

УДК:576.5.664.0-637.52

ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИРОВАНИЯ ШТАММА БАКТЕРИЙ PSEUDOMONAS SP ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ

Рахматов Ф.О., Самадий С.А., Жалолова Б.Ш.*

РЕЗЮМЕ

При промышленном производстве биопрепаратов на основе бактерий р. *Pseudomonas* в агробιοтехнологии основной проблемой является высокая стоимость питательной среды, которая в конечном итоге приведет к удорожанию целевого продукта. Выходом из сложившейся ситуации является использование питательной среды, где в качестве источника азота используется автолизат отработанных пивных дрожжей, которые не находят квалифицированного применения и, в то же время содержат все незаменимые аминокислоты, а также в значительном количестве витамины группы В, РР и Е.

Ключевые слова: *Pseudomonas sp*, фитопатоген, *Fusarium culmorum* ВКМ 844, компонент, дрожжевой автолизат, типр, ферментация, метаболит, аминокислота, пептид

В качестве объекта исследования были взяты штаммы бактерий *Pseudomonas sp*, проявляющие антагонистические свойства в отношении ряда грибов-возбудителей болезней растений.

Последовательность исследований

1. Условия хранения бактерий р.*Pseudomonas*.

Культуры *Pseudomonas* поддерживали на агаризованной среде путем ежемесячных пересевов [1]. Среду стерилизовали в автоклаве при 0,1 МПа в течение 30 минут, после чего охлаждали до 40-50°C и разливали в чашки Петри. Посев культуры проводили через 2 суток методом штриха. Засеянные чашки инкубировали при 26-28°C в течение трех суток, а затем хранили в течение месяца при температуре 4°C.

Рахматов Ф.О. – Магистрант кафедры “Микробиология-Биотехнология” НУУз.

Самадий С.А. – лаборант кафедры “Микробиология-Биотехнология” НУУз.

Жалолова Б.Ш. – студентка кафедры “Микробиология-Биотехнология” НУУз.

2. Условия хранения и культивирования фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum* ВКМ 844.

Для культивирования грибов была использована жидкая агаризованная среда Чапека, содержащая 20% картофеля, 2% глюкозы и 1,5 агара в водопроводной воде, пересевая их один раз в месяц. Чашки с растущими грибами инкубировали при 28°C в течение 10 суток, после чего хранили их в холодильнике до следующего посева.

3. Условия культивирования бактерий *p.Pseudomonas*.

Эту культуру выращивали при 28°C на воздушно-термостатируемой качалке в жидкой питательной среде Кинг. Односуточный посевной материал в количестве 1 мл пересевали в колбы емкостью 250 мл со 100 мл среды, состоящей из следующих компонентов: глицерин, дрожжевой автолизат (Самаркандский пивзавод), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , и $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ в количестве, согласно плану эксперимента, и культивировали в течение трех суток при температуре 28°C.

Оптимизацию состава питательной среды проводили с применением метода математического планирования эксперимента в два этапа: построение адекватной математической модели процесса и нахождение собственно оптимального состава среды одним из известных способов [2].

Для получения адекватной модели требовалось связать выходной параметр системы (антигрибная активность, титр клеток) с входными-концентрациями компонентов ферментационной среды. Нам были взяты 4 фактора варьирования, получили полно факторный эксперимент четвертого порядка (ПФЭ⁴).

В качестве 4 факторов были взяты глицерин (X_1), дрожжевой автолизат (X_2) и компоненты среды. Уровни варьирования представлены в табл.1.

Таблица 1

Компоненты питательной среды и их уровни варьирования в ПФЭ⁴

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
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O, г/л	X ₃	5,50	1,00	10,00	4,50
KH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O, г/л	X ₄	1,50	0,50	2,50	1,00
MgSO ₄ x7H ₂ O, г/л	const=1,50				
FeCl ₃ , г/л	const=0,01				

После математической обработки опытных данных, зависимость антигрибной активности Y_1 штамма от концентрации в среде всех компонентов представляется в виде многофакторного уравнения регрессии:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + \dots + b_n X_n,$$

где X_n – содержание соответствующего компонента в среде (“+”) и (“-”) в условных единицах;

b_n – коэффициенты регрессии;

Y – активность штамма (ед/мл. среды), титр клеток (КОЕ/мл. среды).

Для их расчета пользуются формулой Йейтса:

$$b_n = \frac{\sum X_n Y_n}{N},$$

где $X_n = 1$ – значение фактора;

Y_n – величина активности штамма;

N – общее число вариантов в ПФЭ.

Следующий этап—определение оптимального состава ферментационной среды, достигаемое путем пошагового изменения концентрации компонентов в среде в зависимости от величины b_n .

Титр жизнеспособных клеток устанавливали методом предельных разведений на агаризованной среде Кинг с применением планирования эксперимента по плану 2^3 .

В качестве 3 факторов варьирования были взяты аэрация (X_1^1), температура (X_2^1) и время 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

Определение антигрибной активности метаболитов *Pseudomonas*.

После выращивания штамма *Pseudomonas* биомассы разделяли ультрафильтрации на фракцию метаболитов (≤ 3 кДа), вносили 0,5-3,0 мл в пробирки и добавляли 1 мл суспензии спор тест - гриба *Fusarium culmorum* ВКМ 844, 1мл шестикратно концентрированной среды Чапека и дистиллированную воду до общего объема 6 мл. Засеянные пробы оставляли при 28° С на 7 суток. Подавление роста гриба оценивали визуально относительно контроля.

Определение антагонистического действия культуры *Pseudomonas*.

Для этого в чашки Петри со средой ГПА содержащей: 0,5% глюкозы; 0,5% пептона; 0,4% K_2HPO_4 ; 0,2% $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ и 1,5% агар-агара в дистиллированной воде, вносили суспензию спор тест – гриба в количестве 200мкл. Чашки инкубировали в течение 2-4 суток при температуре 28°C. Количественную оценку антагонистической активности оценивали по величинам диаметра зон ингибирования роста тест –грибов. Для получения автолизата отработанные пивные дрожжи подвергали термической обработке при температуре 100°C в течение часа. Затем дрожжевой автолизат фильтруют через 2-х слойный бумажный фильтр, проверяют рН (норма 6,8-7,2) и доводят 10% -ым NaOH. Фильтрат автоклавируют при 0,5 атм в течение 30мин, проверяют высевом на МПА и выдерживают в термостате 3 суток. Полученный автолизат хранят в холодильнике. Содержание белка в автолизате определяют по методу Лоури, который сочетает в себе биуретовую реакцию на пептидные связи и реакцию Фолина на тирозин и триптофан.

Определение массовой доли азота amino групп аминокислоты низших пептидов в дрожжевом автолизате.

Для этого к 2 см прозрачного автолизата приливали 18 см дистиллированной воды и довели рН смеси до 7,0. Затем приливают 2 см приготовленной формалиновой смеси (50 см³ формалина + 1см³ 1%-ного раствора фенолфталеина и при помощи раствора 0,1н раствора гидроокиси натрия довели окраску смеси до слаборозовой) и при перемешивании потенциометрический титровали 0,1 н. раствором гидроокиси натрия до рН 9,2.

Массовую долю азота в автолизате (X) в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot K \cdot 0,0014 \cdot 100}{m},$$

где V_1 , V_2 – количество 0,1н раствора гидроокиси натрия, израсходованное соответственно на титрование испытуемой и контрольной проб;

K – поправочный коэффициент 0,0014-количество азота, эквивалентное $1\text{ см}^3 0,1\text{н}$ раствора гидрата окиси натрия, г;
 m – масса автолизата, г.

За окончательный результат испытания принимали среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова Н.С. Практикум по микробиологии Учебное пособие. – Москва.: Издательский центр “Академия” 1976 –307с.
2. Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. –Москва.: Изд-во МГУ 1969,126 с.

РЕЗЮМЕ

Pseudomonas sp ёрдамида агробиотехнологияда биопрепаратларни саноат миқёсида ишлаб чиқаришда, асосий муаммо озук муҳитининг киммтбаҳолиги ҳисобланади, бу эса албатта якуний маҳсулотнинг баҳоси киммат бўлишини таъминлайди. Бу мушкул вазиятдан чиқишнинг муқобил йўли, азот манбаи сифатида пиво ачитқиси автолизатидан фойдаланиш, чиқинди сифатидаги бу маҳсулот таркибида барча амалшинмайдиган аминокислоталар, бундан В, РР ва Е гуруҳ витаминларини ўз ичига олади.

Калит сўзлар: *Pseudomonas* sp, фитопатоген, *Fusarium culmorum* ВКМ 844, компонент, ачитқи автолизати, титр, ферментация, метаболит, аминокислота, пептид.

RESUME

With the industrial production of biologics based on bacteria p. *Pseudomonas* in agrobiotechnology, the main problem is the high cost of the nutrient medium, which ultimately leads to a rise in the cost of the target product. The way out of this situation is the use of a nutrient medium, where autolysate of spent beer yeast is used as a source of nitrogen, which do not find qualified use

and at the same time contain all essential amino acids, as well as a significant amount of vitamins B, PP and E.

Key words: *Pseudomonas sp*, phytopathogen, *Fusarium culmorum* BKM 844, component, acylation and autolysis, titer, fermentation, metabolite, amino acid, peptide.