

УДК 619:579.852.11:616-08

DOI 10.29326/2304-196X-2019-1-28-58-62

КУЛЬТУРАЛЬНО- МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS*

В. С. Русалеев¹, О. В. Прунтова², Д. А. Васильев³¹ Ученый секретарь, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: rusaleev@arriah.ru² Главный эксперт, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: pruntova@arriah.ru³ Заведующий кафедрой, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина», г. Ульяновск, Россия, e-mail: dav_ul@mail.ru

РЕЗЮМЕ

В ветеринарной практике в течение последних 20 лет наблюдают снижение лечебного действия некоторых препаратов на основе живых лакто- и бифидобактерий, что стимулирует ученых к поиску новых микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами. Много исследований в этом плане посвящено *Bacillus subtilis*, которая широко распространена в природе и непатогенна для животных и людей. Представлены результаты изучения биологических свойств и антагонистической активности *Bacillus subtilis*, которое было проведено с целью отработки методических подходов к выявлению штаммов с максимальной антагонистической активностью относительно некоторых видов условно-патогенных микроорганизмов и их дальнейшего использования в качестве пробиотических препаратов. По культурально-морфологическим и биохимическим характеристикам изученные штаммы бактерий соответствовали видовым признакам *Bacillus subtilis* и для белых мышей были непатогенны. Эксперименты показали, что получение споровой биомассы возможно как в жидкой, так и на плотной питательных средах. В методическом плане наработка споровой биомассы в жидкой питательной

среде более предпочтительна. Проведенные исследования выявили неоднородность спор при выходе их из состояния анабиоза, которая зависела от сроков хранения исходных спор посевного материала. Быстрее из состояния анабиоза выходили споровые культуры, хранившиеся до одного года. Установлено, что процесс спорообразования эффективнее проходит в условиях аэрации культуры кислородом, также выявлено стимулирующее влияние культуральной жидкости из лаг-фазы на процесс прорастания спор *Bacillus subtilis*. В результате проведенных экспериментов установлена антагонистическая активность штаммов *Bacillus subtilis* по отношению к кишечной палочке, сальмонеллам и стафилококку. Зона торможения роста этих культур составляла от 15 до 20 мм. Изученные штаммы *Bacillus subtilis* могут быть предложены для использования в качестве пробиотиков.

Ключевые слова: пробиотики, *Bacillus subtilis*, культурально-морфологические свойства, биохимические свойства, спорообразование, антагонистическая активность.

UDC 619:579.852.11:616-08

CULTURAL MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS

V. S. Rusaleev¹, O. V. Pruntova², D. A. Vasilyev³¹ Academic Secretary, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: rusaleev@arriah.ru² Chief Expert, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: pruntova@arriah.ru³ Head of Chair, Doctor of Science (Biology), FSFHE "Ulyanovsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin", Ulyanovsk, Russia, e-mail: dav_ul@mail.ru

SUMMARY

A decrease in therapeutic effect of some live lacto- and bifidobacteria-based drugs for veterinary use has been observed for the last 20 years that urges scientists to search for new microorganisms possessing probiotic properties. Many studies in this field are focused on *Bacillus subtilis* that is widespread in the environment and non-pathogenic for animals and humans. Results of tests of *Bacillus subtilis* for its biological properties and antagonistic activity aimed at optimization of methodical approaches for detection of strain with the highest antagonistic effect on some opportunistic microorganisms and their further use as probiotics are described. Cultural morphological and biochemical characteristics of the tested strains conformed to the species characteristics of *Bacillus subtilis*. Tested strains were non-pathogenic for white mice. Tests showed that spore biomass could be prepared both in liquid and on solid nutrient media. Methodically, spore biomass preparation in

liquid nutrient medium is preferable. The tests showed that spores emerged from anabiosis non-uniformly and it depended on original seed spore storage period. Spore cultures stored less than one year emerged from anabiosis more quickly. It was found that the spores formed more readily when the cultures were aerated with oxygen as well as that lag-phase culture medium had a stimulating effect on *Bacillus subtilis* spore germination. *Bacillus subtilis* strains were found to have antagonistic effect on *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus*. Area of growth inhibition of the said bacteria was 15–20 mm. Tested *Bacillus subtilis* strains could be proposed for use as probiotics.

Key words: probiotics *Bacillus subtilis*, cultural and morphological properties, biochemical properties, spore formation, antagonistic activity.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из проявлений взаимоотношений микроорганизмов в природе является их антагонизм, заключающийся в том, что при совместном развитии бактерии одного вида угнетают жизнедеятельность бактерий другого вида. Данное свойство бактерий получило практическое применение в ветеринарии за счет их использования в качестве пробиотиков.

Необходимо отметить, что широкое использование в ветеринарной и медицинской практике последних десятилетий различных пробиотических препаратов из живых лакто- и бифидобактерий привело к снижению их лечебного действия и подтолкнуло ученых к поиску новых, более эффективных микроорганизмов с пробиотическими свойствами. Одними из наиболее подходящих в этом плане биологических объектов являются некоторые виды спорообразующих бактерий, и в первую очередь *Bacillus subtilis* [2, 3]. В настоящее время на их основе в мире создано более 50 различных споровых пробиотических препаратов. При совместном развитии *Bacillus subtilis* с бактериями других видов антагонистическая активность бацилл определяет выживание микроорганизмов при их взаимодействии в бактериальных ассоциациях. *Bacillus subtilis* образуют антибиотические вещества и за счет этого оказывают бактерицидное и бактериостатическое действие на другие микроорганизмы. Сенная палочка может эффективно подавлять рост различных условно-патогенных бактерий, таких как кишечная палочка, стрептококки, стафилококки и другие. Антагонизм *Bacillus subtilis* в отношении значительного количества микроорганизмов открывает широкие перспективы по созданию на их основе новых лечебно-профилактических препаратов для животных. Следует отметить, что положительные пробиотические качества культур *Bacillus subtilis* свойственны не для каждого штамма [6, 8]. В основу пробиотических препаратов многих торговых марок заложены различные штаммы *Bacillus subtilis*. Механизм пробиотического действия препаратов на основе различных видов бацилл подробно описан в литературе [1, 7].

Целью данной работы было изучение биологических свойств некоторых штаммов *Bacillus subtilis*, их антагонистической активности, процесса спорообразования и получения биомассы спор как один из первых этапов работы по поиску возможного претендента на роль пробиотического препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали штамм *Bacillus subtilis* № 1232, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ им. П. А. Столыпина, а в качестве контрольного служил референтный штамм ATCC 6633.

Питательные среды. В исследовании использовали мясопептонный бульон (МПБ) по ГОСТ 20730-75, жидкую споруляционно-ростовую среду [5], 2%-й мясопептонный агар (МПА), 2%-й картофельно-пептонный агар, среды Гисса, а также деминерализованную воду.

Морфологию и тинкториальные свойства бактерий изучали под микроскопом в фазовом контрасте и путем окраски вегетативных клеток по Граму. Подвижность бактерий определяли методом раздавленной капли, используя 5- и 16–18-часовые бульонные культуры.

Культуральные свойства изучали по характеру роста в жидких и на плотных питательных средах.

Биохимические свойства культур не старше 18–20 ч, выросших на плотной питательной среде и средах Гисса, определяли с помощью систем индикаторных бумажных (СИБ) для идентификации микроорганизмов и бактериологического анализатора VITEK® 2 Compact с использованием идентификационных карт GN и GP, а также карт для выявления антибактериальной чувствительности микроорганизмов.

Посевы бактерий на среды Гисса выдерживали в течение 2 сут при 35–37 °С. Наличие или отсутствие ферментации углеводов определяли по изменению окраски среды.

Гемолитическую активность бактерий изучали на МПА, содержащем 5% свежей дефибрированной крови барана.

Образование индола и сероводорода определяли с помощью индикаторной бумаги, помещенной под пробку пробирки с МПБ.

Редуцицию нитратов выявляли после роста культуры в течение 48 ч на бульоне с нитратами (KNO₃). В каждую пробирку с засеянным нитратным бульоном добавляли по 1 см³ реактива (равная смесь 10%-й химически чистой серной кислоты и раствора из 1%-го растворимого крахмала и 0,5%-го йодистого калия).

Гидролиз казеина изучали на молочном агаре. Культуру засеивали на среду штрихом, инкубировали в термостате при 37 °С, затем наблюдали за появлением прозрачных зон гидролиза.

Гидролиз крахмала исследовали на картофельно-пептонном агаре. Чашки Петри с засеянным агаром через 48 ч инкубирования, проведенного при 37 °С, заливали раствором Люголя. Светлые зоны вокруг посевов свидетельствовали о гидролизе крахмала.

При выращивании бактерий *Bacillus subtilis* в жидкой питательной среде отмечали интенсивность роста и характер помутнения среды.

Контроль чистоты роста осуществляли посредством микроскопии окрашенных мазков. Световую микроскопию мазков, окрашенных по Граму или контрастированных насыщенным спиртовым раствором фуксина (на наличие спор), проводили под микроскопом МБИ-15 при увеличении в 900 раз.

Расчет концентрации жизнеспособных спор проводили по формуле:

$$C = \frac{\bar{N}_n + \bar{N}_{n+1}}{1,1} \times \frac{1}{V} \times 10^n,$$

где C – число жизнеспособных спор в 1 см³ споровой суспензии;

\bar{N}_n – среднее арифметическое число колоний, выросших в чашках при посеве из разведения 10⁻ⁿ;

\bar{N}_{n+1} – среднее арифметическое число колоний, выросших в чашках при посеве из разведения 10⁻⁽ⁿ⁺¹⁾;

1,1 – постоянный коэффициент;

V – объем споровой суспензии, высеваемой на чашки;

10⁻ⁿ – разведение споровой суспензии, используемое при определении количества жизнеспособных спор.

Антагонистическую активность *Bacillus subtilis* оценивали *in vitro* методом агаровых слоев, основанным на диффузии синтезируемых бациллами антимикробных веществ в толщу агаровой среды, содержащей тест-культуру, и подавлении роста последней. В качестве тест-культур служили *Escherichia coli* б/н,

Salmonella cholerae suis штамма № 370, *Staphylococcus aureus* б/н. Для оценки антагонистической активности *Bacillus subtilis* в чашки Петри с 2%-м МПА наслаивали сверху 0,7% МПА. Предварительно этот агар расплавили, охлаждали до 46–48 °С, вносили соответствующую тест-культуру и после перемешивания наносили на 2%-й МПА, равномерно распределяя по поверхности. После 16–18-часового подрачивания при 35–37 °С на поверхность полужидкого агара бактериологической петлей наносили каплю исследуемого штамма *Bacillus subtilis*. Учет результатов осуществляли через 16–18 ч инкубирования при 35–37 °С по размеру зон отсутствия роста тест-культур вокруг исследуемого штамма *Bacillus subtilis*.

Патогенные свойства определяли на беспородных белых мышах массой 16 г, которым внутрибрюшинно вводили по 0,5 см³ бульонной культуры *Bacillus subtilis* с концентрацией $\times 10^9$ клеток в см³. Наблюдение за животными вели в течение 10 сут.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами

по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33216-2014 и ГОСТ 33215-2014, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2012 г. по охране животных, используемых в научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первая серия экспериментов заключалась в определении культурально-морфологических и биохимических свойств *Bacillus subtilis*. Для этого исследуемые штаммы бактерий в объеме 0,1–0,2 см³ засеивали на твердые и в жидкие питательные среды, а также среды Гисса. Посевной материал равномерно распределяли по поверхности МПА путем покачивания, чашки Петри подсушивали 30–40 мин при комнатной температуре, переносили в термостат и инкубировали вверх дном при температуре 35–37 °С в течение 20–24 ч. Посевы в жидкой питательной среде культивировали в этом же режиме.

В посевах на МПБ наблюдали характерный для *Bacillus subtilis* рост культуры, сопровождающийся помутнением среды и образованием трудно разбивающейся пленки серовато-белого цвета на поверхности бульона.

На поверхности МПА после суточной инкубации наблюдали серовато-белые бугристые колонии с неровными краями (рис. 1) вязкой консистенции. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдали грамположительные цепочки и палочки диаметром около 0,6 мкм и длиной 3–5 мкм (рис. 2).

В препаратах, приготовленных по методу раздавленной капли, клетки, благодаря своим жгутикам, были подвижны.

Изучение биохимических свойств исследуемых штаммов показало, что бактерии ферментируют сахарозу, глюкозу, манит, салицин, эскулин, фруктозу и не ферментируют лактозу, мальтозу, рамнозу, дульцит, инозит, сорбит, галактозу, раффинозу.

Бактерии не образуют индол, но образуют сероводород, гидролизуют крахмал, казеин, но не гидролизуют тирозин и не гемолизуют эритроциты барана, редуцируют нитраты и продуцируют каталазу.

Для подтверждения способности изучаемых культур к спорообразованию суточную бульонную культуру в объеме 0,3–0,5 см³ высевали на чашки Петри с картофельно-пептонным агаром, равномерно распределяя посевной материал по поверхности агара путем покачивания. Посевы подсушивали в термостате при 35–37 °С в течение 20–30 мин, переворачивали крышкой вниз и инкубировали в течение 6–7 сут. Выборочная микроскопия мазков из культур, выросших в препарате «раздавленная капля» и контрастированных фуксином (рис. 3), показала наличие спор овальной формы, размером 0,8 \times 0,6 мкм, расположенных в клетке центрально.

Антагонистическую активность бактерий *Bacillus subtilis* исследовали на питательных средах по отношению к *Escherichia coli* б/н, *Salmonella cholerae suis* штамма № 370, *Staphylococcus aureus* б/н. Проведенные опыты показали наличие зон торможения роста использованных тест-культур от 15 до 20 мм.

Исследуемые штаммы *Bacillus subtilis* для белых мышей были непатогенны.



Рис. 1. Морфология колоний *Bacillus subtilis* штамма № 1232 через 24 ч инкубации на МПА ($\times 10$)



Рис. 2. Морфология клеток *Bacillus subtilis* штамма № 1232 через 24 ч инкубации на МПА (окраска по Граму, $\times 900$)

Вторая серия экспериментов была посвящена получению биомассы спор и определению их жизнеспособности. Нарработку биомассы спор проводили как на плотной, так и в жидкой питательной среде.

Для получения спор суточную бульонную культуру *Bacillus subtilis* в объеме 0,3–0,5 см³ засеивали на чашки с картофельно-пептонным агаром. Посевы инкубировали в течение 6–7 сут. Процент спорообразования определяли путем выборочной микроскопии мазков из чашек в препарате «раздавленная капля». При просмотре 3–5 полей зрения мазка и обнаружении не более 15–20 вегетативных форм на 80–100 спор, производили смыв спор с поверхности картофельно-пептонного агара стерильной деминерализованной водой. Лизис остаточных количеств вегетативных клеток *Bacillus subtilis* производили прогреванием споровой суспензии на водяной бане при температуре 80 °С в течение 30–40 мин. Споры дважды отмывали от остатков питательной среды стерильной деминерализованной водой путем центрифугирования в течение 20–30 мин при 4–5 тыс. об/мин и последующего ресуспендирования.

Определение количества жизнеспособных спор проводили на МПА. Для этого расплавленный и охлажденный до температуры 45–50 °С МПА разливали по 15–20 см³ в стерильные чашки Петри. Исследуемую споровую культуру тщательно встряхивали и готовили ее 10-кратные разведения (с 10⁻¹ до 10⁻⁸) на стерильной деминерализованной воде с добавлением Твина-80 (на 100 см³ воды 2 капли Твина). Для каждого разведения использовали отдельную пипетку. Разведения выдерживали при комнатной температуре в течение 15–20 мин.

После тщательного перемешивания из двух последних разведений споровой суспензии (10⁻⁷ и 10⁻⁸), начиная с последнего, стерильной микропипеткой делали высевы в чашки Петри с МПА, используя для каждого разведения отдельную пипетку. Из каждого разведения высевы производили на три чашки с МПА, внося в каждую по 0,1 см³ суспензии. После равномерного распределения путем покачивания посевного материала по поверхности МПА чашки Петри подсушивали 30–40 мин при комнатной температуре, переносили в термостат, ставя крышкой вниз, и инкубировали в течение 20–24 ч при температуре 35–37 °С.

По истечении указанного времени проводили визуально подсчет колоний, выросших на МПА в каждой чашке Петри, находили среднее арифметическое число колоний каждого разведения споровой суспензии.

При получении биомассы спор *Bacillus subtilis* в жидкой питательной среде культивирование проводили в 2-литровых колбах, содержащих 300 мл жидкой споруляционно-ростовой питательной среды, при 35–37 °С на качалке (120 об/мин). Через 24 ч культивирования споры собирали и отмывали стерильной деминерализованной водой с помощью центрифугирования при 10 000 г 15 мин.

Число жизнеспособных клеток определяли путем подсчета колоний, образовавшихся после посева спор суспензий на МПА.

Микроскопическое исследование процессов прорастания спор культуры *Bacillus subtilis* выявило гетерогенность выхода их из состояния анабиоза. Гетерогенность спор в отношении прорастания менялась в зависимости от сроков хранения исходных спор посевного материала.

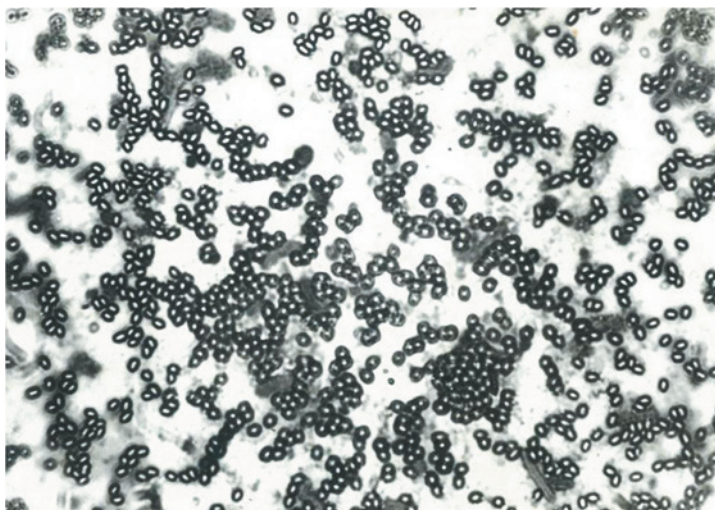


Рис. 3. Спорообразование *Bacillus subtilis* штамма № 1232 через 4 сут инкубации при 35 °С на картофельно-пептонном агаре (контрастирование фуксином, $\times 900$)

ла. Быстрее из состояния анабиоза выходили споровые культуры, хранившиеся до одного года.

Учитывая, что на процесс прорастания спор бацилл существенно влияет количество кислорода в питательной среде [4], во всех сериях экспериментов использовали питательную среду одного и того же состава. Режим культивирования с шутелированием обеспечивал степень аэрации культуры кислородом на 75–85%.

Примененный режим аэрации гарантировал 80–95%-ю инициацию спор через 10 мин с момента их инокулирования в питательную среду. По-видимому, наличие в питательной среде кислорода способствует более быстрому протеканию в спорах процессов, приводящих к выходу из состояния анабиоза.

В заключительной части экспериментов изучали влияние культуральной жидкости на процесс прорастания спор. Культивирование осуществляли в стационарных условиях. Подсчет прорастающих спор в контрольных и опытных пробах проводили через каждые 15 мин с момента их инокулирования в питательную среду. Оценку проводили микроскопическим методом и по изменению оптической плотности. Эксперименты показали, что через 45 мин количество проросших спор увеличилось до 90% в сравнении с 25–30% в контроле. В ходе экспериментов был выявлен стимулирующий эффект культуральной жидкости из лаг-фазы на процесс прорастания. Это же явление наблюдали и при высеве обработанных покоящихся спор *Bacillus subtilis* на плотные питательные среды. При этом отмечали увеличение числа выросших колоний по сравнению с контрольными пробами на 50–60%. По-видимому, в данном случае происходит инициация сверхпокоящихся спор, не прорастающих без предварительной активации.

Полученные результаты согласуются с данными литературы, указывающими на необходимость термоактивации для прорастания части споровой популяции *Bacillus subtilis*, находящихся в состоянии глубокого анабиоза [4].

Можно предположить, что стимуляция проявляется не в сокращении времени основных стадий прорастания, а в увеличении числа вышедших из состояния анабиоза и проросших спор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Штаммы *Bacillus subtilis* № 1232 и ATCC 6633 по культурально-морфологическим и биохимическим признакам соответствуют видовым характеристикам.

Методические подходы, использованные в работе, позволяют получить споры *Bacillus subtilis* как в жидкой, так и на плотной питательной среде.

Изученный штамм № 1232 *Bacillus subtilis* проявлял антагонистическую активность в отношении всех трех видов испытанных бактерий: *Escherichia coli*, *Salmonella cholerae suis* и *Staphylococcus aureus* – и может быть предложен как кандидат для использования в качестве пробиотика.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н. А. Ушакова, Р. В. Некрасов, В. Г. Правдин [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184–192. – URL: <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=29324>.
2. Похиленко В. Д., Перельгин В. В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3 (32–33). – С. 20–41.
3. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н. В. Феоктистова, А. М. Марданова, Г. Ф. Хадиева, М. Р. Шарипова // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2017. – Т. 159, № 1. – С. 85–107.
4. Пронин С. В. Роль молекулярного кислорода и энергетического метаболизма в начале прорастания спор *Bacillus cereus* // Микробиология. – 1987. – Т. 56, № 4. – С. 558–563.
5. Способ изготовления вакцины против сибирской язвы животных: пат. 2095409 Российская Федерация МПК C12N1/20; C12N3/00; A61K39/07; C12N1/20; C12R1:07 / В. А. Гаврилов, Ю. В. Числов, Л. Ф. Николаичук; ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. – № 95111037/13; заявл. 27.06.95; опубл. 10.11.97.
6. Hosoi T., Kiuchi K. Natto – a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto) // Handbook of Fermented Functional Foods / ed. E. R. Farnworth. – Boca Raton: CRC Press, 2003. – P. 227–250.

7. Patel R., DuPont H. L. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics // Clin. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 60, Suppl. 2. – P. S108–S121; DOI: 10.1093/cid/civ177.

8. Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens / K. Bai, Q. Huang, J. Zhang [et al.] // Poult. Sci. – 2017. – Vol. 96 (1). – P. 74–82; DOI: 10.3382/ps/pew246.

REFERENCES

1. New generation of feed probiotics [Novoe pokolenie probioticheskikh preparatov kormovogo naznacheniya]. N. A. Ushakova, R. V. Nekrasov, V. G. Pravdin [et al.]. *Fundamental Research*. 2012; 1: 184–192; URL: <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=29324> (in Russian).
2. Pokhilenko V. D., Perelygin V. V. Spore-forming bacteria-based probiotics and their safety [Probiotiki na osnove sporoobrazuyushchih bakterij i ih bezopasnost']. *Himicheskaya i biologicheskaya bezopasnost'*. 2007; 2–3 (32–33): 20–41 (in Russian).
3. Probiotics based on *Bacillus* spp. bacteria in poultry industry [Probiotiki na osnove bakterij roda *Bacillus* v pticevodstve]. N. V. Feoktistova, A. M. Mardanova, G. F. Khadiyeva, M. R. Sharipova. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*. 2017; 159 (1): 85–107 (in Russian).
4. Pronin S. V. Role of molecular oxygen and energy metabolism at the onset stage of *Bacillus cereus* spore germination [Rol' molekulyarnogo kisloroda i ehnergeticheskogo metabolizma v nachale prorastaniya spor *Bacillus cereus*]. *Microbiology*. 1987; 56 (4): 558–563 (in Russian).
5. Method for preparation of vaccine against anthrax in animals [Sposob izgotovleniya vakciny protiv sibirskoy jazvy zhivotnyh]: pat. 2095409 Russian Federation MПК C12N1/20; C12N3/00; A61K39/07; C12N1/20; C12R1:07. V. A. Gavrilov, Yu. V. Chislov, L. F. Nickolaychuk; SSI "VNIIVViM" of the Russian Agricultural Academy. No. 95111037/13; applic. 27.06.95; published on 10.11.97 (in Russian).
6. Hosoi T., Kiuchi K. Natto – a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). *Handbook of Fermented Functional Foods*. ed. E. R. Farnworth. Boca Raton: CRC Press, 2003: 227–250.
7. Patel R., DuPont H. L. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60 (Suppl. 2): S108–S121; DOI: 10.1093/cid/civ177.
8. Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. K. Bai, Q. Huang, J. Zhang [et al.]. *Poult. Sci.* 2017; 96 (1): 74–82; DOI: 10.3382/ps/pew246.

Поступила 13.12.18
Принята в печать 22.02.19