

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ БИОСИНТЕЗА ИНГИБИТОРОВ РОСТА ФИТОПАТОГЕНОВ ПСЕВДОМОНАДАМИ

Получены математические модели биосинтеза бактерий рода *Pseudomonas*, описывающие изменение фунгицидной активности и титра клеток в зависимости от концентраций компонентов питательных сред. Дан сравнительный анализ полученных математических моделей и представлены составы оптимизированных питательных сред.

Культуры *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51, *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6 и *Pseudomonas putida* ИБ 17 являются объектами биологического контроля почвенных фитопатогенов и обладают совокупностью полезных для растений свойств, таких как синтез антифунгальных антибиотиков и рост-стимулирующих веществ [1-3].

Для промышленного производства биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas* с высоким титром клеток и наибольшей антигрибной активностью, как нами ранее было показано [4], нужно учитывать фактор наличия в питательной среде источников органического углерода и органического азота. Оптимальным источником углерода является глицерин, а в качестве источника азота предлагается использование автолизата отработанных пивных дрожжей, которые в настоящее время не находят квалифицированного применения и в то же время содержат все незаменимые аминокислоты и значительное количество витаминов различных групп.

Решение задачи оптимизации ферментационных сред и условий культивирования микроорганизмов с целью повышения выхода биомассы или (и) накопления определенных продуктов обмена веществ микроорганизмов, таких как антибиотики, практически всегда основывается на проведении многочисленных экспериментов. Применение же методов математического планирования эксперимента позволяет не только одновременно изучить действие нескольких факторов на интересующий нас процесс и количественно оценить степень этого влияния, но и решить задачу с проведением относительно малого количества экспериментов.

В настоящей работе представлены результаты оптимизации питательных сред

методом математического планирования с целью увеличения биомассы и антигрибной активности бактерий рода *Pseudomonas* и сравнительный анализ полученных моделей.

Материалы и методы

В работе использовали односуточные культуры *Pseudomonas aureofaciens* (= *P. chlororaphis*) ИБ 51, *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6, *Pseudomonas putida* ИБ 17, выращенные при 28°C и $n = 180 \text{ мин}^{-1}$ на качалке УВМТ-12-250 в жидкой питательной среде Кинг В [5], которые затем пересеивали (1 мл) в колбы емкостью 250 мл со 100 мл среды, состоящей из следующих компонентов: глицерин, дрожжевой автолизат, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , в количестве согласно плану эксперимента, и культивировали в течение трех суток при температуре 28°C.

Для получения автолизата отработанные пивные дрожжи подвергали термической обработке при 100 °C в течение часа.

Оптимизацию составов ферментационных питательных сред проводили с применением метода математического планирования эксперимента [6] в два этапа: построение адекватной математической модели процесса; нахождение собственно оптимального состава среды одним из известных способов.

Для получения простейшей адекватной модели требовалось связать выходной параметр системы (антигрибная активность, титр клеток) с входными – концентрациями компонентов ферментационной среды. В эксперименте одновременно проверяли серию вариантов ферментационных сред, в которых все компоненты (факторы) варьировались на двух количественных уровнях («верхнем +» и «нижнем -»). Для изучаемых штаммов были

проведены полные факторные эксперименты (ПФЭ) по плану 2⁴.

В качестве 4 факторов варьирования были взяты глицерин (X₁), дрожжевой автолизат (X₂), Na₂HPO₄ • 12H₂O (X₃), KН₂PO₄ • 2H₂O (X₄), уровни варьирования представлены в таблице, содержание остальных компонентов ферментационной среды было зафиксировано на следующем уровне: MgSO₄ • 7H₂O – 1,5 г/л, FeCl₃ – 0,01 г/л.

После соответствующей математической обработки экспериментальных данных зависимость антигрибной активности (титра клеток) Y₁ (Y₂) штамма от концентрации в среде всех варьлируемых компонентов представляется в виде многофакторного уравнения регрессии, являющегося по сути искомой математической моделью процесса:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n,$$

где X_n – содержание соответствующего компонента в среде в условных единицах («+1» – верхний уровень, «-1» – нижний уровень);

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

b_n – коэффициенты регрессии, отражающие степень влияния концентрации в среде n-го фактора на антигрибную активность (титр клеток) Y. Для их расчета использовалась формула Йейтса:

$$b_n = (\sum X_n Y_n) / N,$$

где X_n = 1 – значение фактора в соответствующем варианте факторного эксперимента;

Y_n – величина активности штамма в соответствующем варианте;

N – общее число вариантов в ПФЭ.

Определение оптимальных составов ферментационных сред проводили по схеме «крутого восхождения».

Титр жизнеспособных клеток устанавливали методом предельных разведений на агаризованной среде Кинг В.

Антигрибную активность проверяли известным методом [7], в качестве тест-объекта использовали фитопатогенный гриб *Bipolaris sorokiniana* (= *Helminthosporium sativum*).

Результаты и обсуждение

По результатам ПФЭ 2⁴ были вычислены коэффициенты уравнений регрессии – математических моделей зависимости функций Y₁ (антигрибная активность) и Y₂ (титр клеток) от концентрации в ферментационной среде компонентов X₁, X₂, X₃, X₄. Уравнения регрессии, с учетом значимости коэффициентов, выглядят следующим образом:

для штамма *Pseudomonas aureofaciens* 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 aureofaciens* 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

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

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

Анализируя полученные уравнения регрессии, можно увидеть некоторые закономерности: основное положительное влияние на антигрибную активность двух штаммов вида *P. aureofaciens* оказывает увеличение концентраций глицерина (X₁) и Na₂HPO₄ • 12H₂O (X₃), причем на штамм ИБ 6 дополнительное положительное влияние оказывает увеличение концентрации KН₂PO₄ • 2H₂O (X₄), а концентрация дрожжевого автолизата (X₂) соответствует опти-

Таблица. Компоненты питательной среды и их уровни варьирования в ПФЭ 2⁴

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 12H ₂ O, г/л	X ₃	5,50	1,00	10,00	4,50
KН ₂ PO ₄ 2H ₂ O, г/л	X ₄	1,50	0,50	2,50	1,00
MgSO ₄ 7H ₂ O, г/л	Постоянный уровень – 1,50				
FeCl ₃ , г/л	Постоянный уровень – 0,01				

мальному значению для штамма этого вида (т.е. изменение его концентрации в выбранных пределах не вызывает заметное, статистически значимое изменение антигрибной активности). На прирост биомассы положительное влияние оказывает увеличение концентраций дрожжевого автолизата (X_2) и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (X_3).

Несколько иначе ведет себя штамм вида *P. putida*, где положительное влияние на увеличение антигрибной активности оказывает увеличение концентраций автолизата (X_2), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (X_3) и $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (X_4), а на прирост биомассы положительно влияет увеличение концентраций компонентов X_1 и X_3 при негативном воздействии увеличения концентрации дрожжевого автолизата (X_2).

На основании уравнений регрессии зависимости антигрибной активности и реализации плана крутого восхождения были установлены оптимальные составы питательных сред (в г/л):

для штамма *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51
глицерин – 11,30;
дрожжевой автолизат – 0,11; Na_2HPO_4 – 6,96;
 KH_2PO_4 – 1,58; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,5;
 FeCl_3 – 0,01; pH 7,4;

для штамма *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6
глицерин – 11,53; дрожжевой автолизат – 0,13; Na_2HPO_4 – 6,14;
 KH_2PO_4 – 1,60; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,5;
 FeCl_3 – 0,01; pH 7,4;

для штамма *Pseudomonas putida* ИБ 17
глицерин – 11,00;
дрожжевой автолизат – 0,16;
 Na_2HPO_4 – 6,23;
 KH_2PO_4 – 1,89; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,5;
 FeCl_3 – 0,01; pH 7,4.

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 КЖ соответственно для штаммов ИБ 51, ИБ 6 и ИБ 17, что вполне удовлетворяет условиям промышленного культивирования микроорганизмов.

Список использованной литературы:

1. Патент РФ №2203945, Б.И. №13, 2003. Штамм бактерий *Pseudomonas aureofaciens* для получения препарата против заболеваний пшеницы, вызываемых грибами фитопатогенами / Логинов О.Н., Свешникова Е.В., Силищев Н.Н., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф.
2. Патент РФ №2260951, Б.И. №27, 2005. Штамм бактерий *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6 – продуцент цитокининов / Логинов О.Н., Мелентьев А.И., Свешникова Е.В., Кузьмина Л.Ю., Четвериков С.П., Васильева Н.С., Силищев Н.Н.
3. Патент РФ №2213774, Б.И. №28, 2003. Штамм бактерий *Pseudomonas putida* для получения препарата против заболеваний пшеницы, вызываемых грибами фитопатогенами / Логинов О.Н., Свешникова Е.В., Силищев Н.Н., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф., Исаев Р.Ф.
4. Логинов О.Н., Четвериков С.П. Биосинтез низкомолекулярных метаболитов бактериями *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 // Биотехнология. – 2003. – №5. – С. 22-25.
5. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin // J. Lab. Clin. Med. – 1954. – V. 44. – P. 301-307.
6. Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М., 1969; 126 с.
7. Широков А.В., Логинов О.Н., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. Белковые и пептидные факторы *Bacillus sp.* 739 – ингибиторы роста фитопатогенных грибов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, №2. – С. 161-165.

Статья рекомендована к публикации 07.03.08