффективной продукции глутамилэндопептидаз, секретируемых в стационарной фазе роста *bacillus amyloliquefaciens* h2 – Казанский Государственный Университет – 2007.
20. Кулаков Г. В., Ле Хунг Кыонг, Ле Фи Хонг – патент - Штамм *bacillus amyloliquefaciens*, используемый для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных, птицы и рыб -

ООО Пробиотик Плюс, изобретение №0002614858.

21. Яненко А. С. и соавт. – патент - Штамм *bacillus amyloliquefaciens* - продуцент альфа-амилазы *B Amyloliquefaciens* – ФГУП "ГосНИИгенетика - 2012.

22. Леляк А. И., Леляк А. А. – патент - Штаммы бактерий *bacillus subtilis* и *bacillus amyloliquefaciens*, обеспечивающие восстановление микробиоценозов почвы и желудочно-кишечного тракта животных, обладающие бактерицидной, фунгицидной и вирулицидной активностью, и препарат на основе этих штаммов.

**

Помимо перечисленных источников литературы, для подготовки обзора также применялись ресурсные программы NCBI – GenBank, BLAST, Genome.