

УДК 579.852.11.24

Н.Ю. Васильєва, Т.В. Гудзенко, М.М. Панченко, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ШТАМУ *BACILLUS THURINGIENSIS* ONU 15

Методом математичного планування експериментів оптимізовано склад поживного середовища для культивування штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15, ентомопатогенного для двокрилих комах-шкідників їстівних грибів. Оптимізація середовища базувалася на плануванні з використанням центрального композиційного ортогонального плану. Параметрами оптимізації слугували загальна чисельність бактерій та спор штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15. В результаті проведених досліджень розроблено поживне середовище (пептон – 7,3 г/л, дріжджовий екстракт – 3,0 г/л, глюкоза – 2,5 г/л, K_2HPO_4 – 5,0 г/л, KH_2PO_4 – 5,0 г/л, Na цитрат – 3,0 г/л, Na_2HPO_4 – 1,5 г/л, $MgSO_4$ – 0,05 г/л, $MnSO_4$ – 0,03 г/л та $CaCl_2$ – 0,05 г/л), на якому кількість бактерій у порівнянні з вихідним середовищем зростає до $184,6 \pm 6,9 \times 10^{10}$ КУО/мл.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, оптимізація складу поживного середовища, центральний композиційний ортогональний експеримент.

Одними з найбільш перспективних напрямків захисту грибів, що культивуються, від комах-шкідників є застосування препаратів на основі ентомопатогенних бактерій [16]. В Одеському національному університеті вперше розроблено технологію культивування комах-шкідників *Bradysia pilistriata*, методику визначення ларвіцидної активності бактерій та отримано штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15 – патогенний для комах родини *Mycetophilidae*, *Sciaridae* та *Culicidae*, зокрема для брадисій – основного шкідника міцелію та плодових тіл їстівних та лікарських грибів [2, 7]. За використання бактерій штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15 в лабораторних умовах гине до 90% личинок комах-шкідників [3].

Для одержання ентомопатогенного препарату постала задача підбору та оптимізації складу поживного середовища для культивування цих бактерій. Використання математичних методів планування і обробки результатів експериментів значно скорочує трудомісткість і тривалість цієї роботи. Планування експерименту дозволяє варіювати одночасно

© Н.Ю. Васильєва, Т.В. Гудзенко, М.М. Панченко, В.О. Іваниця, 2012



важливі фактори і отримувати кількісні оцінки як самих факторів, так і ефектів взаємодії між ними [5, 9].

Метою роботи було створення та оптимізація складу поживного середовища, здатного підвищити загальний урожай бактерій і ендоспор ентомопатогенного штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15, з застосуванням методу математичного планування експерименту на підставі центрального композиційного ортогонального плану.

Матеріали і методи

В роботі використовували штам *Bacillus thuringiensis* ONU 15 ізольований у 2007 році на кафедрі мікробіології і вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова з тіла комахи — мешканця плодового тіла їстівного гриба *Pleurotus ostreatus* [3].

Штам *Bacillus thuringiensis* ONU 15 зберігається в колекції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова та задепоновано в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України як *Bacillus thuringiensis* IMB В-7370.

Культивування здійснювали на шейкері-інкубаторі Innova 43R NewBrunswick у флаконах з 50 мл середовища при 150 об/хв, впродовж 48 год при температурі 30 °С.

Приріст бактерій визначали за зміною показника оптичної щільності на спектрофотометрі Specol-10 (Perkin Elmer USA) при довжині хвилі 540 нм.

Титр клітин визначали методом серійних розведень з подальшим висівом на щільне середовище МПА, титр спор — методом серійних розведень після попередньої термічної обробки культури при 80 °С впродовж 30 хв [4].

Вихідним для проведення оптимізації був склад поживного середовища такого складу (г/л): пептон — 10,0; дріжджовий екстракт — 2,0; глюкоза — 6,0; K_2HPO_4 — 5,0; KH_2PO_4 — 5,0; Na цитрат — 3,0; Na_2HPO_4 — 1,5; $MnSO_4$ — 0,03; $MgSO_4$ — 0,05; $CaCl_2$ — 0,05.

Склад середовища оптимізували за допомогою центрального композиційного ортогонального експерименту [5, 9]. Критеріями оптимізації слугували показники загальної кількості життєздатних клітин і ендоспор [5, 8, 9].

Математичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 2007 і MatLab R2009a.

Результати та їх обговорення

На першому етапі розробки оптимального складу поживного середовища було перевірено вплив джерел енергії та вуглецю і мінеральних компонентів на ріст бактерій штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15.

Виходячи з даних літератури, орієнтувалися на склад середовища, органічна складова якого збалансована за співвідношенням вуглецю та

азоту, що є необхідним для росту культури, оскільки саме ці компоненти впливають, як на конструктивний обмін гетеротрофного мікроорганізму, так і на синтез його ферментів. На думку деяких авторів, саме це визначає найкращий ріст бактерій, що утворюють спори [1, 6]. Внесення глюкози до середовища стимулює спорування і стабілізує стаціонарну фазу росту мікроорганізмів [11].

Для вибору найбільш оптимального складу поживного середовища для росту *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15, визначили показники росту бацил на середовищах з різними комбінаціями джерел енергії та вуглецю (табл. 1).

Таблиця 1

Комбінації джерел енергії та вуглецю в складі середовищ

Table 1

Combinations of the sources of energy and carbon in the experiments

Варіант	Органічний компонент (г/л)				
	пептон	казеїн	дріжджовий екстракт	глюкоза	МПБ
А	5,0	2,5	1,1	1,1	-
Б	5,0	5,0	1,0	5,0	-
Г	10,0	-	2,0	6,0	-
Д	5,0	2,5	1,0	1,0	3,0

До кожного з варіантів досліду додавали комбінацію солей $MgSO_4$ (0,05 г/л), $MnSO_4$ (0,03 г/л) та $CaCl_2$ (0,05 г/л). Ці фактори відносяться до групи мінеральних сполук, які є необхідними для росту бактерій. Марганець є кофактором фосфогліцеролмутази, яка бере участь в процесі спорування [1, 12], а кальцій входить до складу солі діпіколінової кислоти, що є важливим компонентом ендоспор бактерій роду *Bacillus* [1].

Як видно з кривих росту штаму *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15, наведених на рисунку 1, найкращою комбінацією органічних компонентів для цього штаму є варіант Г, який містить пептон, дріжджовий екстракт та глюкозу (табл. 1). У цьому випадку штам раніше виходив на стаціонарну фазу росту (28 год) і досягав максимального показника оптичної щільності. Найбільші показники питомої швидкості росту ($0,19 \text{ год}^{-1}$), загальної кількості життєздатних клітин ($140,6 \pm 15,8 \times 10^{10}$ КУО/мл) та кількості спор ($9,25 \pm 2,6 \times 10^8$ КУО/мл) також реєстрували на цьому варіанті середовища (табл. 2).

Ґрунтуючись на отриманих результатах, для подальшої роботи з оптимізації поживного середовища джерелом енергії та вуглецю вибрали комбінацію з пептону (10,0 г/л), дріжджового екстракту (2,0 г/л) та глюкози (6,0 г/л).



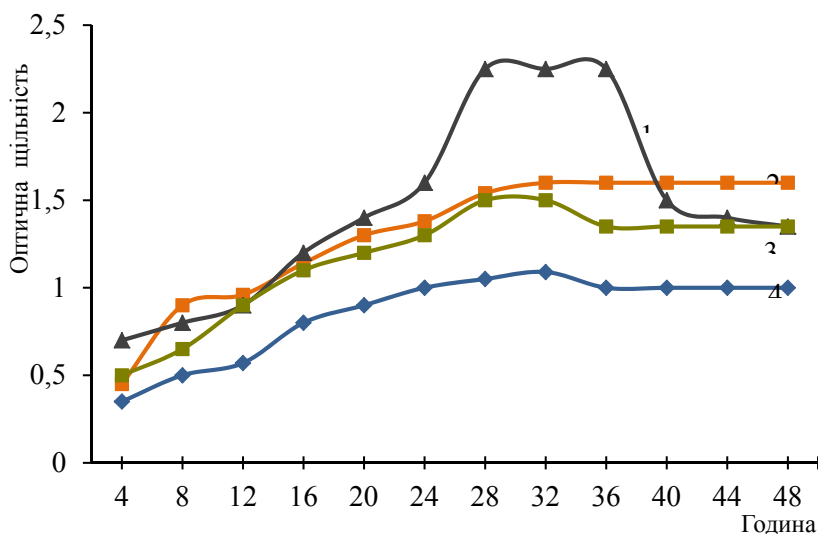


Рис. 1. Криві росту *Bacillus thuringiensis* ONU 15 за різних джерел енергії та вуглецю
1 – варіант А; 2 – варіант Б; 3 – варіант Г; 4 – варіант Д

Fig. 1. The growth curves of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15 at different sources of energy and carbon
1 – variant A; 2 – variant B; 3 – variant Г; 4 – variant Д

Мінеральним фоном обрали середовище Кантвелла (K_2HPO_4 – 5,0 г/л, KH_2PO_4 – 5,0 г/л, Na цитрат – 3,0 г/л, Na_2HPO_4 – 1,5 г/л). Як інший варіант мінерального фону використовували тільки гідроортофосфат калію (K_2HPO_4 – 1,0 г/л). Даний вибір базується на дослідженнях, які були проведені раніше. Також до кожного з варіантів дослідів, як і раніше, додавали комбінацію солей $MgSO_4$, $MnSO_4$ та $CaCl_2$.

Таблиця 2

Показники росту штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15 за різних композицій джерел енергії та вуглецю

Table 2

The growth parameters of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15 at different combinations of sources of energy and carbon

Варіант дослідів	Показник оптичної щільності (D)	Питома швидкість росту (год ⁻¹)	Час подвоєння клітин (год)	Кількість спор/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)	Загальна кількість клітин/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)
А	1,00	0,11	6,30	$8,5 \pm 0,9 \times 10^8$	$1,5 \pm 0,5 \times 10^{10}$
Б	1,60	0,15	4,60	$2,3 \pm 0,1 \times 10^8$	$5,1 \pm 3,1 \times 10^{10}$
В	2,25	0,19	3,64	$9,2 \pm 2,6 \times 10^8$	$140 \pm 15 \times 10^{10}$
Г	1,35	0,12	5,70	$1,6 \pm 0,2 \times 10^8$	$3,0 \pm 0,4 \times 10^{10}$

На рис. 2 наведені криві росту *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 залежно від обраних мінеральних фонів у порівнянні з варіантом без них. Отримані дані повністю співпадають з літературними джерелами і підтверджують, що додавання до комбінації органічних компонентів мінеральних сполук, стабілізує ріст бацилярних штамів та продовжує стадію стаціонарного зростання [1, 6]. Показник загальної кількості клітин, свідчить про те, що мінеральний фон середовища Кантвелла сприяє збільшенню загальної чисельності клітин бактеріального штаму до $156,5 \pm 3,1 \times 10^{10}$ КУО/мл (табл. 3). Однак, показники кількості спор на цьому середовищі були мінімальними ($79,0 \pm 6,5 \times 10^7$ КУО/мл).

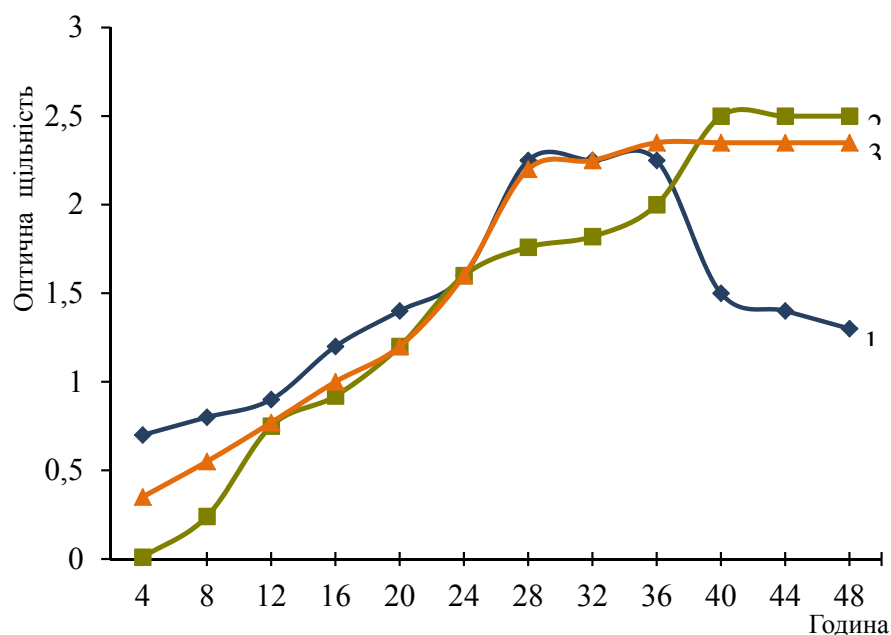


Рис. 2. Криві росту *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 в залежності від мінерального складу середовища

1 — поживне середовище без мінерального фону; 2 — поживне середовище з мінеральним фоном Кантвелла; 3 — поживне середовище с гідроортофосфатом калію

Fig. 2. The growth curves of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15 depending on the mineral composition of medium

1 — culture medium without mineral background; 2 — culture medium with Cantwell's mineral background; 3 — culture medium with potassium hydrogen phosphate

При використанні гідроортофосфату калію як мінерального фону, показано, що цей варіант середовища є найсприятливішим для процесу спороутворення бактеріями *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15. Концентрація спор досягала максимального значення — $81,1 \pm 4,2 \times 10^8$ КУО/мл за максимальної ($0,22 \text{ час}^{-1}$) питомої швидкості росту (табл. 3).



Таблиця 3

Показники росту *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 в залежності від мінерального складу середовища

Table 3

The parameters of growth of strain *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 in depending on various mineral composition

Варіант	Оптична щільність	Питома швидкість росту (год ⁻¹)	Час подвоєння (год)	Кількість спор/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)	Кількість бактерій кл/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)
Середовище без мінерального фону	2,25	0,19	3,64	$9,2 \pm 1,4 \times 10^8$	$140,6 \pm 15,8 \times 10^{10}$
Середовище з мінеральним фоном Кантвелла	2,5	0,2	3,46	$79,0 \pm 6,5 \times 10^7$	$156,5 \pm 3,1 \times 10^{10}$
Середовище з гідроортофосфатом калію	2,35	0,22	3,15	$81,1 \pm 4,2 \times 10^8$	$152,3 \pm 1,8 \times 10^{10}$

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що значимими факторами для збільшення кількості вегетативних бактерій *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 є пептон, дріжджовий екстракт і глюкоза. У подальшій роботі з оптимізації поживного середовища ці компоненти позначатимуться як чинники: x_1 — пептон, x_2 — дріжджовий екстракт, x_3 — глюкоза. Кожен з цих факторів досліджували на трьох рівнях — нижньому, середньому і верхньому (табл. 4) та у «зоряних точках» (табл. 5).

Таблиця 4

Одиниці варіювання (λ) і концентрації компонентів середовищ на нижньому (-1), середньому (0) і верхньому рівнях (+1)

Table 4

Units of variation (λ) and the concentration of media components on the bottom (1), the middle and upper levels (+1)

Компонент середовища	Фактор	Нижній рівень (-1)	Середній рівень (0)	Верхній рівень (+1)	Одиниця варіювання (λ)
Пептон	x_1	5,0	7,5	10,0	2,5
Дріжджовий екстракт	x_2	1,0	3,0	5,0	2,0
Глюкоза	x_3	1	3,5	6,0	2,5

Оптимізацію середовища оцінювали за концентрацією вегетативних клітин (Y1) та спор (Y2) *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15. Грунтуючись на отриманих попередніх даних про вплив мінерального фону, при проведенні

Таблиця 5

Значення факторів матриці планування центрального композиційного ортогонального експерименту

Table 5

The numerical value of factors in the matrix for the central composite orthogonal design

№ досліджу	Рівні факторів											
	x_1	x_2	x_3	x_1^2	x_2^2	x_3^2	$x_1 x_2$	$x_1 x_3$	$x_2 x_3$	$x_1 x_2 x_3$	$x_1^2 x_2$	$x_1^2 x_3$
1	-1	-1	-1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	+1	+1	0	0
2	+1	-1	-1	0,27	0,27	0,27	-1	-1	-1	-1	0	0
3	-1	+1	-1	0,27	0,27	0,27	-1	+1	-1	+1	0	0
4	+1	+1	-1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	-1	-1	0	0
5	-1	-1	+1	0,27	0,27	0,27	+1	-1	+1	-1	0	0
6	+1	-1	+1	0,27	0,27	0,27	-1	-1	+1	+1	0	0
7	-1	+1	+1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	-1	-1	0	0
8	+1	+1	+1	0,27	0,27	0,27	0	0	0	0	0	0
9	-1,21	0	0	0,75	-0,73	-0,73	0	0	0	0	0	0
10	+1,21	0	0	0,75	-0,73	-0,73	0	0	0	0	0	0
11	0	-1,21	0	-0,73	0,75	-0,73	0	0	0	0	0	0
12	0	+1,21	0	-0,73	0,75	-0,73	0	0	0	0	0	0
13	0	0	-1,21	-0,73	-0,73	0,75	0	0	0	0	0	0
14	0	0	+1,21	-0,73	-0,73	0,75	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	-0,73	-0,73	-0,73	0	0	0	0	0	0



оптимізації для першої моделі (Y1) додавали мінеральний фон Кантвелла, а для другої моделі (Y2) додавали гідроортофосфат калію.

Швидкість росту мікроорганізмів під впливом факторів (органічні сполуки) можна представити як залежність вигляду $y = f(x_1, x_2, x_3 \dots x_n)$.

Розробка математичної моделі передбачає принцип від «простого до складного». У вигляді полінома цей принцип означає перехід від полінома першого порядку $y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i \neq j} b_{ij} x_i x_j$ до полінома другого порядку $y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i \neq j} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^n x_i^2$.

Проведення факторного експерименту полягає у визначенні впливу обраного чинника на показник оптимізації. Планування за такою схемою уможливорює реалізацію всіх можливих комбінацій, які наведені у таблиці 5.

Для розрахунку поточної дисперсії ($S_{y_u}^2$) кожен дослід здійснювали у трьох повторях, на основі чого отримували необхідні для 5% рівня значимості результати, за якими визначали дисперсію їх відтворюваності, а з урахуванням критерію Стьюдента — і межу значущості коефіцієнтів регресії.

На підставі коефіцієнтів регресії після проведення центрального композиційного ортогонального експерименту були отримані математичні моделі залежностей загальної кількості клітин *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 (Y1) від концентрацій у середовищі компонентів x_1, x_2, x_3 :

$$Y1 = 1,13 - 0,068x_1 + 0,031x_2 + 0,33x_3 - 0,11x_1x_2 + 0,035x_1x_3 + 0,105x_2x_3 - 0,45x_1^2 + 0,02x_2^2 + 0,02x_3^2,$$

та кількості спор *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 (Y2) від концентрацій у середовищі компонентів x_1, x_2, x_3 :

$$Y2 = -6,76 - 15,8x_2 + 21,79x_3 - 18,68x_1x_2 - 20,74x_2x_3 + 23,74x_1^2.$$

Після знаходження коренів рівнянь, обчислювали шукані концентрації факторів середовища використовуючи формулу:

$$c_i = x_i \lambda + c_{0i}$$

де x_i — кодоване значення фактора (безрозмірна величина); c_i та c_{0i} — натуральні значення фактора (відповідно поточне значення і значення на нульовому рівні); λ — натуральне значення інтервалу варіювання факторів (ΔC) [5, 8].

За розрахунковими показниками оптимізоване поживне середовище для збільшення кількості вегетативних клітин *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 (середовище ВК) має такий склад (г/л): пептон — 7,3; дріжджовий

екстракт — 3,0; глюкоза — 2,5; K_2HPO_4 — 5,0; KH_2PO_4 — 5,0; Na цитрат — 3,0; Na_2HPO_4 — 1,5; $MgSO_4$ — 0,05; $MnSO_4$ — 0,03; $CaCl_2$ — 0,05.

Оптимізоване середовище, що сприяє збільшенню кількості ендоспор *Bacillus thuringiensis* ONU 15 (середовище ЕС), має такий склад (г/л): пептон — 1,8; дріжджовий екстракт — 2,5; глюкоза — 3,8; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4$ — 0,05; $MnSO_4$ — 0,03; $CaCl_2$ — 0,05.

Зменшення кількісних показників джерел енергії та вуглецю для моделі оптимізованої за показником чисельності спор, підтверджує відомі дані про те, що спороутворення є відповідною реакцією культури на виснаження поживних речовин [8].

У таблиці 6 наведено значення концентрації вегетативних клітин та ендоспор, які отримали в експерименті з перевірки отриманих моделей.

Таблиця 6

Концентрація вегетативних клітин та ендоспор *Bacillus thuringiensis* ONU 15, отриманих на оптимізованих середовищах

Table 6

The concentration of vegetative cells and endospores of *Bacillus thuringiensis* ONU 15 on optimized media

Середовище	Кількість вегетативних клітин КУО/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)	Кількість ендоспор КУО/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)
Оптимізоване середовище ВК (модель Y1)	$184,6 \pm 6,9 \times 10^{10}$	$21,6 \pm 0,9 \times 10^8$
Оптимізоване середовище ЕС (модель Y2)	$35,7 \pm 13,8 \times 10^{10}$	$53,3 \pm 1,8 \times 10^9$
Контрольне середовище	$26,0 \pm 2,7 \times 10^{10}$	$3,0 \pm 0,6 \times 10^8$

Як видно з наведених у таблиці 6 даних, концентрація вегетативних клітин *Bacillus thuringiensis* ONU 15 на оптимізованому середовищі ВК досягала значення $184,6 \pm 6,9 \times 10^{10}$ КУО/мл, що майже у 7 разів перевищує цей показник на контрольному середовищі ($26,0 \pm 2,7 \times 10^{10}$ КУО/мл). На оптимізованому середовищі ЕС концентрація ендоспор складала $53,3 \pm 1,8 \times 10^9$ спор/мл, що на два порядки вище ніж на контрольному середовищі ($3,0 \pm 0,6 \times 10^8$ спор/мл), проте концентрація вегетативних клітин на цьому середовищі незначно перевищує цей показник на контрольному середовищі — $35,7 \pm 13,8 \times 10^{10}$ КУО/мл та більш ніж в 5 разів нижча ніж на оптимізованому середовищі ВК.

Таким чином, в результаті проведених досліджень методом математичного планування експериментів з вирощанням центрального композиційного ортогонального експерименту розроблено оптимізовані склади поживних середовищ, які дозволяють суттєво підвищити урожай бактерій та ендоспор *Bacillus thuringiensis* ONU 15.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дрегваль О.А. Вплив джерел мінерального живлення на ріст і токсинування ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* / О.А. Дрегваль, Н.В. Черватюк, А.І. Черевач, А.І. Вінніков // Мікробіологічний журнал. — 2003. — Т. 65, № 3. — С. 14–20.
2. Іваниця В.О. Методики визначення ентомоцидної активності мікроорганізмів щодо личинок грибного комарика (*Sciaridae*) / В.О. Іваниця, Н.М. Непомяща, С.П. Ужєвська, О.С. Багаєва, Т.М. Кривицька // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 4 (12), — С. 91–98.
3. Кривицька Т.М. Штами бактерій роду *Bacillus* з ларвіцидною активністю по відношенню до грибних комариків *Bradysia pilistriata* Frey (*Sciaridae*) / Т.М. Кривицька, О.С. Багаєва, С.П. Ужєвська, Н.М. Непомяща, В.О. Іваниця // Мікробіологія і біотехнологія — 2010. — № 3 (11), — С. 84–92.
4. Методы общей бактериологии / Под ред. Герхарта Ф.Т. в 3 томах. — М.: Мир, 1983. — 536 с.
5. Монтгомери Д.К. Планирование эксперимента и анализ данных. — Л.: Судостроение, 1980. — 384 с.
6. Осадчая А.И. Влияние источников углерода и азота на рост и развитие *Bacillus thuringiensis* H14 266/2-1 / А.И. Осадчая, С.Ф. Прокопченко, И.А. Василевская // Микробиологический журнал. — 1990. — Т. 52, № 3. — С. 34–40.
7. Патент на корисну модель № 60591. Спосіб випробування інсектицидної дії препаратів на грибних комариків / Іваниця В.О., Багаєва О.С., Ужєвська С.П., Непомяща Н.М., Кривицька Т.М., Бобрєшова Н.С. — Опубл. 25.06.2011. — Бюл. № 12.
8. Хилько Т.В. Оптимизация питательных сред для роста ми споробразования бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* // Микробиологічний журнал. — 2004. — Т. 66, № 1. — С. 36–41
9. Холодов В.И. Планирование эксперимента. Конспект лекций для студентов 4-5-го курсов СевНТУ. — Севастополь: СевНТУ. — 2007. — 69 с.
10. Царенко И.Ю. Оптимизация питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 / И.Ю. Царенко, А.А. Рой, И.К. Курдиш // Микробиологічний журнал. — 2011. — Т. 73, № 2. — С. 13–19.
11. Daniel Paredes-Sabja. Inorganic Phosphate and Sodium Ions Are Cogermnants for Spores of *Clostridium perfringens* Type A Food Poisoning-Related Isolates / Daniel Paredes-Sabja, Pathima Udompijitkul, Mahfuzur R. Sarker. // Appl Environ Microbiol. — 2009. — Vol. 75(19). — P. 6299–6305.
12. Hon Yeung Cheung. Dependence of bacillus stearothermophilus spore germination on nutrient depletion and manganese / Hon Yeung Cheung, Ljubisa Vitkovic, Michael R. W. Brown // Journal of General Microbiology. — 1982. — № 128. — P. 2403–2409.

Стаття надійшла до редакції 10.12.2012 р.



УДК 579.852.11.24

Н.Ю. Васильева, Т.В. Гудзенко, Н.Н. Панченко, В.А. Іваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ШТАМА *BACILLUS* *THURINGIENSIS* ONU 15

Реферат

С использованием методов математического планирования проведена оптимизация состава питательной среды для культивирования штамма *Bacillus thuringiensis* ONU 15, обладающего энтомопатогенными свойствами по отношению к двукрылым насекомым-вредителям съедобных грибов. Оптимизацию среды проводили с использованием центрального композиционного ортогонального плана. Параметрами оптимизации служили общая численность бактерий и количество эндоспор штамма *Bacillus thuringiensis* ONU 15. В результате проведенных исследований, предложена питательная среда такого состава: пептон — 7,3 г/л, дрожжевой экстракт — 3,0 г/л, глюкоза — 2,5 г/л, K_2HPO_4 — 5,0 г/л, KH_2PO_4 — 5,0 г/л, Na цитрат — 3,0 г/л, Na_2HPO_4 — 1,5 г/л, $MgSO_4$ — 0,05 г/л, $MnSO_4$ — 0,03 г/л, $CaCl_2$ — 0,05 г/л, на которой концентрация бактерий составляла $184,6 \pm 6,9 \times 10^{10}$ КОЕ/мл.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis* ONU 15, оптимизация состава питательной среды, центральный композиционный ортогональный эксперимент.



UDC 579.852.11.24

N.Yu. Vasylieva, T.V. Gydzenko, M.M. Panchenko, V.O. Ivanytsia

Odesa Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

**OPTIMIZATION OF THE CULTURE MEDIUM FOR
ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA OF STRAIN *BACILLUS
THURINGIENSIS* ONU 15**

Summary

With the use of experimental design methods there were optimized the culture medium for the cultivation of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15, having entomopathogenic properties against dipteran pests of edible fungi. Optimization of culture medium was performed using the central composite orthogonal method. The parameters of optimization were the total number of bacteria and the number of endospores of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15. As a result of the research it is proposed the culture medium of the following composition: peptone – 7.3 g/l, yeast extract – 3.0 g/l, glucose – 2.5 g/l, K_2HPO_4 – 5.0 g/l, KH_2PO_4 – 5.0 g/l, Na citrate – 3.0 g/l, Na_2HPO_4 – 1.5 g/l, $MgSO_4$ – 0.05 g/l, $MnSO_4$ – 0.03 g/l, $CaCl_2$ – 0.05 g/l.

At the optimized culture medium the total number of bacteria, compared with the original culture medium, increased by 7 times and has reached the indicator – $184.6 \pm 6.9 \times 10^{10}$ CFU/ml.

Key words: *Bacillus thuringiensis* ONU 15, optimization of the culture medium, the central composite orthogonal method.

