

## ИНИЦИАЦИЯ ПРОРАСТАНИЯ СПОР *BACILLUS SUBTILIS* УЛЬТРАЗВУКОМ

С. С. Бойко

Научный руководитель: к.б.н., ведущий инженер инжинирингового центра «Промбиотех»

Е.С. Яценко

Алтайский Государственный Университет,

Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, 656049

E-mail: [sv.boyk@mail.ru](mailto:sv.boyk@mail.ru)

## INITIATION OF SPORE GERMINATION OF *BACILLUS SUBTILLIS* ULTRASOUND

S. S. Boyko

Scientific Supervisor: PhD Leading Engineer of Engineering Center “Prombiotech” E.S. Yatsenko

Altay State University,

Russia, Barnaul, Lenin str, 656049

E-mail: [sv.boyk@mail.ru](mailto:sv.boyk@mail.ru)

**Abstract.** Production of probiotics, produced by *Bacillus subtilis*, is popular in agriculture. Relevant studies are enhancing productivity and economic efficiency of the production of biological products. Growth and development acceleration *Bacillus subtilis*, by which probiotics are produced, possibly through physical action. One of the factors that can affect the microorganisms is ultrasound. The aim of the study is to examine the influence of ultrasound on hay bacillus spores. The study found the optimal exposure time ultrasound of a certain frequency in the debates strain *Bacillus subtilis* VKM B-3057 D to reduce the time of spore germination and increase the content of microorganisms during cultivation. The results of research can be used in the preparation of the seed and the control of microorganisms in the production of probiotics, and may be of interest to other researchers involved in the production biologics.

**Введение.** Комплексные кормовые биопрепараты, получаемые на основе *Bacillus subtilis*, являются востребованными продуктами в сельском хозяйстве. Производство таких препаратов не требует применения уникального и дорогостоящего оборудования и может быть осуществлено с использованием комплекса стандартных биотехнологических узлов и блоков. Тем не менее, продолжающееся развитие и интенсификация сельского хозяйства требуют поиска и разработки новых технологических приемов, позволяющих повысить продуктивность и экономическую эффективность производства биопрепаратов [1]. Ускорение роста и развития микроорганизмов возможно не только путем использования специфических биостимуляторов, но и посредством физического воздействия [2]. Одним из факторов, способным влиять на функциональное состояние микроорганизмов, является ультразвук (УЗ). Несмотря на то, что УЗ давно используют в различных отраслях науки, техники, медицины, его влияние на микроорганизмы требует более детального изучения. Ультразвуковые волны обладают большой механической энергией и вызывают ряд физических, химических и биологических явлений. Поэтому не случаен интерес к изучению влияния и механизмам действия этого физического фактора на биологические объекты [3]. Практическое применение УЗ развивается в двух направлениях: применение волн малой интенсивности (низкоэнергетические колебания, не приводящие к необратимым изменениям

в материалах и телах, через которые они распространяются); применение высокоэнергетических колебаний - волн высокой интенсивности для активного воздействия на вещества и изменения их структуры и свойств [4]. Целью данного исследования было изучение влияния ультразвука на споры сенной палочки. Полученные результаты исследования могут быть использованы при получении посевного материала и контроле содержания микроорганизмов в производстве пробиотиков, и могут представлять определенный интерес для других исследователей, занимающихся производством биопрепаратов для сельского хозяйства.

**Материалы и методы.** В качестве исходного штамма использовали штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 Д. Исследуемый биологический препарат представляет собой сухой порошок из лиофильно высушенных бактерий штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 Д. Содержание спор бактерий составляет не менее  $5 \times 10^9$  КОЕ/г. Для выращивания, поддержания и хранения культуры использовали агаризованную среду следующего состава (г/л): агар-агар – 18, дрожжевой экстракт – 5, пептон – 15, хлорид натрия – 5, дистиллированная вода – до 1 л (рН 6,8–7,0). Для культивирования использовали вегетативную среду (г/л): дрожжевой экстракт – 5, пептон – 15, хлорид натрия – 5, дистиллированная вода – до 1 л (рН 6,8–7,0).

**Условия культивирования.** Воздействие ультразвуком на споры проводили при температуре  $32^\circ\text{C}$ , частоте колебаний 37 кГц и мощности 140 Вт. Время воздействия составляло 1, 3, 5, 7, 15, 30 минут. Для каждой экспозиции использовались пробирки микроцентрифужные (Эппендорфа) объемом 1,5 мл, содержащие 0,1 г спор исследуемого штамма. Из обработанных спор готовили споровую суспензию. В колбу Эрленмейера, объемом 50 мл, содержащую 10 мл вегетативной среды, вносили 0,1 г спор. Культуру выращивали в колбах в шейкер-инкубаторе «Innova 44» (New Brunswick Scientific, США) при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 часов [5]. Для выявления результата использовался метод посева на питательные среды (чашечный метод). В качестве контрольной пробы использовали споры штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 Д без воздействия ультразвука. Результаты исследования показали, что способность микроорганизмов к размножению при посеве их на твердые питательные среды сразу после обработки ультразвуком при малом времени озвучивания усиливается (рис.1).

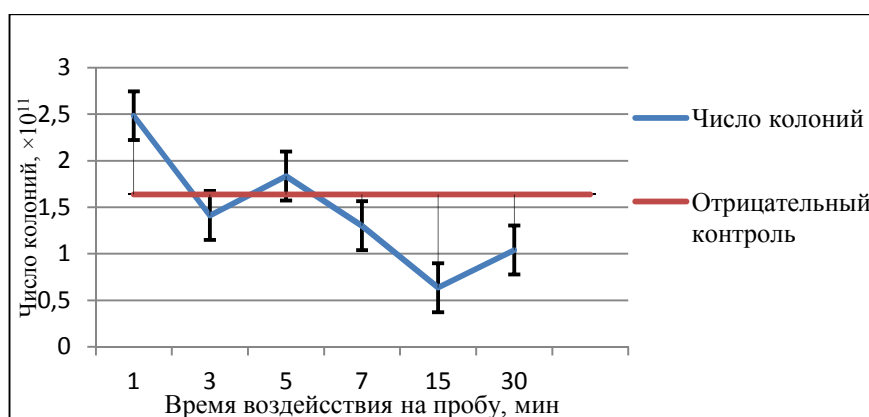


Рис. 1. Изменение численности микроорганизмов в процессе культивирования после воздействия ультразвуком

Согласно полученным данным, экспозиция в течение 1 минуты оказалась максимально эффективной, поскольку содержание микроорганизмов после культивирования составило в среднем  $2,5 \times 10^{11}$  КОЕ/г, что достоверно больше отрицательного контроля на 40 %. Основываясь на этих данных, в дальнейшей работе использовали время экспозиции равное 1 мин.

При оценке влияния ультразвукового воздействия на прорастание спор были взяты споры, обработанные УЗ в течение одной минуты при частоте 37 кГц. Использовались пробирки микроцентрифужные (Эппендорфа) объемом 1,5 мл, содержащие 0,1 г спор исследуемого штамма. Из обработанных спор готовили споровую суспензию. В колбу Эрленмейера, объемом 50 мл, содержащую 10 мл вегетативной среды, вносили 0,1 г спор. Культуру выращивали в колбах в шейкер-инкубаторе «Innova 44» (New Brunswick Scientific, США) при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37°C в течение 2 часов. Для оценки результатов использовался метод «раздавленной» капли. Для этого на предметное стекло наносилась капля культуры, накрывалась покровным стеклом [10]. Микроскопировался препарат с объективом 100X. Микроскопирование производилось каждые 15 минут с момента начала культивирования. Был использован бинокулярный микроскоп марки Альтами БИО 7. В ходе исследования было выявлено, что прорастание спор после воздействия ультразвуком происходит в 60-75 минут, у незвученных - 120 минут.

**Вывод.** В результате проведенного исследования установлено, что оптимальное время воздействия ультразвуком на споры штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 Д для уменьшения времени прорастания спор и увеличения содержания микроорганизмов при культивировании составляет 1 минуту при температуре 32°C, частоте колебаний 37 кГц и мощности 140 Вт.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дурникин Д.А., Силантьева М.М., Ерещенко О.В. Перспективы применения ультразвукового мембранного экстрактора в технологии культивирования молочнокислых и пропионовых бактерий // Биологический вестник МДПУ имени Богдана Хмельницкого. – 2016. – №6 (2) – С. 21.
2. Дурникин Д.А., Силантьева М.М., Ерещенко О.В. Стимуляция ультразвуком биомассы молочнокислых и пропионовых бактерий при глубинном культивировании // Биологический вестник МДПУ имени Богдана Хмельницкого. – 2016. - №6 (2) – С.288
3. Антушева Т.И. Некоторые особенности влияния ультразвука на микроорганизмы // Живые и биокосные системы. – 2013. – №4 [Электронный ресурс]. – режим доступа: <http://www.jbks.ru/archive/issue-4/article-11> – 14.03.17
4. Пиротти Е.Л. Действие ультразвуковых колебаний на биологические объекты // Вестник ХНТУСГ, 2012 – 130 [Электронный ресурс]. – режим доступа: [http://www.khntusg.com.ua/files/sbornik/vestnik\\_130/41.pdf](http://www.khntusg.com.ua/files/sbornik/vestnik_130/41.pdf) - 14.03.17
5. Савушкин В.А., Джавахия В.В. и др. Разработка высокоактивного штамма-продуцента вирджиномицина и повышение его продуктивности с помощью синтетических абсорбирующих смол // Биологический вестник МДПУ имени Богдана Хмельницкого. – 2016. – №6 (3) – С.198