

УДК 619:616.98-076:579.852

DOI: 10.31073/vet_biotech41-01

БЕЗИМЕННИЙ М.В.*, e-mail: nomax@ukr.net,**ТАРАСОВ О.А.**, канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net,**ГУДЗЬ Н.В.**, канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: gudznataly@gmail.com,**ЗАХАРОВА О.М.**, канд. біол. наук, e-mail: olga_zm@ukr.net*Інститут ветеринарної медицини НААН*

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ГЕРМІНАНТУ НА ПРОРОСТАННЯ СПОР БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

*В статті викладені результати вивчення впливу гермінантів на проростання спор бактерій роду *Bacillus* в дослідях *in vitro*. В результаті проведення досліджень встановлено, що застосування розчину гермінанту специфічно впливає на проростання спор бактерій роду *Bacillus*, при цьому більшість інокульованих спор проростали, утворюючи вегетативні форми бактерій протягом перших двох годин від початку інкубації.*

*Встановлено, що оптимальна температура для росту вегетативних форм бактерій за застосування гермінанту знаходиться в інтервалі 25–35°C, через 48 годин ріст сягав максимальних значень – $8,4 \pm 0,4 \log_{10}$ КУО/см³ (*B. anthracis*) та $7,7 \pm 0,4 \log_{10}$ КУО/см³ (*B. cereus*).*

Отримані результати щодо оцінки впливу гермінанту на проростання спор, будуть використані для створення нових підходів для деконтамінації інфікованих субстратів різного генезу.

Ключові слова: гермінант, бактерії роду *Bacillus*, *B. cereus*, *B. anthracis*, спори.

Вступ. Сибірка є однією з найпоширеніших інфекційних хвороб в світі, яка реєструється на всіх континентах [1]. За опублікованими даними [2], найчастіше спалахи сибірки в Україні реєстрували переважно серед великої рогатої худоби та дрібної рогатої худоби, значно менше в інших видів тварин.

У відповідності до офіційних даних, на території України за період з 1920 по 1970 рр., найбільша кількість неблагополучних пунктів щодо сибірки припадає на Вінницьку (396), Харківську (338), Чернігівську (336), Тернопільську (332), Луганську (275), Полтавську (274), Кіровоградську (267) області [2–3]. На кінець 2021 року, за офіційними даними, на території України було зареєстровано більше 13 тис неблагополучних стосовно сибірки населених пунктів. Зараження сибіркою відбувається переважно через ґрунт [4]. Особливу небезпеку несе інфікований чорнозем та сірі лісові ґрунти. У поширеному в

* Аспірант, науковий керівник – канд. вет. наук **О.А. Тарасов**

Україні чорноземі звичайному проростання спор відбувається протягом перших 24 год, із наступним розмноженням вегетативних форм збудника [3].

Використання гермінантів, тобто речовин, під впливом яких відбувається швидке проростання спор, може сприяти заходам з деконтамінації субстратів, інфікованих спорами бактерій різних видів. Згідно літературних даних, композиції складних гермінантів мають певну специфічність у відношенні до родів і навіть видів бактерій, що за застосування препаратів в мікробіоценозах сприяє селективному проростанню спор певних видів бактерій [5–9].

Застосування гермінантів має також прикладне значення для забезпечення якісної інактивації спор збудника сибірки, оскільки вегетативні форми мають значно нижчу стійкість до умов навколишнього середовища та дезинфікуючих речовин порівняно із споровими формами [10–13].

Таким чином, наукові дослідження, пов'язані із новими підходами до гермінації спор бактерій в різних біологічних субстратах мають важливе значення для проведення заходів із знезараження ґрунтів на територіях, де реєструються місця сибіркових поховань та худобомогильники, та для забезпечення якості дезинфекції на підприємствах з переробки тваринницької продукції [14–16].

Оскільки проблема сибірки в Україні на даний час є актуальною, дослідження щодо гермінації спор бактерій роду *Bacillus* є важливими для створення нових підходів до викорінення збудника сибірки на території України.

Метою роботи було вивчення впливу гермінанту на проростання спор бактерій роду *Bacillus* в дослідах *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень. Для проведення досліджень використовували штами представників роду *Bacillus*, які зберігаються в музеї лабораторії зоонозних інфекцій та оцінки ризиків: вакцинний непатогенний штам *B. anthracis* (UA 07) та *B. cereus* (ATCC 10702). Концентрацію спор визначали бактеріологічним методом (поверхневий посів), використовуючи прямий підрахунок колоній на м'ясо-пептонному агарі (HiMedia, India). Для кількісної оцінки проростання спор використовували спектрофотометр СФ-42, визначаючи щільність суспензії за довжини хвилі $\lambda=600$ нм. При цьому значення 1 оптичної одиниці щільності (OD) суспензії спор відповідало концентрації 5×10^7 КУО. У випадку проростання спор оптична щільність суспензії зменшується, і за різницею показників оптичної щільності відносно початкових значень виначали кількісні показники проростання спор.

Для проведення досліджень готували робочі суспензії спор досліджуваних штамів. Для цього спори центрифугували за 15000 обертів протягом 10 хв за температури 4°C та ресуспендували у 10 мМ Трис-НСІ

буфері (рН 7,5) з 10 мМ NaCl і 0,1% Tween-80, готуючи робоче розведення до концентрації 5×10^7 КУО ($1 \text{ OD}_{600\text{nm}}$) та кожні 30 хв протягом 2 год визначали зміни оптичної щільності, яку виражали у відсотках від стартового значення оптичної щільності.

Спори перед проростанням активували теплом шляхом інкубації у стерильній дистильованій воді при 80°C протягом 30 хв. При цьому руйнувались вегетативні форми бактерій та досягалась чистота експерименту.

Гермінацію індукували шляхом додавання гермінаційної суміші наступного складу: інозин – 0,35 мМоль; L-гістидин – 0,5 мМоль; L-валін – 0,3 мМоль; L-серин – 0,3 мМоль та вода дистильована – до 1 л, яка згідно робочої гіпотези специфічно впливає на проростання спор цільових бактерій. Гермінант додавали в буфер до досягнення концентрації 5,0% у розчині, використовуючи стерильний стоковий розчин, який готували попередньо. Як контрольне середовище використовували 10 мМ Трис-HCl буфер (рН 7,5) з 10 мМ NaCl і 0,1% Tween-80 без додавання гермінанту.

Оцінку проростання проводили шляхом інокуляції кожні 24 год культури кожного тестового мікроорганізму у поживний м'ясо-пептонний агар (МПА) (HiMedia, India).

Для початкового отримання спор, ліофілізовану культуру дослідних штамів інкубували на МПА при 35°C протягом 7 діб. Після інкубації спори змивали з поверхні агару стерильною дистильованою водою і збирали в центрифужну пробірку. Суспензію центрифугували при 15000 об протягом 20 хв і осад тричі відмивали стерильною дистильованою водою. Для руйнування вегетативних клітин суспензію спор піддавали тепловому шоку при температурі 80°C протягом 15 хв. Кількість спор визначали методом підрахунку на чашках із залитим МПА. Готову суспензію спор зберігали в холодильнику за температури $+4^\circ\text{C}$.

Колонії досліджених бактерій роду *Bacillus* підраховували візуально у прохідному світлі. Проростання спор аналізували кожні 24 год протягом 7 днів.

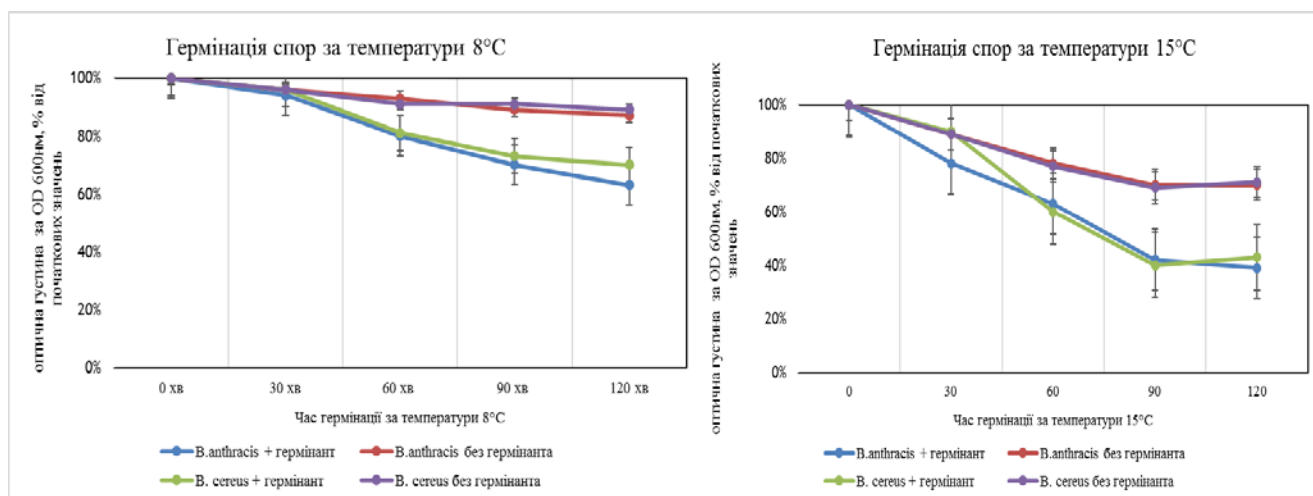
Дослідження проводили за різних температур, передбачених дизайном експерименту для моделювання середніх температур, які може набувати ґрунт за теплої пори року (весна-літо): 8°C , 15°C , 25°C , 35°C .

Результати досліджень та обговорення. В результаті проведення досліджень встановлено, що застосування розчину гермінанту наступного складу: інозин – 0,35 мМоль; L-гістидин – 0,5 мМоль; L-валін – 0,3 мМоль; L-серин – 0,3 мМоль та вода дистильована – до 1 л специфічно впливає на проростання спор бактерій роду *Bacillus* в умовах *in vitro*, при цьому більшість інокульованих спор проростали, утворюючи вегетативні форми бактерій протягом перших двох годин від початку інкубації, що супроводжувалось

зниженням оптичної густини суспензії до $28 \pm 7\%$ (*B. anthracis*) та $25 \pm 8\%$ (*B. cereus*) (рис. 1).

А

В



С

Д

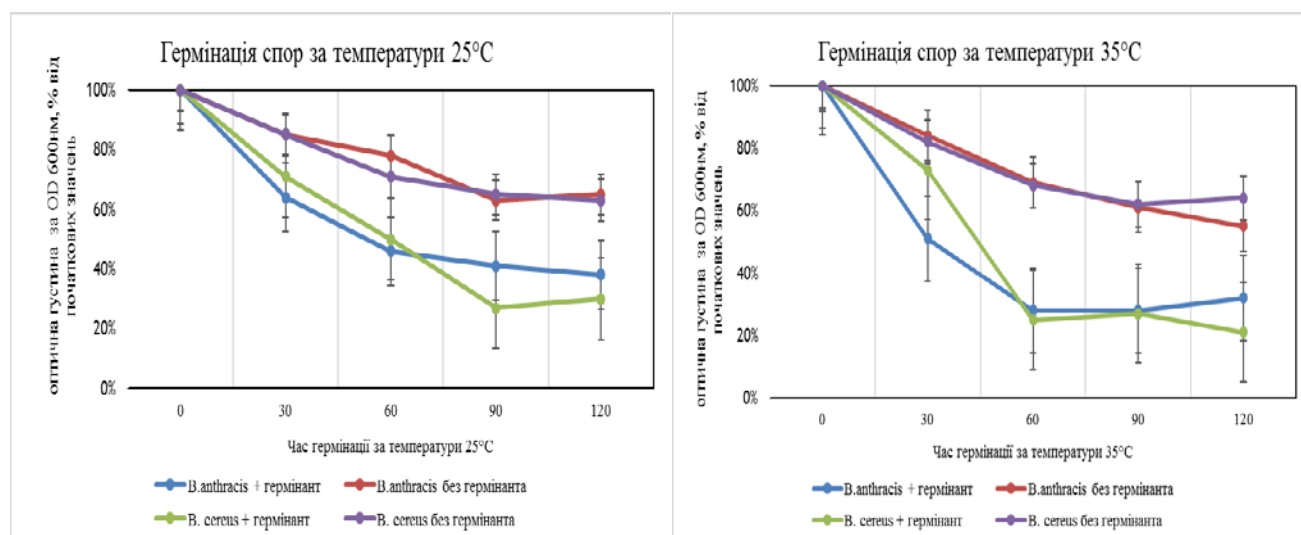


Рис. 1. Гермінація спор *B. cereus* та *B. anthracis* за різних температур інкубування: 8°C (А), 15°C (В), 25°C (С) та 35°C (Д).

Аналіз кінетики гермінацій за досліджуваних температур показав, що проростання спор в поживному середовищі, після обробки сумішню гермінанта, сягала значень $70,2 \pm 3,6\%$ (*B. cereus*) та $63 \pm 7,1\%$ (*B. anthracis*) за температури 8°C; $44,1 \pm 7,2\%$ (*B. cereus*) та $39,5 \pm 5,6\%$ (*B. anthracis*) за температури 15°C; $30,0 \pm 3,5\%$ (*B. cereus*) та $38,7 \pm 7,2\%$ (*B. anthracis*) за температури 25°C; $21,3 \pm 6,0\%$ (*B. cereus*) та $32,8 \pm 4,9\%$ (*B. anthracis*) за температури 35°C. При цьому найбільші показники проростання спор без додавання гермінанту складали від $55,2 \pm 8,2\%$ до $64,0 \pm 5,6\%$ за температури 35°C. За нижчих температур ці значення складали не менше 63–65%, що

практично вдвічі менше, ніж у варіантах із застосуванням гермінанту ($P \leq 0,05$). При цьому оптимальна температура для найшвидшого та максимально повного проростання спор встановлена в межах 25–35°C, а протягом першої години від початку інкубування проростає майже 80% всіх спор та протягом наступної години спостерігається проростання всіх наявних життєздатних спор, що відповідає зменшенню оптичної щільності до 55% та менше.

Також нами встановлено, що відсоток проростаючих спор істотно не зростає в часі після перших 2 год від початку культивування.

Веgetативні форми бактерій, які розмножуються в культуральному середовищі, характеризувались значним ростом та досягненням стаціонарної фази через 48–72 год від початку гермінації. Після досягнення стаціонарної фази та вичерпанням поживних речовин середовища, починається новий етап спорутворення.

Згідно результатів вивчення динаміки росту вегетативних форм бактерій, представлених на рис. 2, за температури 8°C в усіх зразках росту та розмноження вегетативних форм бактерій не спостерігалось, оскільки вбачалось, що ця температура не є оптимальною для розмноження цільових видів бактерій. За культивування при температурі 15°C спостерігався повільний ріст вегетативних форм бактерій із досягненням стаціонарної фази через 72–96 год від початку культивування.

За оптимальної температури 25°C вегетативні клітини проявили швидке збільшення росту протягом перших 24 год до $4,1 \pm 0,3 \log_{10}$ КУО/см³ у *B. anthracis* та $4,5 \pm 0,2 \log_{10}$ КУО/см³ у *B. cereus*, а через 48 год ріст сягав максимальних значень у *B. anthracis* – $8,4 \pm 0,4 \log_{10}$ КУО/см³ та у *B. cereus* – $7,7 \pm 0,4 \log_{10}$ КУО/см³. Протягом наступних 72 та 96 год ріст культури проходив стаціонарну фазу росту.

За температури 35°C вегетативні клітини продемонстрували швидкий ріст уже через 24 год та збільшення кількості вегетативних клітин, яка складала до $6,3 \pm 0,7 \log_{10}$ КУО/см³ у *B. anthracis* та $5,2 \pm 0,3 \log_{10}$ КУО/см³ у *B. cereus*. Через 48 год кількість вегетативних форм бактерій *B. anthracis* досягала $8,8 \pm 0,4 \log_{10}$ КУО/см³ та *B. cereus* – $8,4 \pm 0,7 \log_{10}$ КУО/см³. Після 48 год до 96 год (період спостереження) реєстрували поступове зменшення кількості вегетативних клітин.

За температури 8°C не було виявлено росту вегетативних форм бактерій, але при цьому проростання спор фіксувалось.

За природних умов проростання спор ініціюється наявністю певних речовин, оскільки поживні речовини зв'язуються зі специфічними для спор протеїновими комплексами у внутрішній мембрані. У цьому дослідженні, склад гермінанту, згідно наших даних, за складом амінокислот для індукування

проростання спор бактерій роду *Bacillus*, а саме видів *B. cereus* та *B. anthracis*, був ефективним, що дозволило оцінити перспективи застосування гермінанту за діапазону різних температур, якій відповідає можливого коливанню температур зовнішнього середовища в теплу пору року.

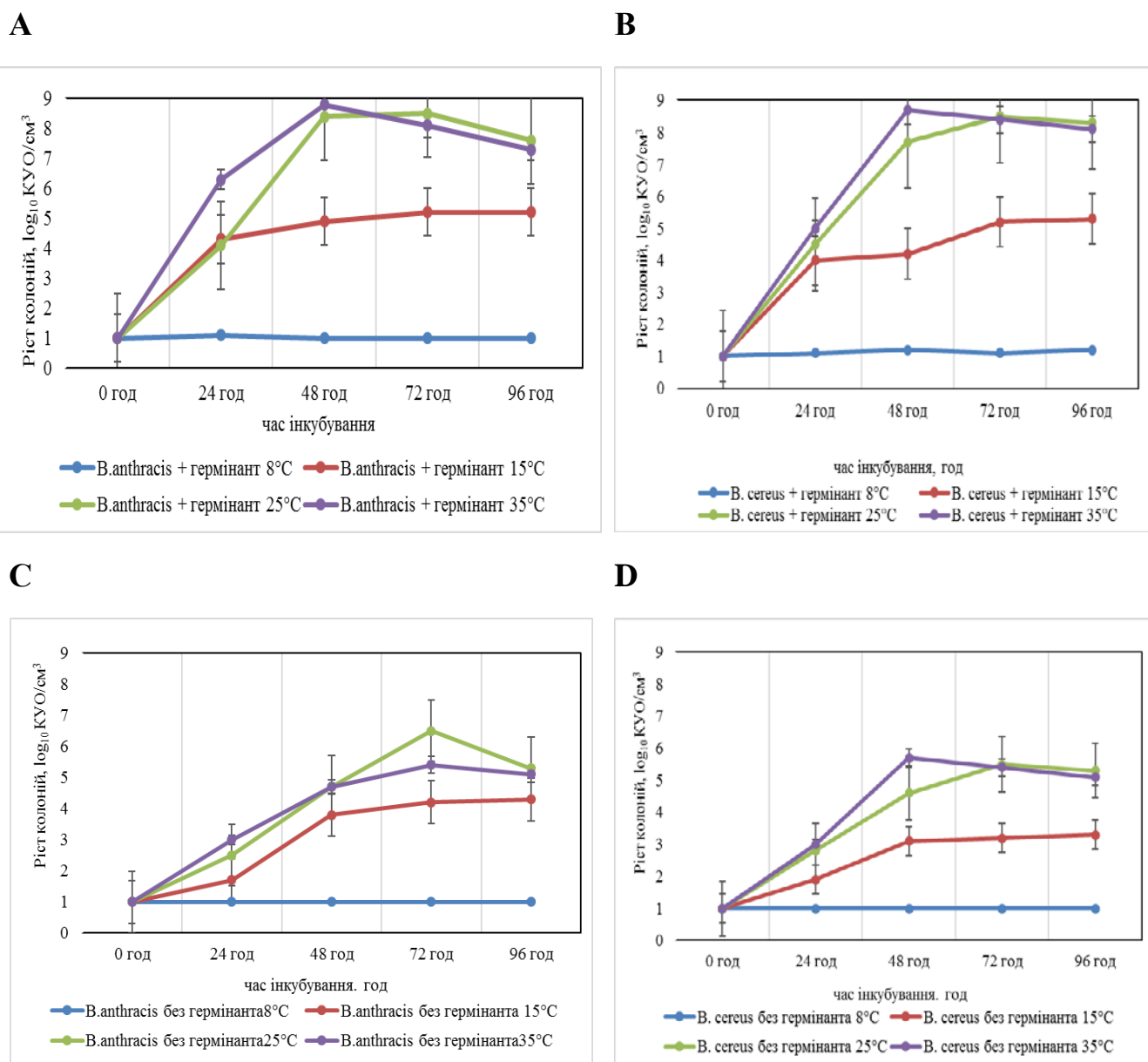


Рис. 2. Динаміка росту колоній *B. anthracis* та *B. cereus* за різних температур з використанням гермінанта (А-В) та без гермінанта (С-Д).

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Проведеними дослідженнями встановлено, що застосування розчину гермінанту такого складу: інозин – 0,35 мМоль; L-гістидин – 0,5 мМоль; L-валін – 0,3 мМоль; L-серин – 0,3 мМоль та вода дистильована – до 1 л специфічно впливає на проростання спор бактерій роду *Bacillus* в умовах *in vitro*, при цьому більшість інокульованих спор проростали протягом перших двох годин від початку інкубації.

2. Встановлено, що оптимальна температура для росту вегетативних форм бактерій за умови застосування гермінанту знаходиться в інтервалі 25–35°C, у проміжок 24–48 год ріст сягав максимальних значень у *B. anthracis* – $8,4 \pm 0,4 \log_{10}$ КУО/см³ та у *B. cereus* – $7,7 \pm 0,4 \log_{10}$ КУО/см³.

Отримані нами результати щодо оцінки впливу гермінанту на проростання спор, будуть використані в ході наступних етапів досліджень з метою створення нових підходів для деконтамінації ґрунтів, заражених спорами бактерій *B. anthracis*.

STUDY OF THE EFFECT OF GERMINANT ON THE GENUS BACILLUS SPORES GERMINATION / Bezymennyi M., Tarasov O., Hudz N., Zakharova O.

Introduction. Anthrax is one of the most common infectious diseases in the world, which is registered on all continents. According to published data, the most often anthrax outbreaks were recorded mainly among cattle, goats and sheep, much less in other animal species. The use of germinants, i.e., substances under the influence of which rapid germination of spores occurs, can contribute to approaches for the decontamination of substrates infected with bacterial spores of various species. According to literature data, the composition of complex germinants has a certain specificity in relation to genera and even species of bacteria, which, when used in microbiocenoses, promotes the selective germination of spores of certain types of bacteria.

The use of germinants is also of practical importance for ensuring the qualitative inactivation of spores of the anthrax pathogen, since vegetative forms have a much lower resistance to environmental conditions and disinfectants compared to spore forms.

The goal of the work was to study the effect of germinant on the spores of bacteria of the genus *Bacillus* germination in vitro experiments.

Materials and methods. We used some strains of representatives of the genus *Bacillus*, which are kept in the Museum of the Laboratory of Zoonotic Infections and Risk Assessment: the non-pathogenic vaccine strain of *B. anthracis* (UA 07) and *B. cereus* (ATCC 10702). Spore concentration was quantified by direct counting of colonies on nutrient meat peptone agar (MPA) (HiMedia, India), which are formed by spore germination. Also, to evaluate spore germination, a SF-42 spectrophotometer was used, which determined the density at a wavelength of $\lambda=600$ nm. The value of 1 optical unit of density (OD) of the spore suspension corresponded to a concentration of 5×10^7 CFU. During spore germination the optical density decreases, so the assessment was carried out based on the decrease in optical density relative to the initial values. Germination was induced by adding a germination mixture of the following composition: inosine – 0.35 mmol; L-histidine – 0.5 mmol; L-valine – 0.3 mmol; L-serine – 0.3 mmol and distilled water – up to 1 liter, which, according to our hypothesis, specifically affects the spores germination of target bacteria. The germinant was added to the buffer to reach the concentration of 5.0% in the solution. A 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) with 10 mM NaCl and 0.1% Tween 80 was used as a control medium.

The research was conducted at different temperatures provided by the design of the experiment to simulate the average temperatures that the soil can acquire during the warm season (spring-summer): 8°C, 15°C, 25°C, 35°C.

Results of research and discussion. The analysis of the kinetics of germination at the studied temperatures showed that the decrease in the optical density of the suspension, which

indicated the germination of spores in the nutrient medium, after treatment with the germinant *B. cereus* mixture reached values of $70.2 \pm 3.6\%$ and *B. anthracis* – $63 \pm 7.1\%$ at a temperature of 8°C ; at 15°C *B. cereus* – $44.1 \pm 7.2\%$ and *B. anthracis* – $39.5 \pm 5.6\%$; at 25°C *B. cereus* – $30.0 \pm 3.5\%$ and *B. anthracis* – $38.7 \pm 7.2\%$; and at 35°C *B. cereus* – $21.3 \pm 6.0\%$ and *B. anthracis* – $32.8 \pm 4.9\%$. At the same time, the highest rates of spores germinated in control media ranged from $55.2 \pm 8.2\%$ to $64.0 \pm 5.6\%$ at a temperature of 35°C . At lower temperatures these values were at least 63–65%, which is almost half compared with germinant usage ($P \leq 0.05$).

Conclusions and prospects for further research:

1. As a result of the research, it was established that the use of a germinant solution with the following composition: inosine – 0.35 mmol; L-histidine – 0.5 mmol; L-valine – 0.3 mmol; L-serine – 0.3 mmol and distilled water – up to 1 L specifically affects the germination of spores of bacteria of the genus *Bacillus* in vitro, while most of the inoculated spores germinated, forming vegetative forms of bacteria within the first two hours.

2. It was established that the optimal temperature for the vegetative forms of bacteria growth using germinant ranged within $25\text{--}35^\circ\text{C}$, after 48 hours the growth reached maximum values in *B. anthracis* – $8.4 \pm 0.4 \log_{10} \text{CFU/cm}^3$ and in *B. cereus* $7.7 \pm 0.4 \log_{10} \text{CFU/cm}^3$.

Obtained results on the evaluation of the effect of germinant on spore germination will be used in the next stages of research to create new approaches for soil decontamination.

Keywords: germinant, bacteria of the genus *Bacillus*, *B. cereus*, *B. anthracis*, spores.

REFERENCES

1. Skrypnyk, V., Koziy, R.V., Skrypnyk, A.V., Rublenko, I.O., Bagamian, K.H., Farlow, J., Nicolish, M.J., Mezhenkiy, A.O., Nevolko, O.M. & Blackburn, J.K. (2014). Anthrax in dogs. *Veterynarna medytsyna Ukrainy – Veterinary medicine of Ukraine*, 1 (215), 14–17 [in Ukrainian].
2. Skrypnyk, V., Golovko, A., Skrypnyk, A. & Rublenko, I. (2014). Dynamics of anthrax cases in Ukraine during 1970–2013. *16th ICID, International journal of infection diseases*. (1–460), 181.
3. Rublenko, I., Skrypnyk, V., Rublenko, N. & Rublenko, S. (2019) Isolating of spores of *Bacillus anthracis* from ground. *CBEP Ukraine Regional One Health Research Symposium and Peer Review Session*, Kyiv, 94.
4. Keim, P., Gruendike, J.M. et al. (2009). The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Molecular aspects of medicine*, 30, 397–405.
5. Ghosh, S. and Setlow, P. (2009). The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 582–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04442.x>.
6. Setlow, P. (2014). Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know. *Journal of Bacteriology*, 196(7), 1297–1305. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-13>.
7. Gayan, E., Alvarez, I., & Condon, S. (2013). Inactivation of bacterial spores by UV-C light. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 19, 140–145.
8. Irene, S.T., Kumaran, S.R. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol. Rep.*, 6, 212–225.
9. Kim, S.S., Kim, S.H., Park, S.H., & Kang, D.H. (2020). Inactivation of *Bacillus cereus* spores on stainless steel by combined superheated steam and UV-C irradiation treatment. *J. Food Prot.*, 83, 13–16.

10. Mendes-Oliveira, G., Jensen, J.L., Keener, K.M., & Campanella, O.H. (2019). Modeling the inactivation of *Bacillus subtilis* spores during cold plasma sterilization. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 52, 334-342.
11. Paredes-Sabja, D., Setlow, P., & Sarker, M.R. (2011). Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanism and proteins involved. *Trends Microbiol.*, 19, 85-94.
12. Park, H.S., Yang, J.W., Choi, H.J., & Kim, K.H.J. (2017). Effective thermal inactivation of the spores of *Bacillus cereus* biofilms using microwave. *Microbiol. Biotechnol.*, 27, 1209-1215.
13. Sandra, R.B.R.S., Luciana, P.S.V., & Carlos, R.S. (2014). Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiol. Res.*, 169, 931-939.
14. Setlow, P. (2014). Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *J. Bacteriol.*, 196, 1297-1305.
15. Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2016). *Bacillus* spores in the food industry: a review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 15, 1139-1148.
16. Zhang, P., Thomas, S.W., Li, Y., & Setlow, P. (2012). Effects of cortex peptidoglycan structure and cortex hydrolysis on the kinetics of Ca²⁺-dipicolinic acid release during *Bacillus subtilis* spore germination. *J. Bacteriol.*, 194, 646-652.