

## ***Geobacillus stearotherophilus* sporų sudygimo stimuliatorių įvertinimas**

**J. Šalomskienė**

*KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; mikrobjs@lmai.lt*

**D. Jurkškaitė**

*KTU Cheminės technologijos fakultetas, Radvilėnų pl. 19, LT-50270 Kaunas; dovjurk@one.lt*

Ištirtas cheminių ir fizikinių veiksnių poveikis *Geobacillus stearotherophilus* sporų sudygimui agarose terpėje.

Tyrimams panaudotos šios cheminės medžiagos: angliavandeniai, aminorūgštys, neorganinės druskos, adenzinas ir lizocimas. Nustatyta, kad tų pačių angliavandenių įvairios koncentracijos terpėje turėjo skirtingą įtaką sporų sudygimui. *G. stearotherophilus* sporų sudygimą skatino 1 % laktozės, 1 % tirpaus krakmolo ir 0,5–1,0 % sacharozės. Įvairios aminorūgštys skirtingai veikė *G. stearotherophilus* sporų sudygimą. Cisteino koncentracijos 0,01–0,2 % neskatinė sporų sudygimo, o 0,03 % DL-arginino koncentracija turėjo didžiausią poveikį. Nustatyta, kad 0,03 % L-alanino ir DL-alanino koncentracijos turėjo skirtingą įtaką sporų sudygimui: 0,03 % L-alaninas sporų išaugimą skatino, o 0,03 % DL-alaninas sporų sudygimui neturėjo įtakos. Ištyrus neorganinių druskų poveikį sporų sudygimui nustatyta, kad sporų išaugimą daugiau negu 50 % lyginant su kontroliniu variantu stimulavo 0,4 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,03–0,05 %  $\text{NaHCO}_3$  bei 0,03 %  $\text{NaNO}_2$ . Nustatyta, kad 0,005–0,04 %  $\text{ZnSO}_4$  ir  $\text{CoSO}_4$  koncentracijos bei 0,01–0,04 %  $\text{MnSO}_4$  ir  $\text{CuSO}_4$  koncentracijos neigiamai veikė *G. stearotherophilus* sporų metabolizmą, ir jos nesudygo. Sporų sudygimui įtakos neturėjo 0,005–0,03 %  $\text{FeSO}_4$  bei 0,01–0,2 %  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ir  $\text{NaCl}$ , nes, įpylus į terpę šių medžiagų, sporų sudygo mažiau lyginant su kontroliniu variantu.

Tiriant fizikinio veiksnio – terminio apdoravimo poveikį *G. stearotherophilus* sporų sudygimui, nustatyta, kad sporų sudygimas yra optimalus, kai sporų suspensija kaitinama 5 min 70 °C temperatūroje, po to atvėsinama ledo vonelėje.

Parinktos medžiagos, skatinančios *G. stearotherophilus* sporų dygimą. Šios medžiagos gali pagraisinti ir pagerinti terpės, naudojamos preparato inhibitoriams piene nustatyti gamyboje, sudėtį.

**Raktažodžiai:** *Geobacillus stearotherophilus*, sporos, cheminiai ir fizikiniai veiksniai, skatintojai, sporų skaičius.

### **Įvadas**

Sporų susidarymas – natūralus fiziologinis procesas, tačiau jis nebūtinai sporinių bakterijų gyvavimo etapas. Sporos yra žymiai atsparesnės negu vegetatyvinės ląstelės aukštai temperatūrai, spinduliuotei, įvairioms cheminėms medžiagoms, išdžiūvimui [1].

Sporos atsparios kai kurių junginių poveikiui dėl dangalų, kurie suformuoja apsauginį barjerą, ir molekules negali prasiskverbti į sporos šerdį. Be to, pati sporos šerdis yra santykinai nepralaidi hidrofiliniams junginiams, bet, pavyzdžiui, suirus dangalams ar pakitus dangalų struktūrai dėl mutacijų, sporos pradeda išskirti proteolitinius fermentus ir sporų peptidoglikanas tampa pralaidus.

Sporų atsparumą karščiui lemia daugelis veiksnių. Susidarant sporoms aukštesnėje

temperatūroje, tos pačios padermės bakterijų sporų atsparumas karščiui būna didesnis. Manoma, kad tai lemia sporų šerdies vandens kiekio sumažėjimas susidarant sporoms aukštesnėje temperatūroje [1]. Mažas vandens kiekis sporos šerdyje lemia didesni sporų atsparumą karščiui, kadangi jis stabilizuoja makromolekulių denatūraciją kartu ribojant molekulių judėjimą [2]. Organinės rūgštys, gliukono-delta-laktonas,  $\text{NaCl}$ , kurio terpėje yra mažiau negu 0,5 mol/l, sumažina sporų atsparumą karščiui [3].

Suteikus sporoms atitinkamą stimulą, jos sudygsta ir suaktyvėja jų metabolitinės reakcijos. Sporų sudygimo aktyvacija įvairioms bakterijoms rūšims šiek tiek skiriasi [1]. Spora suaktyvėja tada, kai ji gauna atitinkamą cheminį signalą. Tam tikros sporogeniškųjų bakterijų rūšys turi specialius receptorių, kurie praneša apie aplinkoje esančius

energijos šaltinius, pvz., L-alaniną, adenziną ir kt. Jungtį su efektoriais aktyvina sporoje esantis autolizinas, pvz., lizocimas, kuris greitai suardo kortekso peptidoglikaną. Daugelis veiksnių skatina sporų sudygimą: pH bei tam tikros cheminės medžiagos, temperatūra, terpės sudėtis, sporų koncentracija. Kaip vyksta skatinimo procesas nėra aišku, tik žinoma, kad kai kurioms bakterijų rūšims šis procesas yra grįžtamas.

Sporų sudygimo skatinimas daugeliui rūšių gali būti sukeltas panaudojus tam tikrus junginius, pvz., nukleozidus, amino rūgštis, cukrus, druskas, dipikolinę rūgštį ir ilgų grandinių alkilaminus. Kai kurių bakterijų rūšių sporos sudygti gali būti skatinamos neorganinėmis druskomis – mangano, geležies, magnio. Tikslus mechanizmas, kodėl šie junginiai skatina sporų sudygimą, nėra aiškus [1]. Efektyviausi sporų sudygimo stimulatoriai – angliavandeniai, amino rūgštys ir neorganiniai jonai. Iš angliavandenių sporų išaugimui būtinausia gliukozė. Tikslus angliavandenių poveikio mechanizmas iki šio laiko nėra tiksliai nustatytas, neaiškus ir dabar. Angliavandenių priedai 0,0083 mol/l fosfatiniame buferyje (pH 7,1) stimuliuoja *Bacillus stearothermophilus* NCA 1518 sporų sudygimą: monosacharidai – 0,001 mol/l ir 0,1 mol/l gliukozės, 0,01 mol/l fruktozės koncentracija; disacharidai – 0,1 mol/l sacharozės koncentracija; polisacharidai – 2 % dekstrino ir 2 % krakmolo koncentracija [4]. Teigiama tirpaus krakmolo įtaka nustatyta ir anksčiau [5].

*Bacillus subtilis* sporų sudygimą geriausiai skatina cheminiai veiksniai – alanino, asparagino, gliukozės, fruktozės ir kalio jonų derinys [6, 7]. Kiti autoriai [8] sporų sudygimui skatinti vartojo 50 mmol/l kalio fosfato buferinį tirpalą (pH 7) su 10 mmol/l L-alanino ar 50 mmol/l kalio fosfato buferinį tirpalą (pH 7) su 10 mmol/l L-asparagino, 10 mmol/l D-gliukozės ir 10 mmol/l D-fruktozės. Neveiklių *B. subtilis* sporų sudygimą gali paskatinti medžiagų apykaitoje nedalyvaujančios medžiagos santykiu 1:1 – kalcio chelatas ir dipikolinė rūgštis (DPR) [9]. Paprastai DPR reikalinga anabiozės būklėje esančių sporų stabilumui, tuo tarpu sporos, kuriose šios rūgštis trūksta, tampa nestabilios ir greitai sudygsta [2]. Atskilus DPR, suyra sporos apvaskalėlis. Vykstant šiam procesui, sporos branduolyje vandens kiekis padidėja iki tokio, koks yra vegetatyvinėje ląstelėje. Tokie pokyčiai pakeičia vidinės priešporės membranos pralaidumą ir dėl to sporos gali sudygti žymiai greičiau [10].

Tyrinėti *B. subtilis* mutantai, kurių sporos specifiškai reaguoja į skatinančius sudygimą agentus. Tokie tyrimai suteikė informacijos apie genų klasę, vadinamą *ger* genais. Šių genų turinčios sporos reaguoja į vieną ar kelias, bet ne į visas sudygimą

skatinančias medžiagas. *Ger* genai yra ekspresuojami formuojantis priešsporei sporų susidarymo metu. Daugelis šių genų buvo klonuoti ir nustatyta jų seka [11]. *Ger* genų produktai gali suformuoti kompleksą vidinėje priešporės membranoje, kuris veikia kaip skatinantis sudygimą baltymas [12], bet tai yra tik spėjamas modelinis variantas [1].

Nustatyta, kad sporų populiacijos sudygimas yra inicijuojamas žymiai greičiau negu pavienių sporų [13]. *Bacillus megaterium* sporos sudygsta greičiau, kuo yra didesnis sporų skaičius 1 ml suspensijos (buvo tirta nuo  $10^3$  iki  $10^8$  KSV/ml) [14], nes stipresnė tarpląstelinė sąveika skatina sudygimą.

Bendras visų rūšių bakterijų sporų sudygimą skatinantis veiksnys yra sporų suspensijos terminis apdorojimas: 10 min 80 °C [15], 30 min 100 °C [16] ar 1 s 115 °C [15].

Nepaisant sporų neaktyvumo, suteikus joms atitinkamą stimulą – dažniausiai į terpę pridėjus maistinių medžiagų – sporos gali sudygti, augti ir vėl daugintis. Sudygusios sporos praranda savo unikalias savybes: išskiria DPR, suyra apvaskalėlis bei smulkūs rūgštyje tirpūs baltymai. Sporos aktyvumą praranda vos sudygusios. Tada egzogeniniais bei endogeniniais junginiais aktyvinami metabolizmo procesai bei inicijuojama makromolekulių sintezė. Sudygusios sporos virsta augančiomis vegetatyvinėmis ląstelėmis.

*Geobacillus stearothermophilus* sporų yra preparatų, skirtų inhibitoriams piene nustatyti, sudėtyje. Sporų sudygimo greitis gali turėti įtakos preparato kokybei.

**Darbo tikslas** – įvertinti *Geobacillus stearothermophilus* B 469 sporų sudygimo cheminius ir fizikinius skatintojus, turint tikslą pagerinti preparato inhibitoriams piene nustatyti sudėtį.

## Tyrimų objektai ir metodai

Tyrimo objektai – *Geobacillus stearothermophilus* sporos, cheminiai ir fizikiniai veiksniai.

Darbas atliktas KTU Maisto instituto Mikrobiologijos laboratorijoje. Tyrimams naudota sporų suspensija ruošta pagal [ST 1195612-99:2000<sup>1</sup> iš *Geobacillus stearothermophilus*<sup>2</sup> B 469 padermės, gautos iš NIZO (Nyderlandai) mėgintuvėliuose ant nuožulniai sustanginto mitybos agaro. Gauta kultūra kilpele perkeliama į naują mėgintuvėlį ir inkubuojama 18 h (63,5±0,5) °C temperatūroje aerobinėmis sąlygomis. Po inkubacijos į mėgintuvėlį

<sup>1</sup>[ST 1195612-99:2000 *Bacillus stearothermophilus* varietas *calidolactis* sporų suspensija. Bendrieji reikalavimai.

<sup>2</sup> Senas pavadinimas *Bacillus stearothermophilus* varietas *calidolactis*.

su šviežia kultūra ant nuožulniai sustanginto agaro įpilama 5 ml fiziologinio tirpalo, ir kultūra suspenduojama kilpele. 0,2 ml suspensijos pipete įpilama į Petri lėkštelę su sporuliacijos terpe ir išskirstoma glaistikliu. Lėkštelės inkubuojamos 18 h ( $63,5 \pm 0,5$ ) °C temperatūroje. Gauta suspensija pasėjama iš naujo, ir ši procedūra kartojama dar kartą, kad kultūra augtų pakankamai gerai. Tada persėjama į daugiau Petri lėkštelių tam, kad būtų gauta pakankamai suspensijos. Po inkubavimo ant kiekvienos lėkštelės užpilama po 10 ml fiziologinio tirpalo ir surenkama visa gauta bakterinė medžiaga nuo visų užsėtų lėkštelių. Sporų suspensija du kartus centrifuguojama nuo 2000 iki 3000 min<sup>-1</sup> greičiu, praplaunant fiziologiniu tirpalu. Gauta sporų suspensija kaitinama (80+1) °C vandens vonelėje 10 min ir atvėsinama. Ruošiami septyni skiediniai, ir 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> bei 10<sup>-7</sup> skiediniai sėjami į lėkšteles su terpe. Inkubuojama nuo 18 iki 24 h ( $63,5 \pm 0,5$ ) °C temperatūroje. Po inkubacijos atrenkamos tinkamos kolonijoms skaičiuoti lėkštelės (t. y., kuriose išaugo nuo 10 iki 300 kolonijų) ir nustatomas kolonijas sudarančių vienetų skaičius 1 ml suspensijos.

Paruošta *G. stearothermophilus* sporų suspensija, kurioje sporų skaičius buvo  $1,3 \cdot 10^6$  KSV/ml. Suspensija buvo išpilstyta į kiuvetes po 1 ml ir laikyta minus 18 °C temperatūroje. Tyrimams 20 °C temperatūros vandens vonelėje buvo atšildomas reikiamas kiekis suspensijos. Išaugusių sporų skaičius nustatytas lėkštelių metodu, sėjant į terpę bendram mikroorganizmų skaičiui nustatyti (angl. PCA – Plate count agar), į kurios sudėtį įeina mielių ekstraktas, gliukozė ir triptonas (pagal LST EN ISO 4833:2003).

Siekiant nustatyti *G. stearothermophilus* sporų sudygimo stimulatorius, sporų sudygimui skatinti buvo naudojamos cheminės medžiagos – neorganinės druskos, amino rūgštys, angliavandeniai, fermentas lizocimas, nukleozidas adozinas ir fizikinis veiksnys – terminis apdorėjimas. Cheminių medžiagų tirpalai buvo ruošiami steriliame distiliuotame vandenyje ir supilti į iki 50–55 °C temperatūros atvėsintą terpę po sterilizavimo. Remiantis literatūros šaltiniais, parinktos tokios medžiagų koncentracijos: angliavandenių 0,1–1,0 %, aminorūgščių 0,01–0,20 %, neorganinių druskų 0,005–0,400 %, lizocimo 5–75 µg/ml, adozino 0,005–0,010 mol/l.

Tiriant karščio įtaką sporų sudygimui, pagaminta sporų suspensija kaitinta 70, 80, 90 ir 100 °C temperatūroje nuo 5 iki 20 min, po to atvėsinta ledo vonelėje ir paruošus skiedinius fiziologiniame tirpale sporos pasėtos į mitybos agarą. Po 18 h inkubacijos 63,5 °C temperatūros termostate apskaičiuotas išaugusių kolonijų skaičius, kuris palygintas su kontroliniu variantu.

## Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Naudojant įvairias chemines medžiagas sporų sudygimui skatinti, tiriamųjų medžiagų skirtingų koncentracijų tirpalai įpilti į ištirpintą po sterilizavimo mitybos terpę sporų skaičiui nustatyti. Sporų skaičius, išaugęs mitybos terpėje be priedų, buvo kontrolinis –  $1,3 \cdot 10^6$  KSV/ml. Dviejų nepriklausomo mikrobiologinio tyrimo rezultatų, gautų taikant tą patį metodą ir ta pačia įranga tiriant tapačius mėginius, absoliutus skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų gali būti didesnis kaip 30 % nuo mažesnio rezultato<sup>3</sup>. Remiantis tuo, buvo laikoma, kad iširtos medžiagos turėjo įtakos sporų išaugimui, kai sporų skaičius buvo didesnis už kontrolinio varianto 50 %.

Įpylus į terpę nuo 0,1 iki 1,0 % koncentracijos angliavandenių ir palyginus išaugusių kolonijų skaičių su kontroliniu, nustatyta, kad sporų sudygimą skatino 1 % laktozės, 1 % tirpaus krakmolo ir daugiau kaip 0,5 % sacharozės, kurių įpylus į terpę sudygo atitinkamai 69, 51 ir 85–131 % sporų daugiau lyginant su kontroliniu. Didinant sacharozės koncentraciją atitinkamai didėjo ir sudygusių sporų skaičius – kai sacharozės koncentracija 0,5, 0,75 ir 1 %, sudygo 85, 115 ir 131 % daugiau sporų lyginant su kontroliniu. Kiti įvairių koncentracijų angliavandeniai neturėjo reikšmingos įtakos sporų sudygimui. Maltozė ir gliukozė nestimulavo *G. stearothermophilus* sporų sudygimo, o 0,5 % ir 1 % maltozės bei 0,5 % gliukozės koncentracija netgi šiek tiek jį stabdė (1 pav.).

Naudojant aminorūgštis sporų sudygimui skatinti, nustatyta, kad cisteinas ir DL-argininas turėjo nedidelę įtaką *G. stearothermophilus* sporų sudygimui. Tuo tarpu 0,2 % DL-alanino ir 0,03, 0,05 bei 0,2 % L-alanino suaktyvino sporų sudygimą daugiau negu 50 %.

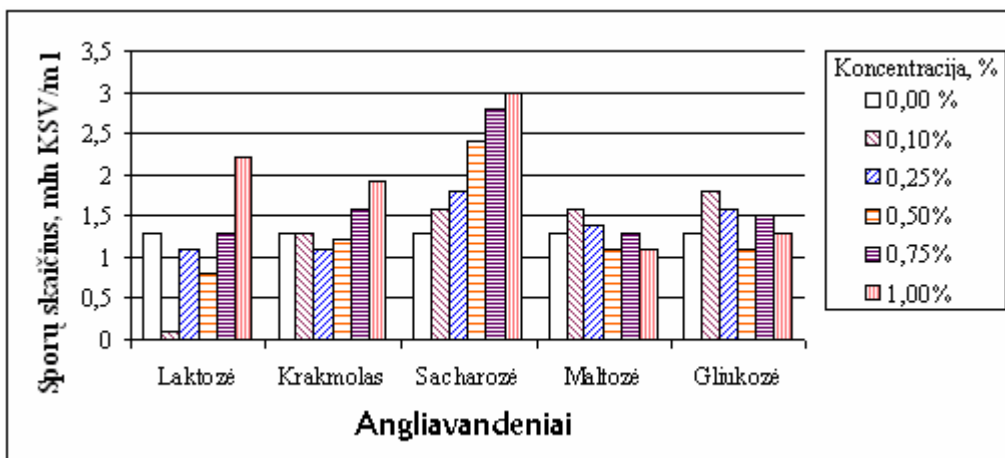
Ta pati DL- ir L-alanino koncentracija skirtingai veikė sporų sudygimą (2 pav.). 0,01, 0,03 ir 0,05 % L-alanino koncentracija labiau skatino sporų sudygimą negu DL-alaninas, išskyrus DL-alanino 0,2 % koncentraciją. Taip yra todėl, kad L-alaninas labiau sąveikauja su sudygusiose sporose esančiais baltymais ir labiau skatina sporų sudygimą agaro terpėje [1].

Ištirta 16 neorganinių druskų įvairių koncentracijų įtaka sporų sudygimo aktyvinimui. Šių medžiagų įtaka *G. stearothermophilus* sporų sudygimui pateikta 3 ir 4 paveiksle. Kadangi sporose yra nemažai protonų, tokių kaip Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> katijonų, kuriems atsiskyrus pirmomis

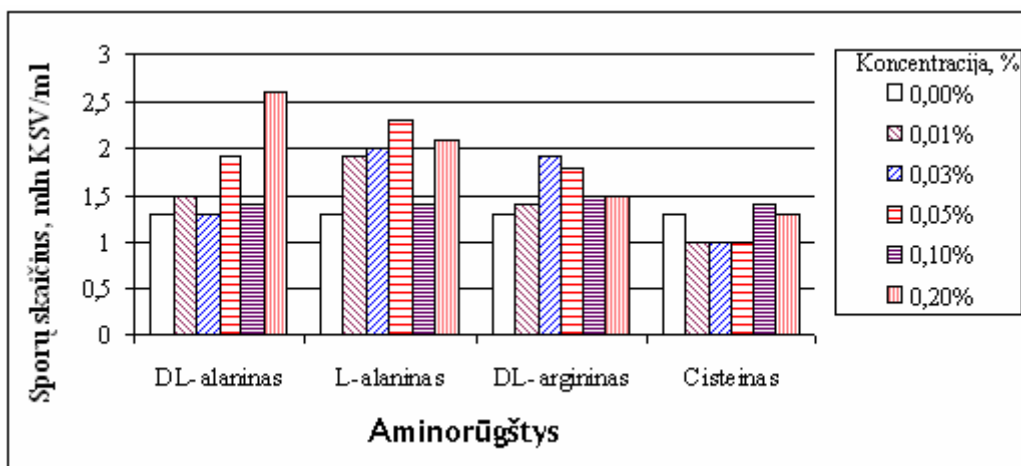
<sup>3</sup> LST ISO 6730:2005 Pienas. Psichrotrofinių mikroorganizmų kolonijas sudarančių vienetų skaičiavimas. Kolonijų skaičiavimo 6,5 °C temperatūroje metodas (tapatus ISO 6730:2005).

minutėmis po sporų sudygimo visiškai suyra sporų peptidoglikanas ir sporos tampa metaboliškai

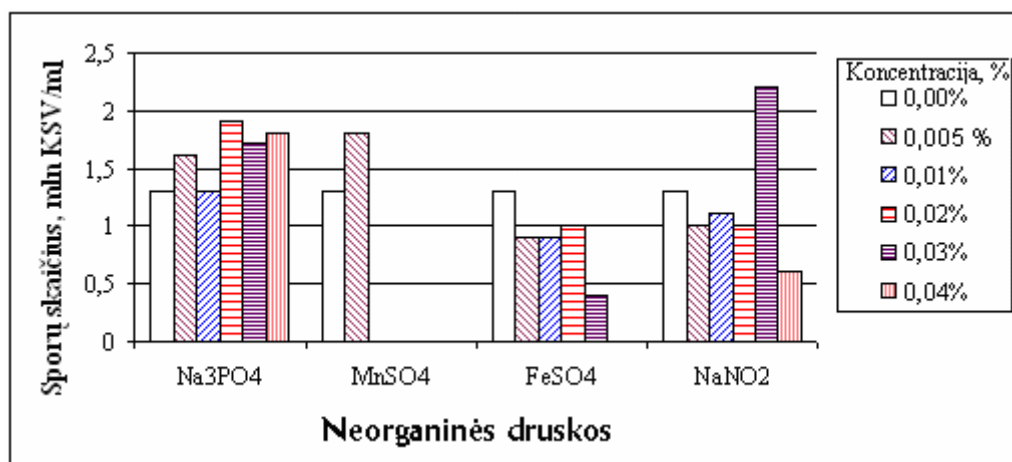
aktyvios, buvo manoma, kad, pridėjus į terpę įvairių druskų, tam tikri jonai suaktyvins sporų sudygimą.



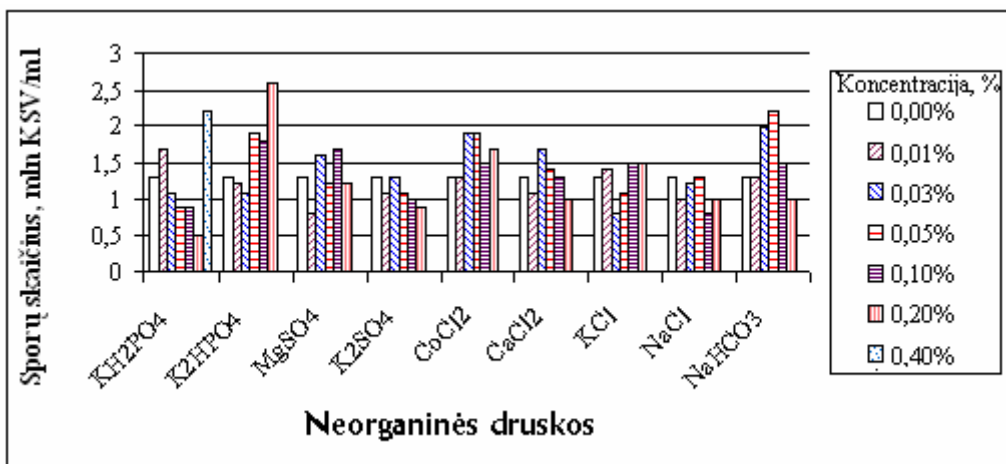
1 pav. Angliavandenių įtaka *G. stearotherophilus* sporų sudygimui



2 pav. Aminorūgščių įtaka *G. stearotherophilus* sporų sudygimui



3 pav. Neorganinių druskų koncentracijos 0,005–0,040 % įtaka *G. stearotherophilus* sporų sudygimui



4 pav. Neorganinių druskų koncentracijos 0,01–0,40 % įtaka *G. stearothermophilus* sporų sudygimui

Į terpę įpylus įvairios koncentracijos fosfatų tirpalų:  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  nustatyta, kad labiausiai sporų sudygimą aktyvina 0,4 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ir 0,2 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , kurių įtaka sporų sudygimui atitinkamai buvo 69 ir 100 %. Kitų koncentracijų  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ir  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  druskų tirpalai arba neturėjo įtakos sporų sudygimui, arba ji buvo labai nedidelė.  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  didžiausia koncentracija, skatinanti sporų sudygimą 46 %, buvo 0,02 %.

Tiriant sulfatų įtaką nustatyta, kad  $\text{ZnSO}_4$  ir  $\text{CoSO}_4$  visiškai inhibuoja sporų sudygimą ir sudygusių sporų ląstelių augimą, nes panaudojus net mažiausią 0,005 % šių druskų koncentraciją, nesudygo nė viena spora.  $\text{MnSO}_4$  ir  $\text{CuSO}_4$  tirpalų koncentracija, didesnė negu 0,01 %, taip pat slopino sporų sudygimą. Gali būti, kad šios medžiagos deaktyvuoja fermentų, „gaminančių“ sudygimo medžiagas, veiklą, todėl sporų sudygimas yra inhibuojamas. Kitų sulfatų vienos koncentracijos skatino sporų sudygimą nežymiai – esant 0,1 %  $\text{MgSO}_4$  ir 0,005 %  $\text{MnSO}_4$  koncentracijai terpėje sudygo atitinkamai 31 ir 38 % sporų daugiau lyginant su kontrole, o kitos koncentracijos neturėjo įtakos – įpylus į agarą terpę įvairių koncentracijų  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  druskų tirpalų, sporų sudygo mažiau lyginant su kontrole (3 ir 4 pav.).

Ištyrus chloridų įtaką sporų sudygimui nustatyta, kad  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  ir  $\text{NaCl}$  neturėjo įtakos – įvairios šių druskų koncentracijos (0,01–0,20 %) neskatinė *G. stearothermophilus* sporų sudygimo daugiau nei 31 % (3b pav.). Sporų sudygimą šiek tiek skatino 0,03 ir 0,05 % koncentracijų  $\text{CoCl}_2$  tirpalai, kurių įpylus į terpę išaugo 46 % daugiau sporų lyginant su kontrole. Tuo tarpu kitos neorganinės druskos –

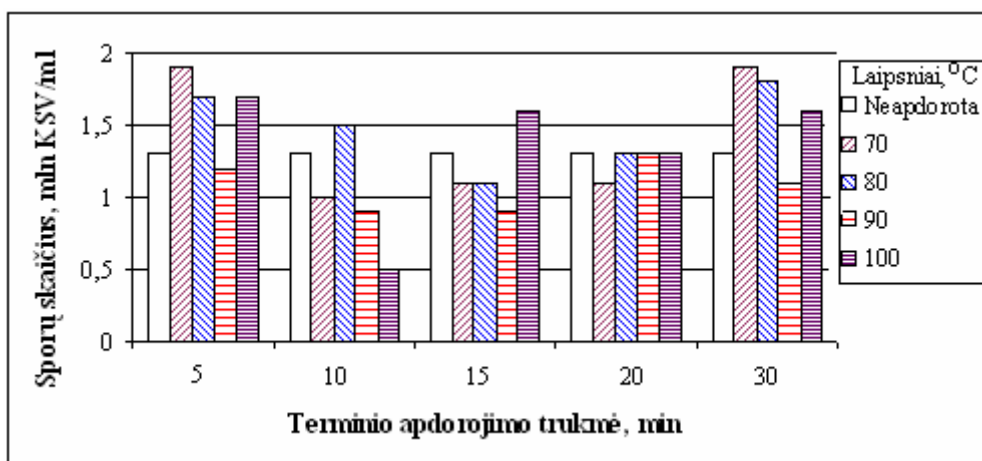
0,05 %  $\text{NaHCO}_3$  ir 0,03 %  $\text{NaNO}_2$  – sporų sudygimą stimuliavo net 69 %, o 0,03 %  $\text{NaHCO}_3$  – 54 % lyginant su kontrole.

Paveikus *G. stearothermophilus* sporas karščiu nustatyta, kad sporų suaktyvinimas įvyko labai greitai ir buvo grįžtamas, todėl esant kai kurioms temperatūroms buvo stebima sporų sudygimo deaktyvacija (4 pav.). Tyrimo rezultatai rodo, kad optimali temperatūra, kuriai esant sudygo daugiausiai sporų, buvo 70 °C, išlaikant sporų suspensiją šioje temperatūroje 5 minutes arba 30 minučių.

*G. stearothermophilus* bakterijų sporų sudygimas taip pat buvo skatinamas į terpę papildomai įpilant lizocimo bei adenozino. Literatūros analizė parodė, kad optimaliausia lizocimo koncentracija, skatinanti sporų sudygimą, yra 50 µg/ml, o adenozino optimali koncentracija – 0,01 mol/l. Skatinant sporų sudygimą šiomis medžiagomis buvo panaudotos ir tarpinės koncentracijos.

Labiausiai sporų sudygimą stimuliavo lizocimo 5 µg/ml tirpalas, t. y. jo įpylus į terpę sudygo 77 % daugiau sporų lyginant su kontrole. 75 µg/ml lizocimo tirpalas turėjo inhibicinį poveikį (1 lentelė).

Įpylus į terpę skirtingų koncentracijų adenozino nustatyta, kad sporų išaugimą 130 % stimuliavo 0,01 mol/l adenozino tirpalas. Sporų sudygimui skatinti naudotos kitos adenozino tirpalų koncentracijos reikšmingos įtakos sporų sudygimui neturėjo (1 lentelė).



4 pav. Temperatūros įtaka *G. stearotherophilus* sporų sudygimui

1 lentelė. Lizocimo ir adenozino įtaka sporų sudygimui agarose terpėje

Terpės priedai	Priedo koncentracija agarose terpėje	Sporų skaičius, mln KSV/ml	Sporų skaičiaus padidėjimas lyginant su kontrole, proc.
Be priedų (kontrolė)	0,0 µg/ml (M)	1,3±0,18	0
Lizocimas	5 µg/ml	2,3±0,06	77
	10 µg/ml	1,5±0,57	15
	25 µg/ml	1,1±0,01	-15 (sumažėjo)
	50 µg/ml	1,2±0,06	-8 (sumažėjo)
Adenozinas	0,005 M	1,6±0,21	23
	0,003 M	1,0±0,01	-38 (sumažėjo)
	0,01 M	3,0±0,01	130
	0,013 M	1,9±0,04	46
	0,02 M	1,8±0,41	38
Lizocimas + adenozinas	5 µg/ml 0,01 M	2,4±0,09	84

Nustačius optimalias *G. stearotherophilus* sporų sudygimą skatinančias adenozino ir lizocimo koncentracijas, buvo pabandyta į terpę su sporomis įpilti 5 µg/ml lizocimo ir 0,01 mol/l adenozino kartu. Nustatyta, kad šios medžiagos sporų sudygimą skatino 84 % lyginant su kontrole ( $1,3 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6$ ).

Adenozinu ir lizocimu buvo bandyta aktyvinti termiškai paveiktų sporų sudygimą. Nustatyta, kad į terpę su 70 °C temperatūroje 5 minutes laikyta sporų suspensija pridėjus 5 µg/ml lizocimo, sporų sudygo 92 % daugiau lyginant su kontrole. 0,01 mol/l adenozino tirpalo poveikis termošoku suaktyvintų sporų sudygimui mažesnis – 85 %, tuo tarpu į terpę įpylus 0,01 mol/l adenozino ir 5 µg/ml lizocimo sporų sudygo 108 % daugiau lyginant su kontrole. Paveikus sporas karščiu, tikriausiai, suaktyvėjo jų metabolinės reakcijos, todėl 0,01 mol/l adenozino ir

5 µg/ml lizocimo tirpalus galima laikyti sporų sudygimo stimulatoriais.

Nustatyta, kad *Geobacillus stearotherophilus* sporų sudygimą geriausiai stimulavo 1 % laktozės, 1 % sacharozės, 0,2 % DL-alanino, 0,4 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 %  $\text{NaHCO}_3$ , 0,03 %  $\text{NaNO}_2$ , 0,2 % L-alanino, 0,02 %  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 0,05 %  $\text{CoCl}_2$ , 0,01 M adenozino ir 5 µg/ml lizocimo. Šios medžiagos gali būti panaudotos preparato inhibitoriams piene nustatyti terpės sudėčiai pagerinti.

#### Išvados

1. *Geobacillus stearotherophilus* sporų sudygimas suintensyvėjo, kai mitybos terpė buvo pagausinta: 1 % laktozės, 1 % tirpaus krakmolo ir 0,5–1 % koncentracija sacharozės, 0,2 % DL-alanino, 0,03–0,05 % L-alanino, 0,4 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,

0,2 %  $K_2HPO_4$ , 0,03–0,05 %  $NaHCO_3$  bei 0,03 %  $NaNO_2$ .

2. *Geobacillus stearothermophilus* sporų sudygimo neveikė tirti sulfatai –  $MgSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $K_2SO_4$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $CoSO_4$ ,  $FeSO_4$  (0,005–0,4 % koncentracijos).
3. *Geobacillus stearothermophilus* sporų sudygimo neveikė arba veikė labai nežymiai tirti chloridai –  $CoCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $KCl$ ,  $NaCl$  (0,005–0,4 % koncentracijos).
4. Sporų sudygimą labiausiai skatino 5  $\mu g/ml$  lizocimo ir 0,01 mol/l adenozino, nes išaugusių sporų skaičius buvo, atitinkamai, 74 ir 130 % didesnis už kontrolę.
5. Termiškai apdorotų sporų sudygimas buvo optimalus, išlaikius sporų suspensiją 5 min 70 °C temperatūroje.
6. Termiškai apdorotų (5 min 70 °C temperatūroje) sporų sudygimą 84 %, lyginant su kontrole, skatino 5  $\mu g/ml$  lizocimo ir 0,01 mol/l adenozino.

#### Literatūra

1. **Setlow Peter, Johnson Eric A.** Spores and their significance. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Ed. by M. P. Doyle, L. R. Beuchat. Washington, 2005. P. 30–49.
2. **Bjorck L.** Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk // J. Dairy Research. 1988. Vol. 45. P. 109–118.
3. **Kotzekidou P.** *Bacillus stearothermophilus*. Encyclopedia of Food Microbiology. Ed. by Richard K. Robinson, Carl A. Batt, Pradip D. Ratel. Vol. 1. Academic Press, 2000. P. 124–126.
4. **Fields M. L., Finely N.** Effects of carbohydrates in phosphate buffer on germination of *Bacillus stearothermophilus* spores // J. of Applied Microbiology. 1963. Vol. 11. P. 453–457.
5. **Mallidis C. G., Scholefield I.** Evaluation of recovery media for heated spores of *Bacillus stearothermophilus* // J. of Applied Bacteriology. 1986. Vol. 61, No. 6. P. 517–523.
6. **Moir A., Smith D. A.** The genetics of bacterial spore germination // Annual Review of Microbiology. 1990. No. 44. P. 531–553.
7. **Moir A., Kemp H. E., Robinson C., Corfe B. M.** The genetic analyses of bacterial spore germination // J. of Applied Bacteriology. 1994. No. 76. P. 9S–16S.
8. **Wuytack E. Y., Soons J., Poschet F., Michiels C. W.** Comparative study of pressure and nutrient-induced germination of *Bacillus subtilis* spores // Applied and Environmental Microbiology. 2000. P. 257–261.
9. **Paidhungat M., Ragkousi K., Setlow P.** Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by  $Ca^{2+}$ -Dipicolinate // J. of Bacteriology. Aug. 2001. P. 4886–4893.
10. **Dills S. S., Vary J. C.** An evaluation of respiration chain-associated function during initiation of germination of *Bacillus megaterium* spores // Biochimica et Biophysica Acta. 1978. Vol. 541, Nr. 3. P. 301–311.
11. **Zuberi A. R., Moir A., Feavers J. M.** The nucleotide sequence and gene organization of the gerA spore germination operon of *Bacillus subtilis* 168 // Gene. 1987. Vol. 162. P. 756–762.
12. **Setlow P.** DNA structure, spore formation and spore properties // Regulation of Bacterial Differentiation. P. J. Piggot (ed), American Society for Microbiology. Washington, 1993. P. 181–194.
13. **Gould G. W.** The Bacterial Spore. Germination. G. W. Gould and A. Hurst (ed). Academic Press, London. 1989. P. 397–444.
14. **Caipo M. L., Duffy S., Zhao L., Schaffner D. W.** *Bacillus megaterium* spore germination is influenced by inoculum size // J. of Applied Microbiology. 2002. Vol. 92. P. 879–884.
15. **Moir A.** Germination properties of a spore coat defective mutant of *Bacillus subtilis* // J. of Bacteriology. 1981. Vol. 146, No. 3. P. 1106–1116.
16. **Beatan C., Pankratz H. S., Gerhardt P.** Heat shock affects permeability and resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores // Applied and Environmental Microbiology. Oct. 1988. P. 2515–2520.

Pateikta spaudai 2006-10

J. Šalomskienė, D. Jurkškaitė

#### EVALUATION OF THE GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS SPORES ACTIVATING AGENTS

#### Summary

The impact of chemical and physical factors on the germination of *Geobacillus stearothermophilus* spores in the agar media was studied.

For this purpose chemical agents such as carbohydrates, amino acids, inorganic salts, adenosine and lysozyme were used. Spore germination differed at various concentrations of the same carbohydrate. *G. stearothermophilus* spore germination was activated by a 1 % lactose, 1 % soluble starch and 0.5–1 % saccharose. Various amino acids differently affected *G. stearothermophilus* spore germination. Cysteine concentrations (0.01–0.2 %) did not affect spore germination, but the spore count at DL-arginine concentrations varying from 0.01 % to 0.2 % was significantly higher. L-alanine (0.03 %) activated germination of *G. stearothermophilus* spores, while DL-alanine (0.03 %) did not have any impact on the spore growth. The effects of inorganic salts showed that spore germination was stimulated more intensively (by 50 %) compared to control medium by adding 0.4 %  $KH_2PO_4$ , 0.2 %  $K_2HPO_4$ , 0.03–0.05 %  $NaHCO_3$  and 0.03 %  $NaNO_2$ . It was found that concentrations of  $ZnSO_4$  and  $CoSO_4$  (0.005–0.04 %, resp.) inhibited metabolic reactions of *G. stearothermophilus* spores and prevented from germination.  $FeSO_4$ ,  $K_2SO_4$  and  $NaCl$  did not have any impact on spore germination because significantly

lower spore counts were obtained on the agar media with these agents than in control medium.

Spore activation was influenced by thermal treatment as a physical factor. It was found that spore germination was optimal when the spore suspension was treated at 70 °C for 5 min and was immediately plunged into an ice bath.

**Keywords:** *Geobacillus stearothermophilus* spores, chemical and physical factors, the activators of spore germination, spore count.

Й. Шаломскене, Д. Юркштайте

## **ОЦЕНКА СТИМУЛЯТОРОВ ПРОРАСТАНИЯ СПОР *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS***

### **Резюме**

В статье представлены данные по изучению влияния химических и физических факторов на прорастание спор *Geobacillus stearothermophilus* в агаризованной среде.

Исследование проведено с использованием следующих химических веществ: углеводов, аминокислот, неорганических солей, аденозина и лизоцима. Установлено, что различные концентрации тех же углеводов в среде оказали различное влияние на прорастание спор. Содержание 1 % лактозы, 1 % растворимого крахмала и 0,5–1,0 % сахарозы стимулировало прорастание спор *G. stearothermophilus*. Различные аминокислоты

оказали неодинаковое влияние на прорастание спор. Цистеин в концентрации 0,01–0,2 % не стимулировал прорастания спор, а содержание 0,03 % DL-аргинина оказало наибольшее влияние на прорастание спор из всех исследованных концентраций. Содержание 0,03 % L-аланина стимулировало прорастание спор, а содержание 0,03 % DL-аланина не оказало влияния на их прорастание. Из неорганических солей более чем на 50 % по сравнению с контролем прорастание спор стимулировало 0,4 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,03–0,05 %  $\text{NaHCO}_3$  и 0,03 %  $\text{NaNO}_2$ . Концентрации 0,005–0,04 %  $\text{ZnSO}_4$  и  $\text{CoSO}_4$ , 0,01–0,04 %  $\text{MnSO}_4$  и  $\text{CuSO}_4$  отрицательно влияли на прорастание спор. На прорастание спор также не оказали влияния концентрации 0,005–0,04 %  $\text{FeSO}_4$  и концентрации 0,01–0,4 %  $\text{K}_2\text{SO}_4$  и  $\text{NaCl}$ , так как при их наличии в среде прорастало меньшее количество спор по сравнению с контролем.

При исследовании воздействия физического фактора – термической обработки – на прорастание спор *G. stearothermophilus* установлено, что прорастание спор являлось оптимальным, когда споровую суспензию прогревали 5 мин при 70 °C, а потом охлаждали в ледяной бане.

Определены наилучшие стимуляторы прорастания спор *G. stearothermophilus*, которые могут быть использованы при улучшении среды препарата для определения ингибирующих веществ в молоке.