

В.С. УСАНОВ, Г.Ю. ШИШКИНА, В.В. ШИШКИН

Влияние концентрации NaCl в соево-кукурузном субстрате на развитие *Bacillus subtilis*

Представлены результаты исследований по определению влияния концентрации NaCl на развитие Bacillus subtilis. Изучена динамика развития биомассы, найден диапазон концентрации соли для последующей его оптимизации с целью накопления и увеличения активности биомассы микроорганизмов в пробиотической кормовой добавке.

Ключевые слова: питательный субстрат, *Bacillus subtilis*, NaCl, давление, развитие.

The effect of NaCl concentration in soybean-corn substrate on the development of microorganisms *Bacillus subtilis*. V.S. USANOV, G.Yu. SHISHKINA, V.V. SHISHKIN (Far Eastern Scientific Research Institute of Mechanization and Electrification of Agriculture, Blagoveshchensk).

The article presents the results of studies to determine the effect of NaCl concentration on the development of microorganisms of Bacillus subtilis. The dynamics of biomass development has been studied and the range of salt concentration has been found for its subsequent optimization with the aim of accumulating and increasing the activity of microorganism biomass in the probiotic feed additive.

Key words: nutrient substrate, *Bacillus subtilis*, NaCl, pressure, development.

Повышение эффективности животноводства предполагает биотехнологическую модернизацию, использование животных с высоким генетическим потенциалом и производство полноценных кормов.

Существующие комплексы технологических и ветеринарно-санитарных приемов при выращивании молодняка не позволяют поддерживать высокий уровень резистентности к инфекциям, вызванным условно патогенной микрофлорой. Применение антибиотиков для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний небезопасно и становится все менее эффективным. Предотвратить развитие многих патологий у животных позволяет использование кормов, обогащенных биологически активными добавками, натуральными продуктами с лекарственными свойствами, минеральными соединениями и витаминами.

С этих позиций как компоненты рационального питания животных, поддерживающие их здоровье и улучшающие качество продукции, безопасной в бактериальном и химическом отношении, следует рассматривать пробиотики [7]. Наблюдается устойчивая тенденция замещения ими антибиотиков, которые наиболее широко применяются в животноводстве с целью профилактики и лечения кишечных инфекций [3]. Идет поиск новых видов микроорганизмов, перспективных для использования в составе пробиотических препаратов, совершенствуется технология их производства, создаются новые биопрепараты оригинального состава.

*УСАНОВ Вячеслав Сергеевич – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, ШИШКИНА Галина Юрьевна – научный сотрудник, ШИШКИН Виктор Вячеславович – кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник (Дальневосточный научно-исследовательский институт механизации и электрификации сельского хозяйства, Благовещенск). *E-mail: usanov-1989@bk.ru

В составе большинства пробиотиков находятся штаммы бактерии *Bacillus subtilis*, которые, в отличие от типичных гнилостных бактерий-аммонификаторов, не разрушают белок до его конечных продуктов, например аммиака, а только пептонизируют его [4], что делает белок более усвояемым для животных. Эти микроорганизмы являются наиболее устойчивыми к действию литических и пищеварительных ферментов и поэтому сохраняют свою жизнеспособность вдоль всего желудочно-кишечного тракта. Они не вырабатывают токсичных компонентов и не проявляют патогенных свойств даже в концентрациях, значительно превышающих рекомендуемые для применения. Их антагонистическая активность ярко выражена и проявляется к более широкому спектру патогенных и условно патогенных бактерий, чем у других представителей нормальной микрофлоры.

Потребности данных микроорганизмов в питательных веществах чрезвычайно разнообразны и определяются особенностями их метаболизма. Питательная среда должна включать доступный для клетки источник энергии. В настоящее время, для большей экономической эффективности, технологии повышения продуктивности бактериальных культур разрабатываются на основе дешевых питательных сред [5]. Эта цель достигается в том числе использованием субстрата на основе зерна сои, при этом микроорганизмы, вероятно, смогут разрушить содержащиеся в сое антипитательные вещества [1]. Соевое молоко используют для кормления молодняка крупного рогатого скота, поскольку спаивание цельного молока не всегда экономически эффективно, а также как белковую добавку к рациону дойных коров [2].

Для роста бактериальной культуры существенное значение имеют не только состав субстрата, но и факторы окружающей среды, например осмотическое давление, определяемое температурой и растворенными веществами, в том числе солями. Большинство микроорганизмов способны развиваться при концентрации растворенных солей до 5 % [6]. Их избыток угнетающе действует на развитие микроорганизмов, что обусловлено не только повышением осмотического давления, но и прямым токсическим воздействием: подавляются процессы дыхания, нарушаются функции клеточных мембран и др.

Поэтому определение влияния концентрации соли в субстрате на основе зерна сои на динамику роста микроорганизмов *Bacillus subtilis* с целью создания пробиотической добавки для сельскохозяйственных животных является актуальным исследованием в области сельскохозяйственной биотехнологии.

Цель нашего исследования заключалась в изучении динамики роста *Bacillus subtilis* в соево-кукурузном субстрате в зависимости от концентрации NaCl для разработки технологии получения пробиотической кормовой добавки для сельскохозяйственных животных.

Материал и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились на базе ФГБНУ ДальНИИ-МЭСХ. Для определения влияния концентрации NaCl (от 1 до 5 %) в субстрате на динамику роста *Bacillus subtilis* была проведена серия из 5 опытов в трех повторностях.

Для приготовления питательного субстрата отдельно пюрировали по 100 г предварительно замоченных на 12 ч соевых бобов и зерен кукурузы. Полученные массы отдельно варили в 1 л воды в течение 20 мин. Бульоны стерилизовали в автоклаве 15 мин при температуре 121 °С. После стерилизации их брали в соотношении 5 : 1 (200 мл соевого молока и 40 мл кукурузного бульона), доводили объем смеси до 500 мл стерилизованной дистиллированной водой, добавляли NaCl. Активную кислотность субстрата приводили к рН 7 с помощью стерильных буферных растворов. В колбы вносили микроорганизмы в количестве 3×10^6 КОЕ. Культивировали при температуре 37 °С.

Пробы для подсчета численности микроорганизмов в микробиологических мазках по методике Виноградского–Брида брали через 4 и 20 ч культивирования. За контроль был принят субстрат без NaCl.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализируя результаты эксперимента, можно сделать вывод, что внесение в субстрат NaCl, при 4-часовом культивировании, положительно повлияло на рост *Bacillus subtilis*, во всех вариантах наблюдали увеличение ее численности по сравнению с контролем: на 899 %, 1918, 44, 22 и 1 % соответственно. При внесении 2 % поваренной соли в питательную среду наблюдали максимальную концентрацию микроорганизмов, дальнейшее увеличение количества NaCl резко замедляло их рост (см. таблицу).

Влияние концентрации поваренной соли на динамику численности клеток *Bacillus subtilis* при культивировании в 0,5 л соево-кукурузного субстрата

Концентрация NaCl, %	Количество микроорганизмов				
	10 ⁵ /мл			% к контролю	
	0 ч	4 ч	20 ч	4 ч	20 ч
0 (контроль)	0,06	2,84 ± 0,218	294 ± 17,8	100	100
1	-«-	28,1 ± 1,76	332 ± 25,0	989	113
2	-«-	59,2 ± 15,8	345 ± 43,4	2018	117
3	-«-	4,09 ± 0,832	280 ± 14,8	144	95
4	-«-	3,47 ± 0,405	234 ± 54,4	122	80
5	-«-	2,87 ± 0,476	147 ± 50,2	101	50

Данный эффект можно объяснить тем, что с увеличением содержания поваренной соли гидростатическое давление в субстрате также увеличивается. Максимальное давление в субстрате, без учета атмосферного, при содержании 2 % NaCl составляло 102,525 кПа. С увеличением времени культивирования до 20 ч активная кислотность субстрата снижается в среднем до pH 5, вследствие чего замедляется рост микроорганизмов во всех опытах по сравнению с контролем. В последующем, при спаивании животным, сильное закисление субстрата может негативно сказаться на их физиологическом состоянии (ацидоз). Для устранения данного эффекта необходимо выравнивать кислотность добавки с помощью буферных растворов или уменьшать время культивирования.

Заключение

Выявлено, что внесение NaCl в соево-кукурузный субстрат положительно влияет на развитие *Bacillus subtilis*. Максимальный эффект наблюдался при внесении в субстрат 2 % поваренной соли. В течение 4 ч культивирования наблюдался резкий скачок численности клеток, в дальнейшем (до 20 ч) начинается замедление процесса, вызванное закислением субстрата. Эти данные следует учесть при разработке технологии получения пробиотической добавки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бенкен И.И., Томилина Т.Б. Антипитательные вещества белковой природы в семенах сои // Науч.-техн. бюл. ВИР. 1985. Вып. 149. С. 3–10.
2. Класнер Г.Г., Горб С.С. Соевое молоко в рационе кормления сельскохозяйственных животных // Новая наука: проблемы и перспективы. 2016. № 79 (5-2). С. 110–112.
3. Кошаев А.Г., Калужный С.А., Мигина Е.И. и др. Технологические аспекты производства и результаты применения кормовой добавки на основе ассоциативной микрофлоры в птицеводстве // Науч. журн. КубГАУ. 2014. № 96 (02). – <http://ej.kubagro.ru/2014/02/pdf/> (дата обращения: 05.04.2019 г.).

4. Победнов Ю.А., Мамаев А.А. Эффективность применения бактерий вида *Bacillus subtilis* при силосовании и сенажировании трав // Вет. патология. 2005. № 1. С. 90–96.
5. Потебня Г.П., Танасиенко О.А., Черемшенко Н.Л. и др. Закономерности биосинтеза цитотоксических лектинов культурой *Bacillus subtilis* В-7025 при выращивании на разных питательных средах // Украин. химиотерапевт. журн. 2002. № 1. С. 54–57.
6. Прунтова О.В., Сахно О.Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии. Владимир: Изд-во ВлГУ, 2005. 76 с.
7. Смолянинов Ю.И., Сутулов Е.М., Белый Д.С. Влияние экспериментальной пробиотической кормовой добавки на молочную продуктивность коров // Достижения науки и техники АПК. 2008. № 11. С. 40–44.