

АСАБИНА ЕЛЕНА АНТОНОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *Pseudomonas* –
ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

03.00.23.–биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра РАН и ГУП «Опытный завод Академии Наук Республики Башкортостан»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Логинов Олег Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Чемерис Алексей Викторович
доктор биологических наук, профессор
Супрунова Ольга Борисовна

Ведущая организация: **Всероссийский научно-исследовательский
и технологический институт биологической
промышленности Россельхозакадемии**

Защита состоится «18» декабря 2009 г. в 14 часов на заседании Объединенного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций ДМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69, тел/факс: 8 (347) 235-62-47, e-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского научного центра РАН и на официальном сайте АН РБ по адресу: <http://www.anrb.ru/inbio/dissovet>

Автореферат разослан « » ноября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



Р.В.Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Биологические средства защиты растений являются единственной альтернативой химическим фунгицидам с точки зрения природоохранного земледелия. Наиболее подробно изученными бактериями-антагонистами фитопатогенных грибов, обладающими способностью стимулировать рост растений и повышать их устойчивость, являются представители рода *Pseudomonas* (Рубан, 1986; Смирнов, Киприанова, 1990; Мордухова и др., 1991; Холмецкая и др., 1996; Боронин, 1998; Логинов, 2005; Weller, 1988; Dowling & O’Gara, 1994; Whipps, 2001; Garg et al., 2005).

Широкомасштабное использование в сельском хозяйстве биопрепаратов на основе ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* сдерживается отсутствием стандартных технологий их производства. При производстве биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas* для практического использования в агробиотехнологии основной проблемой является высокая стоимость питательной среды.

При подборе питательных сред и условий культивирования с целью повышения выхода биомассы или накопления определенных продуктов обмена веществ микроорганизмов, таких как антибиотики или ростстимулирующие вещества, широкое применение нашли методы математического планирования эксперимента (Максимов, Фёдоров, 1969; Егорова, 1976; Бойченко и др., 2002; Автономова и др., 2006; Flavia et al., 2006; Mandal et al., 2007; Narajana et al., 2008; Sharma et al., 2009). Которые позволяют не только одновременно изучить действие нескольких факторов на интересующий исследователей процесс, но и количественно оценить степень этого влияния.

Учитывая, что потребность сельского хозяйства в средствах защиты растений увеличивается с каждым годом, проблема совершенствования технологии биологической защиты растений представляется актуальной.

Цель и задачи исследования. Целью исследований являлась оптимизация питательных сред и условий для культивирования штаммов бактерий *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51 – основы биопрепарата "Елена",

P. putida ИБ 17 и *P. chlororaphis* ИБ 6, продуцирующих антибиотики и ростстимулирующие вещества.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить степень влияния компонентов питательной среды на накопление биомассы и антигрибной активности при культивировании штаммов *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17.

2. Определить оптимальный состав ферментационных сред для культивирования штаммов *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17, с максимальной антигрибной активностью и высоким титром клеток.

3. Изучить закономерности синтеза цитокининов, штаммом бактерий *P. chlororaphis* ИБ 6, в зависимости от состава питательной среды.

4. Оптимизировать условия периодического и непрерывного промышленного культивирования штаммов *Pseudomonas*.

Научная новизна. Разработаны технологии промышленного культивирования бактерий рода *Pseudomonas* для производства биопрепаратов сельскохозяйственного назначения с высокой антигрибной и ростстимулирующей активностью.

Практическая значимость. Разработаны новые, экономичные питательные среды и подобраны оптимальные условия для промышленной наработки биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas*, что может быть использовано при производстве биопрепарата "Елена", предназначенного для защиты сельскохозяйственных растений от грибных фитопатогенов.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на IV Всероссийской научной INTERNET-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био-и органической химии и биотехнологии» (Уфа, 2005), XIX международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии Реактив-2006» (Уфа, 2006), I Всероссийской научно-практической конференции «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Пушино,

2007), II съезде микологов России «Современная микология в России» (Санкт-Петербург, 2008).

Публикации. По материалам работы опубликовано 11 научных работ, в том числе шесть статей в рецензируемых журналах, входящих в Перечень ВАК, рекомендованных для соискателей ученой степени кандидата биологических наук и 1 патент Российской Федерации.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследований, экспериментальную часть (4 главы), заключение, выводы, список цитируемой литературы, содержащий 139 ссылок и приложение. Работа изложена на 100 страницах машинописного текста и содержит 14 рисунков и 12 таблиц.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность всем сотрудникам лаборатории микробиологии ОТК ГУП «Опытный завод», лаборатории БАВ Учреждения РАН Института биологии Уфимского научного центра РАН за постоянную поддержку при выполнении данной работы. Автор благодарит заведующего контрольно - аналитической лабораторией ЗАО НПП «Биомедхим» к.б.н. Четверикова С.П. за помощь в обсуждении результатов и консультации.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами изучения являлись штаммы бактерий *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51 (Патент РФ № 2203945, 2003), *P. chlororaphis* ИБ 6 (Патент РФ № 2260951, 2005) и *P. putida* ИБ 17 (Патент РФ № 2213774, 2003) из Коллекции микроорганизмов Учреждения РАН Института биологии Уфимского научного центра РАН, проявляющие антагонистические свойства в отношении ряда грибов – возбудителей болезней растений.

Культуры выращивали при 28°C и $n=180$ мин⁻¹ на воздушно-термостатируемой качалке УВМТ-12-250 в жидкой питательной среде Кинг В (King et al., 1954). Односуточный посевной материал объемом 1 мл пересевали в колбы емкостью 250 мл со 100 мл среды, состоящей из следующих

компонентов: глицерин, дрожжевой автолизат, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , в количестве, согласно плану эксперимента, и культивировали в течение трех суток при температуре 28°C.

Оптимизацию состава ферментационной питательной среды проводили с применением метода математического планирования эксперимента (Максимов, Федоров, 1969) в два этапа:

- построение адекватной математической модели процесса путем связывания выходного параметра системы (антигрибная активность, титр клеток) с входными - концентрациями компонентов (факторов) питательной среды в полных факторных экспериментах (ПФЭ) по плану 2^4 с их варьированием на двух количественных уровнях (верхнем "+" и нижнем "-");

- нахождение собственно оптимального состава среды по схеме "крутого восхождения".

В качестве 4 факторов варьирования были взяты глицерин (X_1), дрожжевой автолизат (X_2), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (X_3), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (X_4). Уровни варьирования представлены в табл. 1, содержание остальных компонентов ферментационной среды было зафиксировано на постоянном уровне.

Таблица 1

Компоненты питательной среды и их уровни варьирования в ПФЭ 2^4

Компонент среды	Фактор	Средний уровень «0»	Нижний уровень «-»	Верхний уровень «+»	Единица варьирования
Глицерин, г/л	X_1	11,00	2,00	20,00	9,00
Дрожжевой автолизат, л/л	X_2	0,13	0,01	0,25	0,12
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, г/л	X_3	5,50	1,00	10,00	4,50
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, г/л	X_4	1,50	0,50	2,50	1,00
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, г/л	Постоянный уровень – 1,50				
FeCl_3 , г/л	Постоянный уровень – 0,01				

Оптимизацию условий культивирования проводили в ферментерах АК-210 (СКБ БП, Пушкино) с рабочим объемом 6 л, количество посевного материала 2% по объему, аэрация - 0,5 объема воздуха в 1 мин на 1 объем среды также с применением метода математического планирования эксперимента на вновь

разработанных средах. Для изучаемых штаммов были проведены полные факторные эксперименты по плану 2^3 .

В качестве 3 факторов варьирования были взяты аэрация (X_1^1), температура (X_2^1) и продолжительность культивирования (X_3^1), уровни варьирования представлены в табл. 2.

Таблица 2

Условия культивирования и их уровни варьирования в ПФЭ 2^3

Условия культивирования	Фактор	Средний уровень «0»	Нижний уровень «-»	Верхний уровень «+»	Единица варьирования
Перемешивание, об/мин	X_1^1	160	140	180	20
Температура, °С	X_2^1	28	26	30	2
Продолжительность культивирования	X_3^1	72	48	96	24

Для получения автолизата отработанные пивные дрожжи подвергали термической обработке при 100 °С в течение 1 часа. Затем дрожжевой автолизат фильтровали и доводили рН до 6,8-7,2.

Титр жизнеспособных клеток определяли методом предельных разведений на агаризованной среде Кинг В (King et al., 1954).

В качестве тест-объекта использовали фитопатогенный гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (= *Helminthosporium sativum* Pam., King et Bakke). Антигрибную активность низкомолекулярных (НМ) фракций метаболитов (≤ 3 кДа) определяли методом разведений (Широков и др., 2002). В пробирки вносили 0,5-3,0 мл препарата фракции метаболитов, добавляли 1 мл суспензии спор тест-гриба, 1 мл шестикратно концентрированной среды Чапека (Теппер и др., 1972) и дистиллированную воду до общего объема 6 мл. Засеянные пробы оставляли при 28°С на 7 сут. Подавление роста гриба оценивали визуально относительно контроля, представляющего собой вышеописанную систему, но без внесения метаболитов. В качестве единицы активности принимали такое количество фракции метаболитов, при котором подавляется рост гриба в течение 7 сут.

В качестве тест-объектов для определения антифунгальной активности штаммов псевдомонад методом лунок служили также следующие мицелиальные грибы: *Fusarium gibbosum* ВКМ 848, *F. culmorum* ВКМ 844, *F. graminearum* ВКМ 1668, *F. nivale* ВКМ 3106, *F. oxysporum* ВКМ 137, *F. avenaceum* ВКМ 132, *F. semitectum* ВКМ 1938, *F. solani* ВКМ 142, *Alternaria alternate* из Коллекции микроорганизмов Учреждения РАН Института биологии Уфимского научного центра РАН. В чашки Петри со средой ГПА, с предварительно внесёнными в неё спорами тест-грибов, в лунки диаметром 9 мм вносили по 100 мкл бактериальной суспензии. О величине антифунгального эффекта, по результатам пяти повторностей, судили по диаметру зон ингибирования грибного роста вокруг лунок после инкубирования чашек при 28 °С в течение 4 сут.

Выделение и хроматографическое разделение низкомолекулярных фракций культуральных жидкостей на компоненты проводили, согласно (Логинов, Четвериков, 2003).

Фитогормональную активность определяли при помощи иммуноферментного анализа (Кудоярова и др., 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение оптимального состава питательных сред для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*. Для создания оптимальной среды, состав которой мог бы полностью удовлетворять пищевые потребности культуры и способствовать максимальному накоплению антигрибной активности, целесообразно использовать методы математического планирования эксперимента, включающие план полного факторного эксперимента и опыт по методу крутого восхождения.

Ранее для штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 было показано, что природа источников углерода и органического азота в среде существенно влияет на продукцию ими ингибиторов роста фитопатогенов. Оптимальными источниками являются глицерин и равнозначная смесь дрожжевого экстракта и пептона

(Логинов, Четвериков, 2003). Эти же источники являются оптимальными и для других штаммов, изучаемых нами *P. chlororaphis* ИБ 6, *P. putida* ИБ 17.

Но при широкомасштабном производстве биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas* для практического использования в агrobiотехнологии основной проблемой является высокая стоимость питательной среды, содержащей в своем составе такие дорогостоящие компоненты, как пептон и дрожжевой экстракт. С целью удешевления состава питательной среды заменили смесь дрожжевого экстракта и пептона на автолизат отработанных пивных дрожжей. При выборе этого компонента питательной среды мы руководствовались, прежде всего, низкой стоимостью, доступностью и технологичностью сырья.

Отработанные дрожжи трёх разных производителей пивной продукции проанализировали на содержание различных форм азота. Результаты анализа автолизатов пивных дрожжей и пептона представлены в табл. 3.

Таблица 3

Характеристика пептона и полученных дрожжевых автолизатов различных пивоваренных производств

Показатель	«ПИТ», г. Новотроицк	«Шихан Хайнекен», г. Стерлитамак	«Amstar- Efes», г. Уфа	Пептон
Азот общий, % в пересчете на АСВ*	5,9±0,3	5,4±0,3	5,2±0,3	7,6±0,4
Азот аминный, % в пересчете на АСВ	2,0±0,1	1,5±0,1	1,6±0,1	3,6±0,2
Белок по Лоури, % в пересчете на АСВ	45,2±2,3	40,7±2,0	41,3±2,1	61,7±3,1

*абсолютно сухие вещества

Из приведённых данных видно, что отработанные дрожжи завода «ПИТ» г. Новотроицк по анализируемым показателям превосходят дрожжи остальных пивоваренных производств, что и послужило основанием для дальнейшей работы с ними по оптимизации питательных сред для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*.

Согласно составленной матрице планирования, было проведено 16 экспериментов по каждому штамму бактерий *Pseudomonas* с различным варьированием изучаемых факторов (табл. 2). Эксперименты проводились с трёхкратной повторностью.

В результате экспериментов (таб. 4-6) были вычислены коэффициенты уравнений регрессии - математических моделей зависимости функций Y_1 (антигрибная активность) и Y_2 (титр клеток) от концентрации в ферментационной среде компонентов X_1 , X_2 , X_3 , X_4 . На основании коэффициентов были получены математические модели зависимости антигрибной активности (Y_1) и титра клеток (Y_2) от концентраций в ферментационной среде компонентов. Полученные модели по накоплению биомассы и антигрибной активности при 95 % доверительном интервале дают основание утверждать, что статистически значимое действие в изученном диапазоне концентраций для разных штаммов оказывают разные компоненты.

Таблица 4

ПФЭ и его результаты для штамма *P. chlororaphis* ИБ 51

Вариант	Фактор				Y_1 , ед/мл КЖ	Y_2 , млрд КОЕ/мл КЖ
	X_1	X_2	X_3	X_4		
1	-	-	-	-	2,0±0,1	0,79±0,04
2	+	-	-	-	2,0±0,1	0,95±0,05
3	-	+	-	-	2,0±0,1	1,42±0,07
4	+	+	-	-	2,0±0,1	0,55±0,03
5	-	-	+	-	5,0±0,25	1,0±0,05
6	+	-	+	-	9,0±0,45	0,95±0,05
7	-	+	+	-	4,8±0,24	24,7±1,23
8	+	+	+	-	7,0±0,35	17,57±0,88
9	-	-	-	+	5,8±0,29	0,97±0,05
10	+	-	-	+	7,0±0,35	1,27±0,06
11	-	+	-	+	2,0±0,1	2,8±0,14
12	+	+	-	+	2,3±0,12	4,72±0,24
13	-	-	+	+	8,0±0,4	0,94±0,05
14	+	-	+	+	3,7±0,18	0,84±0,04
15	-	+	+	+	6,0±0,3	23,33±1,17
16	+	+	+	+	5,0±0,25	20,67±1,03
17	0	0	0	0	7,0±0,35	16,4±0,82

Таблица 5

ПФЭ и его результаты для штамма *P. chlororaphis* ИБ 6

Вариант	Факторы				Y ₁ , ед/мл КЖ	Y ₂ , млрд КОЕ/мл
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		
1	-	-	-	-	2,0±0,1	1,21±0,06
2	+	-	-	-	2,0±0,1	1,43±0,07
3	-	+	-	-	2,3±0,1	1,28±0,06
4	+	+	-	-	2,0±0,1	1,41±0,07
5	-	-	+	-	2,2±0,1	2,04±0,1
6	+	-	+	-	2,3±0,11	1,5±0,07
7	-	+	+	-	2,2±0,11	7,73±0,39
8	+	+	+	-	10,0±0,5	8,5±0,42
9	-	-	-	+	3,5±0,17	1,19±0,06
10	+	-	-	+	4,5±0,22	1,88±0,09
11	-	+	-	+	2,3±0,11	2,43±0,12
12	+	+	-	+	2,7±0,13	5,33±0,27
13	-	-	+	+	9,0±0,45	1,83±0,09
14	+	-	+	+	9,0±0,45	1,1±0,06
15	-	+	+	+	5,0±0,25	7,67±0,38
16	+	+	+	+	6,0±0,3	8,0±0,4
17	0	0	0	0	8,0±0,4	6,05±0,3

Таблица 6

ПФЭ и его результаты для штамма *P. putida* ИБ 17

Вариант	Факторы				Y ₁ , ед/мл КЖ	Y ₂ , млрд КОЕ/мл
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		
1	-	-	-	-	2,0±0,1	1,38±0,07
2	+	-	-	-	2,0±0,1	0,06±0,0
3	-	+	-	-	2,0±0,1	5,57±0,28
4	+	+	-	-	2,0±0,1	2,87±0,14
5	-	-	+	-	2,3±0,12	1,69±0,08
6	+	-	+	-	2,2±0,11	0,05±0,0
7	-	+	+	-	2,8±0,14	3,23±0,16
8	+	+	+	-	5,0±0,25	2,07±0,1
9	-	-	-	+	3,0±0,13	0,01±0,0
10	+	-	-	+	3,0±0,13	0,64±0,03
11	-	+	-	+	6,0±0,26	6,77±0,34
12	+	+	-	+	7,0±0,35	3,53±0,18
13	-	-	+	+	6,0±0,26	0,14±0,01
14	+	-	+	+	4,0±0,2	0,22±0,01
15	-	+	+	+	9,0±0,45	3,17±0,16
16	+	+	+	+	5,5±0,27	2,35±0,12
17	0	0	0	0	7,0±0,35	4,80±0,24

Уравнения регрессии, с учетом значимости коэффициентов, выглядят следующим образом:

для штамма *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51

$$Y_1 = 4,60 + 0,15X_1 + 1,46X_3,$$

$$Y_2 = 6,47 + 5,50X_2 + 4,78X_3;$$

для штамма *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6

$$Y_1 = 4,19 + 0,63X_1 + 1,52X_3 + 1,06X_4,$$

$$Y_2 = 3,41 + 1,89X_2 + 1,39X_3;$$

для штамма *Pseudomonas putida* ИБ 17

$$Y_1 = 3,99 + 0,93X_2 + 0,62X_3 + 1,48X_4,$$

$$Y_2 = 2,11 + 0,64X_1 - 1,59X_2 + 0,49X_3.$$

Основное положительное влияние на антигрибную активность двух штаммов вида *P. chlororaphis* оказывает увеличение концентраций глицерина (X_1) и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (X_3), причем на штамм ИБ 6 дополнительное положительное влияние оказывает увеличение концентрации $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (X_4), а концентрация дрожжевого автолизата (X_2) соответствует оптимальному значению для штамма этого вида (т.е. изменение его концентрации в выбранных пределах не вызывает заметное, статистически значимое, изменение антигрибной активности). Несколько иначе ведет себя штамм вида *P. putida*, где положительное влияние на увеличение антигрибной активности оказывает увеличение концентраций автолизата (X_2), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (X_3) и $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (X_4).

На основании полученных данных в ПФЭ-2⁴ были поставлены опыты по плану крутого восхождения, в котором осуществляли одновременное изменение концентраций всех значимых факторов по алгоритму, рассчитанному точно в соответствии с величинами коэффициентов регрессии. Восхождение было начато от исходного состава среды (средний уровень ПФЭ-2⁴). Таким образом, были установлены оптимальные составы питательных сред (табл. 7).

Антигрибная активность выращенных на данных средах штаммов *Pseudomonas* в 1,5 раза выше, чем в среднем варианте, в то же время титр клеток

на данной среде составил $2,20 \cdot 10^{10}$, $1,46 \cdot 10^{10}$ и $5,00 \cdot 10^9$ КОЕ/мл культуральной жидкости соответственно для штаммов ИБ 51, ИБ 6 и ИБ 17.

Таблица 7

Оптимизированные составы питательных сред

Компонент среды	Оптимальное содержание для штамма		
	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	<i>P. putida</i> ИБ 17
Глицерин, г/л	11,30	11,53	11,00
Дрожжевой автолизат, л/л	0,11	0,13	0,16
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O, г/л	6,96	6,14	6,23
KH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O, г/л	1,58	1,60	1,89
MgSO ₄ ×7H ₂ O, г/л	1,50		
FeCl ₃ , г/л	0,01		

Оптимизация условий культивирования штаммов *Pseudomonas*.

Оптимизацию условий культивирования штаммов-продуцентов проводили в ферментерах на средах выше приведённого состава (табл. 7).

Результаты ПФЭ 2³ показали, что все три исследуемые культуры проявляют максимальную антигрибную активность в рамках выбранной системы ее определения вне зависимости от условий культивирования. Рассчитанные коэффициенты для уравнений регрессии, описывающих зависимость титра клеток от условий культивирования, оказались статистически незначимыми. Однако по результатам ПФЭ 2³ были выявлены параметры культивирования, позволяющие повысить титр клеток исследуемых штаммов бактерий рода *Pseudomonas* в культуральной жидкости, которые мы приняли за оптимальные параметры культивирования штаммов-продуцентов (табл. 8).

Таблица 8.

Оптимальные условия культивирования

Условия культивирования	Оптимум для штамма		
	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	<i>P. putida</i> ИБ 17
Перемешивание, об/мин	180	160	160
Температура, °С	26	26	30
Продолжительность культивирования, ч	48	48	48

Таким образом, результаты оптимизации условий культивирования штаммов *Pseudomonas* показывают, что всем исследуемым штаммам для накопления максимальной антигрибной активности и высокого ($3,42 \cdot 10^{10}$, $1,50 \cdot 10^{10}$ и $1,25 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл КЖ соответственно для штаммов ИБ 51, ИБ 6 и ИБ 17) титра клеток при культивировании в ферментёрах достаточно 48 ч, в условиях пониженной аэрации и перемешивания, при температуре 26 °С для двух штаммов вида *P. chlororaphis*, а для штамма *P. putida* необходимо 30 °С. Полученные данные согласуются с исследованиями в работе Логинов О.Н. и Четвериков С.П. (2003) о способности изучаемых штаммов к активному росту при пониженных температурах и данными литературы по биосинтезу антибиотических веществ псевдомонадами.

Исследование цитокининовой активности. Все образцы ПФЭ 2⁴ штамма бактерий *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6 в виде низкомолекулярных фракций были проверены на наличие в них веществ цитокининовой природы. Данные иммуноферментного анализа показали, что в условиях проведенного эксперимента штамм ИБ 6 способен синтезировать цитокинины, максимальный выход которых составляет 1117,1 нг/мл культуральной жидкости. Хроматографический профиль низкомолекулярной фракции образца с максимальной фитогормональной активностью представлен тремя компонентами (рис. 1а).

Покомпонентный анализ показал, что фунгицидной активностью обладает лишь один компонент из НМ фракции метаболитов. При хроматографическом разделении этот компонент первым элюирует с колонки и не имеет ярко выраженного максимума поглощения в УФ- области. Остальные компоненты фракции имеют максимумы УФ- поглощения в интервале от 255 до 280 нм, характерные для регуляторов роста растений, что и было подтверждено данными иммуноферментного анализа (рис. 2). Причем максимум поглощения одного из исследуемых компонентов находился при длине волны 267 нм, можно было предположить, что это цитокинин зеатин, а максимальная абсорбция другого компонента цитокининовой природы наблюдалась при 257,5 нм.

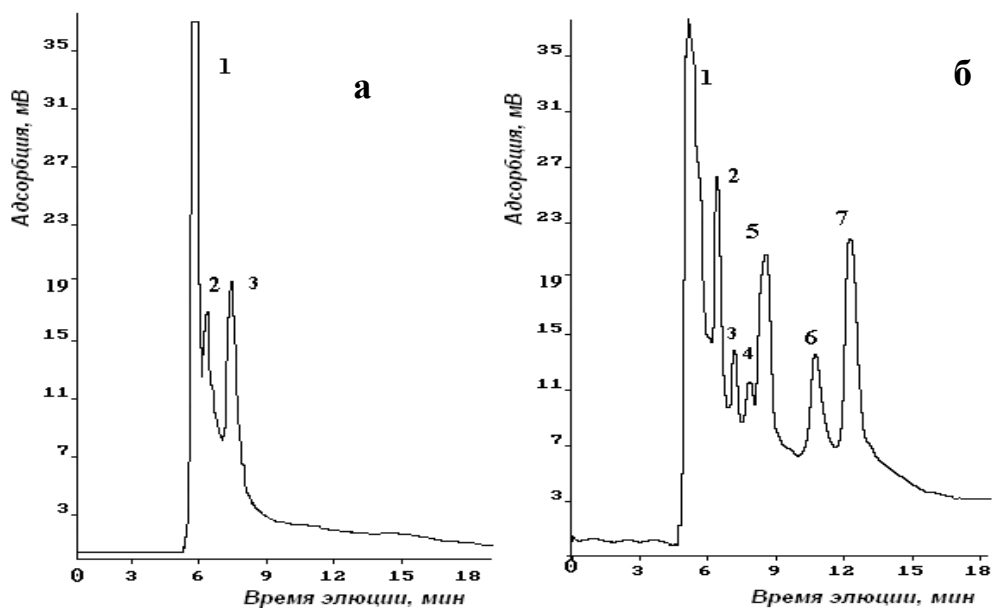


Рис. 1. Хроматографические профили низкомолекулярных фракций культуральных жидкостей штамма *P. chlororaphis* ИБ 6 (ВЭЖХ, 254 нм, колонка Zorbax-ODS (250x4,6 мм, “Shimadzu”, Япония), элюент – вода), выращенного (а) – на среде варианта № 6 ПФЭ, (б) – на среде Кинг В. Компоненты фракций: 1 – с антигрибной активностью, 2, 3, 6, 7 – с фитогормональной активностью.

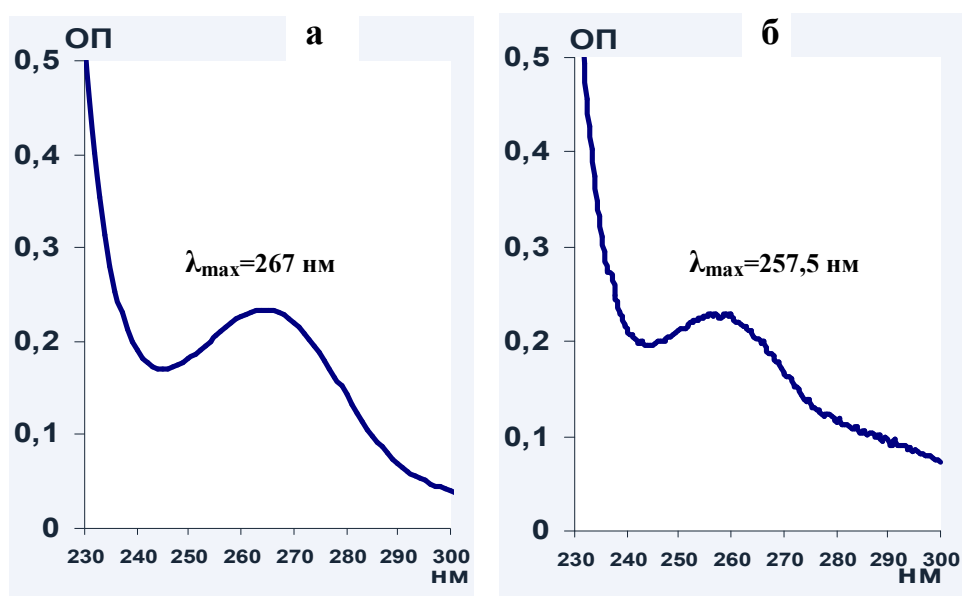


Рис. 2. УФ – спектры компонентов с фитогормональной активностью, выделенных из НМ фракции КЖ штамма *P. chlororaphis* ИБ 6: а – компонента 2 из рис. 1а, б – компонента 3 из рис. 1а.

При культивировании же на среде Кинг В вышеуказанный исследуемый штамм продуцировал по данным хроматографии семь компонентов (рис. 1б). Дальнейший анализ показал наличие у одного из них антигрибной активности, у четырех – фитогормональной активности цитокининовой природы. При этом выход цитокининов не превышал 680 нг/мл культуральной жидкости.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов с использованием метода математического планирования были выявлены условия максимальной продукции штаммом *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6 веществ цитокининовой природы, позволяющие получать культуральную жидкость этих бактерий с концентрацией цитокининов свыше 1100 нг/мл.

Оценка антигрибной активности штаммов выращенных на новых питательных средах. Исследуемые штаммы *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6, *P. putida* ИБ 17, выращенные в оптимальных условиях на оптимизированных средах, проверили на антигрибную активность. Спектр антагонистической активности был оценён зонами подавления гриба в сравнении с зонами подавления фитопатогенов штаммами, выращенными на классической среде Кинг В. По полученным результатам антигрибной активности исследуемых штаммов *Pseudomonas* видно (рис. 3), что бактерии, выращенные в оптимизированных условиях, по фунгицидной активности не уступают микроорганизмам, выращенным на классической среде Кинг В в тех же условиях.

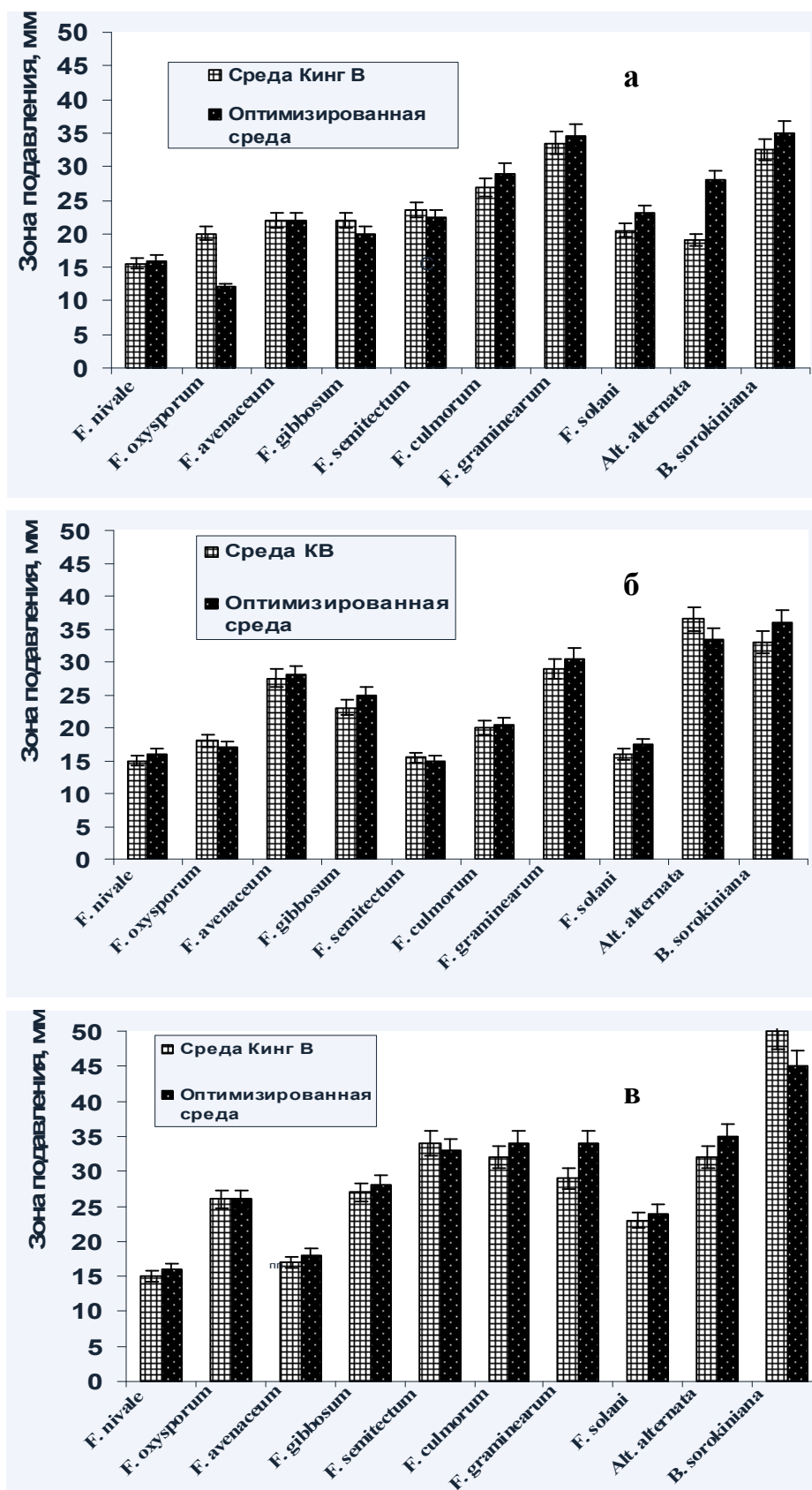


Рис. 3. Спектр антигрибной активности штаммов *P. chlororaphis* ИБ 51 (а), *P. chlororaphis* ИБ 6 (б), *P. putida* ИБ 17 (в), выращенных на оптимизированной среде и среде Кинг В, в сравнении.

Выявлено, что антигрибная активность, в отношении почти всех исследуемых тест-грибов штамма *Pseudomonas putida* ИБ 17, выращенного на оптимизированной среде (рис. 4), превышает активность двух других штаммов, выращенных также на оптимизированных средах.

Таким образом, штамм-антагонист *Pseudomonas putida* ИБ 17 может стать основой микробиологического препарата нового поколения, обладающего широким спектром антагонистической активности в отношении фитопатогенных грибов р. *Fusarium*, *Alternaria* и *Helminthosporium*.

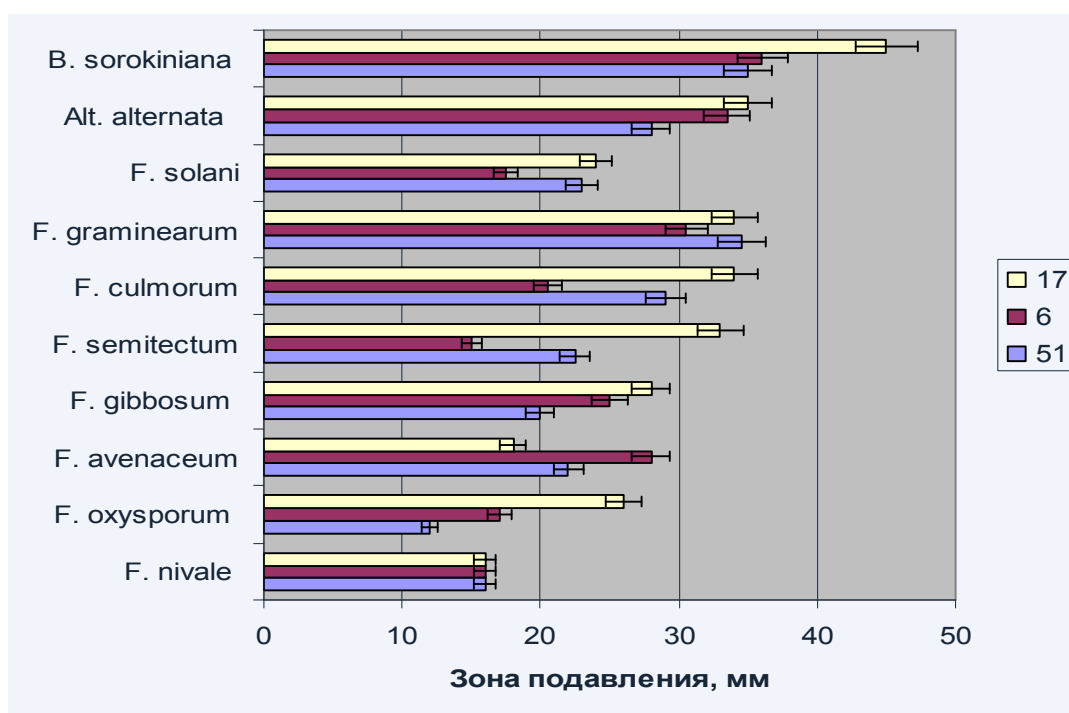


Рис. 4. Спектр антигрибной активности штаммов *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17, выращенных на оптимизированных средах, в сравнении.

Изучение параметров культивирования штамма *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51 в периодических и непрерывных условиях. На основе штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 ранее был разработан биопрепарат «Елена» (Логинов и др., 2003), наработка которого производится в периодическом режиме культивирования. Учитывая увеличивающуюся потребность в биологических препаратах в сельском хозяйстве, исследовали возможность

наработки биопрепарата «Елена» в непрерывных условиях. Для определения максимальной удельной скорости роста рабочего штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 в непрерывном режиме провели серию ферментаций в периодическом режиме культивирования. Кривая роста штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 представлена на рис. 5.

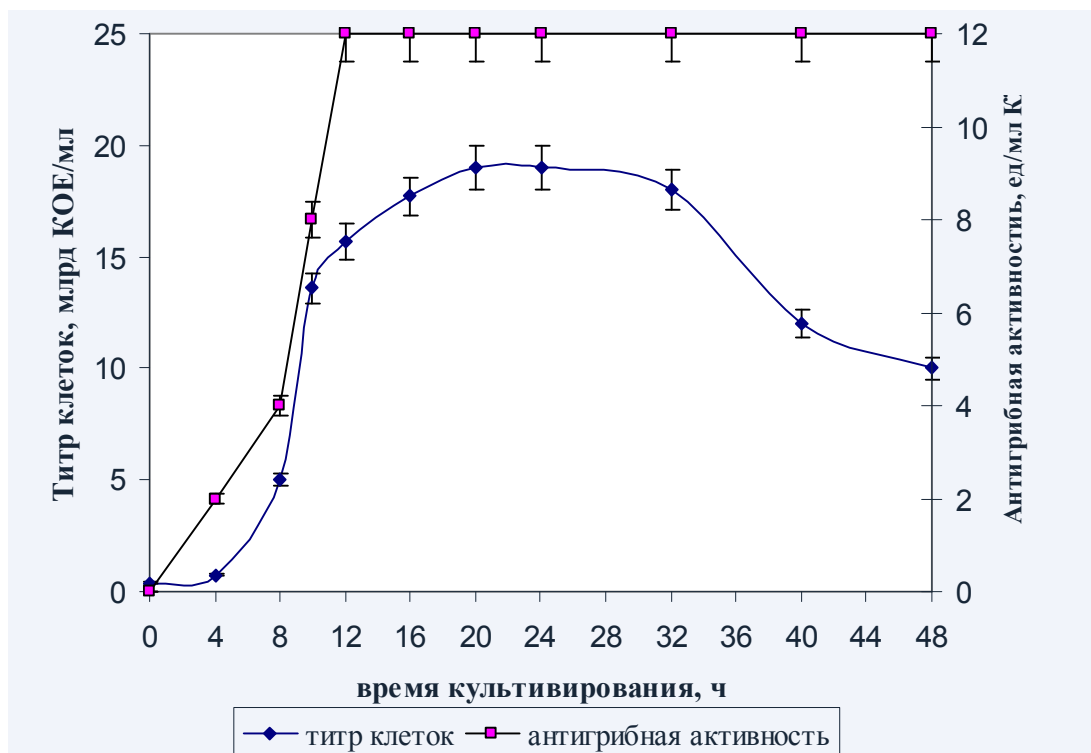


Рис. 5. Динамика периодического роста и накопления антигрибных веществ культурой *P. chlororaphis* ИБ 51.

Культивирование в оптимальных условиях позволяет штамму интенсивно накапливать метаболиты с антигрибной активностью на завершающей стадии экспоненциального роста к 12-14 ч культивирования. В дальнейшем антигрибная активность культуры *P. chlororaphis* ИБ 51 практически не изменяется до окончания культивирования.

Переход от периодического процесса культивирования к непрерывному провели при помощи графоаналитического метода. Были определены скорости разбавления для нескольких состояний динамического равновесия путем сопоставления зависимости накопления биомассы от времени культивирования с данными о продуктивности процесса по выходу биомассы.

Далее провели серию наработок культуры штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 в режиме непрерывного культивирования в условиях, определенных расчетно-графически при скоростях разбавления $D=0,26; 0,34; 0,5; 0,7 \text{ ч}^{-1}$.

В ходе эксперимента было установлено, что при значении скорости разбавления $D=0,7 \text{ ч}^{-1}$ наблюдалось вымывание культуры из ферментера, так как соответствовало максимальной удельной скорости роста штамма (μ_{\max}). При установлении скорости разбавления $D=0,26 \text{ ч}^{-1}; 0,34 \text{ ч}^{-1}; 0,50 \text{ ч}^{-1}$ система достигает стационарного режима при концентрации клеток в интервале от $4 \cdot 10^9$ до $1,2 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл КЖ (максимум при $D=0,5 \text{ ч}^{-1}$). Дальнейшее увеличение скорости потока вызывает уменьшение урожая клеток.

Таким образом, были аналитически рассчитаны и экспериментально подтверждены параметры для промышленного культивирования штамма *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51 в условиях хемостата с высокой производительностью процесса накопления биомассы.

Питательные среды для промышленного культивирования псевдомонад и экономический эффект от использования новых сред.

Исследовав параметры культивирования бактерий на среде с автолизатом отработанных пивных дрожжей, получили технологическое решение производства биопрепарата с использованием вторичного сырья.

Для того чтобы, не быть зависимыми в своем производстве от какой-то одной области промышленности, была предпринята успешная попытка перенести разработанные условия культивирования для производства биопрепарата на родственный субстрат – пекарские дрожжи и его автолизат. Автолизат пекарских дрожжей не уступает по своим характеристикам, таким как, содержание незаменимых аминокислот, аминного (4,47 %, АСВ) и общего азота (5,74%, от АСВ), автолизату пивных дрожжей.

Внедрение в технологический процесс новых питательных сред значительно сократит технологические расходы на стадии приготовления питательной среды, что крайне необходимо в условиях развивающейся агробιοтехнологии.

Данные экономического расчета (табл. 9) затрат на питательные среды (в ценах 2009 г.), показали, что наиболее дешёвой питательной средой является оптимизированная среда на основе автолизата пивных дрожжей. Экономический эффект от использования разработанной среды по сравнению с Кинг В составил 146275 руб за один цикл наработки целевого продукта в объёме 10 т. Таким образом, использование оптимизированной среды на основе автолизата пивных дрожжей значительно сокращает долю производственных затрат на питательную среду в себестоимости готового продукта с 22% до 3,6%.

Таблица 9

Экономический эффект использования питательных сред за один цикл наработки (10 т) биопрепарата «Елена»

Варианты сред	Стоимость среды, руб.	Себестоимость продукта, руб.	Доля среды в себестоимости продукта
Модифицированная Кинг В	168763,21	765000	22%
Оптимизированная на автолизате пекарских дрожжей	23738,18	619975	3,8%
Оптимизированная на автолизате пивных дрожжей	22488,18	618724	3,6%

Нами показана целесообразность использования разработанных оптимизированных питательных сред на основе автолизата пивных дрожжей при производстве биопрепаратов на основе бактерий-продуцентов рода *Pseudomonas*, которые обеспечивают высокую антагонистическую активность в сочетании с экономической и технологической приемлемостью. В то же время, исходя из соображения соответствия цены и качества в сравнении со средой Кинг В, автолизат пекарских дрожжей, как и сами дрожжи, также могут быть использованы как компонент питательной среды в производстве биопрепарата «Елена».

ВЫВОДЫ

1. Показано, что антигрибная активность и накопление биомассы при культивировании штаммов *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17 главным образом зависят от содержания дрожжевого автолизата и фосфатов в ферментационной среде.

2. Разработаны новые экономичные ферментационные среды на основе автолизатов отработанных пивных дрожжей, пекарских дрожжей для промышленной наработки биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas* для защиты сельскохозяйственных растений от грибных фитопатогенов с максимальной антигрибной активностью и высоким титром клеток.

3. Выявлены условия максимальной продукции штаммом *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6 веществ цитокининовой природы, позволяющие получать культуральную жидкость этих бактерий с концентрацией цитокининов свыше 1100 нг/мл.

4. Подобраны оптимальные условия периодического и непрерывного промышленного культивирования биопрепарата «Елена» и аналогичных биопестицидов на основе бактерий рода *Pseudomonas*.

5. Показано, что антигрибная активность штамма *P. putida* ИБ 17, выращенного в оптимальных условиях, максимальна среди исследуемых штаммов псевдомонад.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Четвериков С.П., Асабина Е.А., Логинов О.Н. Оптимизация состава питательной среды для промышленного производства биопрепарата «Елена» // Башкирский химический журнал.-2006. - Т 13. - №2. - С.10-13.

2. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Сравнительный анализ математических моделей биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов псевдомонадами // Вестник Оренбургского государственного университета.– 2008. - №5(86). - С.122-124.

3. Сулейманова Л.Р., Асабина Е.А., Дубинина О.Н., Логинов О.Н., Четвериков С.П., Галимзянова Н.Ф., Черняева Н.Ю., Хуснаризанова Р.Ф., Силищев Н.Н. Микроорганизм

Pseudomonas aureofaciens ИБ 51 и биопрепарат «Елена» // Токсикологический вестник.- 2008.- №3.- С. 39-41.

4. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Отработанные пивные дрожжи – компонент для промышленного производства биопрепаратов // Аграрная Россия.– 2009.– Специальный выпуск.– С.115.

5. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов бактериями рода *Pseudomonas* // Биотехнология.– 2009.- №3.– С.67-71.

6. Четвериков С.П, Асабина Е.А. Цитокининподобные вещества *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6 // Вестник Оренбургского государственного университета.– 2009.- №10- С.512-513.

Публикации в других изданиях

7. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация состава питательной среды для культивирования *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51- продуцента БАВ // Сборник тезисов IV Всероссийской научной INTERNET-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био-и органической химии и биотехнологии», Уфа. - 2006.- С.109.

8. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация состава питательной среды для культивирования *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6- продуцента БАВ // Сборник тезисов XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии Реактив-2006», Уфа. - 2006. - С.48.

9. Асабина Е.А., Четвериков С.П. , Логинов О.Н. Оптимизация состава питательных сред для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*- продуцентов БАВ // Материалы I Всероссийской научно-практической конференции «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты», Пущино 24-25 мая. - 2007.- С.7.

10. Патент РФ № 2303061, 2007. Питательная среда для культивирования бактерий рода *Pseudomonas* // Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Асабина Е.А.

11. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Отработанные пивные дрожжи компонент сред для промышленного производства биопрепаратов – фунгицидов // Современная микология в России. Том 2. материалы второго Съезда микологов России М.: Национальная академия микологии. - 2008. – С.286.

