

ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИИ *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* 2006 НА МЕЛАССЕ И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ЕЕ СВОЙСТВ

Показана возможность использования мелассы в качестве основного компонента среды для культивирования бактерии *Pseudomonas aureofaciens* 2006. Подобраны оптимальные концентрации мелассы и источников азотного (NaNO_3) и фосфорного (KH_2PO_4) питания, при которых прирост биомассы максимален. Полученная бактериальная суспензия оказывает положительное влияние на развитие семян пшеницы и обладает антифунгальным действием к ряду фитопатогенов.

Ключевые слова: *Pseudomonas aureofaciens*, меласса, культивирование, биомасса, фитопатогены, антифунгальные свойства.

За последнее время во всем мире, в том числе и в России, неизмеримо вырос интерес к проблемам микробиологии в сельском хозяйстве. Значительно расширилось представление о роли микроорганизмов в жизни растений [1]. Все большее значение отводится замене химических средств защиты биологическими. Широкое применение находит использование микробов-антагонистов, эффективных в малых концентрациях [2]. Стимуляцию роста и развития растений, а также их защиту от фитопатогенов можно усилить искусственным внесением в почву биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas*, синтезирующих большое количество различных метаболитов и являющихся наиболее изученными и применяемыми в области биометода. Флуоресцирующие псевдомонады синтезируют большое количество соединений, оказывающих ростостимулирующее действие на растения, либо угнетающих развитие фитопатогенных грибов [3, 4]. Для культивирования бактерий требуются богатые по составу питательные среды с дрожжевым экстрактом, глюкозой, пептоном. С целью снижения себестоимости конечного продукта возможно использование более дешевых субстратов, например, отходов пищевого производства – послеспиртовая барда [5], свекловичная меласса, молочная сыворотка. Однако нестандартное сырье имеет несбалансированный состав минеральных веществ, повышенную кислотность. Поэтому при использовании в качестве основы питательной среды необходимо оптимизировать его состав и условия культивирования микроорганизмов.

Цель работы

Изучение роста бактерии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на мелассной среде и определение ростостимулирующих и фунгицидных свойств полученной бактериальной суспензии.

Задачи исследования:

1. Оптимизировать состав питательной среды на основе мелассы, обеспечивающий максимальный прирост биомассы бактерии в условиях глубинного культивирования.
2. Определить влияние полученной бактериальной суспензии на развитие семян пшеницы в лабораторных условиях и изучить ее антифунгальные свойства.

Объект и методы исследования

Объектом исследования служила бактерия *Pseudomonas aureofaciens* 2006, выделенная из почвы и отселекционированная на кафедре биотехнологии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева» (подана заявка на депонирование). В ходе эксперимента по оптимизации состава среды рассматривали варианты с концентрацией мелассы 10, 20, 30, 40, 50 и 60 г/л, полученной с Ромодановского сахарного завода Республики Мордовия.

Известно, что бактерии используют как нитратный, так и аммонийный азот [6]. При оптимизации в раствор мелассы добавляли NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и NH_4NO_3 в концентрации 1, 2 и 3 г/л. В качестве источника фосфорного питания вносили KH_2PO_4 с содержанием 1; 1,5; 2 и 2,5 г/л. Культивирование микроорганизма проводили в термостатируемом шейкере-инкубаторе ES-20/60 BioSan (Латвия) при 150 об/мин и 29 °С в течение 24 часов. Инокулят выращи-

вали на жидкой питательной среде Кинга. Начальный рН сред 6.8 – 7.0. Для создания условий, приближенных к промышленным, культивирование осуществляли в биореакторе фирмы Biostat A plus (Germany) при различных режимах работы мешалки (150, 180, 200 мин⁻¹). В пробах периодически (каждые 2 часа) измеряли биомассу гравиметрическим методом (электронные лабораторные (аналитические) весы Shimadzu AUX 220, Japan), проводили микроскопирование культуры.

Для оценки ростостимулирующего эффекта семена пшеницы сорта Тулайковская-10 (род *Triticum L.*, относящийся к семейству злаковые – *Gramineae Juss*) коммерческой партии в количестве 100 штук обрабатывали бактериальной суспензией, разведенной водопроводной водой в соотношении 1:100. Контроль – обработка семян водой. На 3 и 7 сутки определяли энергию прорастания и всхожесть по ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести» [7]. Семена проращивали в климатической камере Sanyo MLR-351 H (Japan).

В качестве тест-объектов при исследовании антифунгальных свойств полученной бактериальной суспензии использовали следующие фитопатогены: *Fusarium culmorum*, *Alternaria solani* A₇МУК₃, *Alternaria solani* A₇МУК₄, *Alternaria tenuissima* A₇A_xT₁1g*, *Alternaria infectoria* A₇A_kT₁103/2, *Alternaria alternata* A₇A_xT₁g₁1g, предоставленные сотрудниками кафедры микологии и альгологии ФГБОУ ВПО «МГУ имени М.В. Ломоносова». Совместное поверхностное культивирование проводили на картофельно-

глюкозном агаре при 25–27 °С в течение 7 суток в термостате электрическом суховоздушном ТС-1/80 СПУ (Россия). Фитопатогены засекали блочками, бактериальную суспензию наносили по краю чашки сплошной линией. Степень ингибирования определяли по зоне отсутствия роста грибов. Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали с использованием стандартных программ.

Результаты и их обсуждение

Уровень биомассы клеток при культивировании микроорганизмов зависит от ряда причин, одной из которых является доступность субстрата и его оптимальное количество. Полученные результаты показали прямую зависимость прироста биомассы от увеличения концентрации мелассы в среде. Максимальный уровень биомассы отмечен на 23 часа культивирования в вариантах с концентрацией субстрата 40, 50, 60 г/л и составил в среднем 10,1±0,3 г/л, что более чем в 1,5 раза выше значений при 10 и 20 г/л (рисунок 1).

В дальнейших исследованиях при подборе источников азота с экономической точки зрения использовали мелассу в концентрации 40 г/л.

В составе мелассы находится 1,1–1,5% азота, причем третья часть его находится в форме бетаина, использовать который в качестве источника азота микроорганизмы, как правило, не могут. Также в мелассной золе сравнительно мало фосфора [8]. Внесение азотных и фосфорных солей позволяет оптимизировать среды, приготовленные на нестандартном сырье.

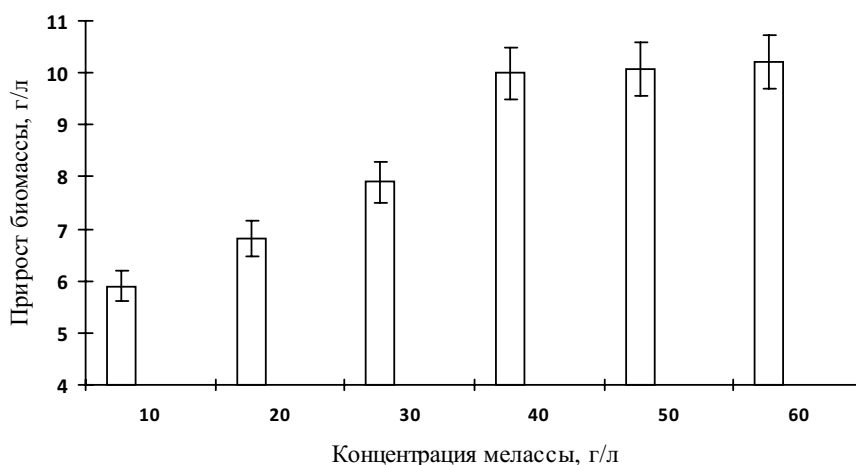


Рисунок 1. Максимальный прирост биомассы

Добавление в среду источника азота интенсифицировало рост культуры. Лучший результат отмечен в варианте с нитратной формой при концентрации 2 г/л (12,5 г/л). Титр активных клеток составил в среднем 10^9 – 10^{10} КОЕ/мл. При использовании аммонийного азота прирост биомассы составил в среднем на 9,5% меньше предыдущего варианта. В варианте с нитратом аммония максимум биомассы составил 11,4 г/л при концентрации 2 г/л (рисунок 2).

Дополнительное внесение фосфорнокислого калия также вызвало увеличение роста исследуемой культуры. При концентрации соли 2,5 г/л на 19 часы роста уровень биомассы составил 15,4 г/л с максимальным титром $7,1 \times 10^{11}$ КОЕ/мл. При уменьшении концентрации соли до 1,5 г/л содержание биомассы снизилось на 17,7%.

В следующей серии опытов культивирования *P. aureofaciens* 2006 проводили в полупромышленных биореакторах на среде оптимального состава (меласса – 40 г/л, NaNO_3 – 2 г/л, KH_2PO_4 – 2,5 г/л) при различных режимах работы мешалки. Во всех вариантах максимальное содержание микробной массы и высокий титр клеток наблюдался на 21 ч. роста (таблица 1). Микроскопические исследования показали наличие большого содержания грамотрицательных палочек в поле зрения.

При режиме 180 мин^{-1} уровень биомассы составил 15,1 г/л, что на 8,0 и 14,6% выше, чем в вариантах со 150 и 200 мин^{-1} соответственно. В первые часы культивирования значения pH снизилось на 0,8 единиц и в дальнейшем оставалось на уровне 5,2 до конца процесса.

Таким образом, при использовании мелассы в качестве основы питательной среды для культивирования *P. aureofaciens* 2006 необходимо внесение минеральных солей NaNO_3 и KH_2PO_4 , обеспечивающих увеличение прироста биомассы и количества жизнеспособных клеток. В процессе культивирования в биореакторе данный результат достигался при режиме работы мешалки 180 мин^{-1} .

Известно, что различные штаммы бактерии *P. aureofaciens* способны синтезировать вещества гормональной природы, оказывающие положительное действие на развитие растений [3, 9, 10]. Для выявления ростостимулирующих свойств исследуемого штамма проводили обработку семян пшеницы сорта Тулайковская-10. Титр клеток бактериальной суспензии составлял 10^9 – 10^{10} КОЕ/мл.

Бактеризация семян псевдомонадами способствовала ускорению их развития. Значения энергии прорастания и всхожести опытных вариантов превысили контрольные на 20 и 18% соответственно. В опытном варианте наблюдалось увеличение вегетативной части растений и длины корня (рисунок 3).

Наличие фунгицидных свойств у бактерий обуславливает эффективность их использования в качестве агентов биоконтроля. В процессе роста растения подвергаются действию фитопатогенов, развивающих различного рода заболевания, приводящих к их гибели. Бактерии рода *Pseudomonas* синтезируют широкий спектр первичных и вторичных метаболитов, к которым можно отнести антибиотики (в-лактоны), аминогликозиды, монолактамы, сидерофоры, псевдомоновые кислоты [11, 12, 13, 14].

Исследования, проведенные при совместном культивировании *P. aureofaciens* 2006 с фитопатогенами, показали, что бактерии способны подавлять рост патогенов.

Таблица 1. Титр клеток бактериальной суспензии, КОЕ/мл

Количество оборотов мешалки, мин^{-1}	Время культивирования, ч			
	17	19	21	23
150	$1,2 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^{10}$	$6,0 \cdot 10^9$
180	$5,3 \cdot 10^8$	$6,6 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^{11}$	$4,0 \cdot 10^{10}$
200	$4,1 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^{10}$	$9,0 \cdot 10^9$

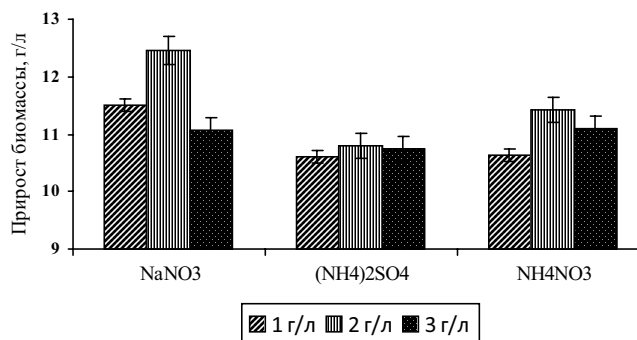


Рисунок 2. Максимальный прирост биомассы *P. aureofaciens* 2006 на среде с разными источниками азота

тогенами, показали наличие антифунгальных свойств, степень проявления которых различна в отношении определенной тест-культуры. Наиболее выраженным антагонизмом бактерия обладала к *Alternaria alternata* A₇A_xT₁g₁1g, которая является возбудителем заболеваний растений, относящихся к пасленовому семейству [15] (рисунок 4). Здесь зона ингибирования составила 26 мм. Меньшее воздействие отмечено на фитопатоген *Alternaria infectoria* A₇A_kT₁103/2, рост гриба ингибировался при тесном контакте с *P. aureofaciens* 2006. По мере сближения микроорганизмов мицелий гриба становился рыхлым, стелющимся по поверхности агара.

Для фитопатогенов *Fusarium culmorum*, *Alternaria solani* A₇МУК₃, *Alternaria solani*

A₇МУК₄ и *Alternaria tenuissima* A₇A_xT₁1g* отмечено значимое снижение степени их развития. Зона ингибирования в среднем составляла 17–20 мм.

Можно предположить, что различия в антагонистическом действии нового штамма псевдомонад на тест-культуры обусловлено разной степенью восприимчивости микромицетов к бактериальным метаболитам.

Заключение

Таким образом, показана возможность использования мелассы в качестве основы питательной среды взамен дорогостоящего сахаросодержащего сырья, что позволяет снизить себестоимость технологического процесса полу-

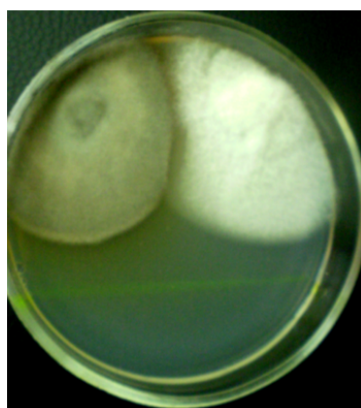


опыт



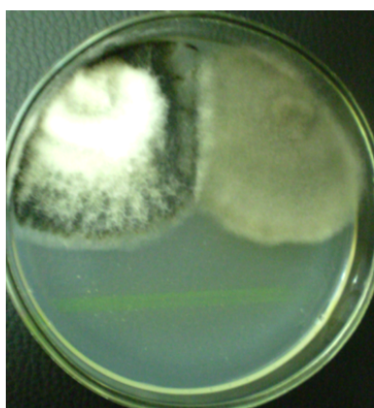
контроль

Рисунок 3. Проросшие семена пшеницы Тулайковская-10 (7 суток)



Alternaria solani
A₇МУК₃

Fusarium culmorum



Alternaria tenuissima
A₇A_xT₁1g*

Alternaria solani
A₇МУК₄



Alternaria alternata
A₇A_xT₁g₁g

Alternaria infectoria
A₇A_kT₁103/2

Рисунок 4. Рост культур при совместном культивировании

чения биопрепарата на основе бактерии *P. aureofaciens* 2006. Полученная бактериальная суспензия оказывает выраженное стимулирующее действие на развитие семян пшеницы. Зоны ингибирования роста фитопатогенов

свидетельствуют о наличии антифунгальных свойств исследуемого штамма бактерии, степень действия которых различна в зависимости от тест-культуры.

10.04.2012

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «У.М.Н.И.К. 2011» (договор № 13168) и «Старт 11» (гос контракт № 9318 р/ 15161) в лаборатории «Промышленной биотехнологии» НОЦ «Нанобиотехнологии»

Список литературы:

1. Тихонов И.А., Кожемяков А.П., Чеботарь В.К. и др. Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве). – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 154 с.
2. Романенко, Н.Д. Перспективы использования бактерий-антагонистов против наиболее фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов / Н.Д. Романенко, И.О. Попов, С.Б. Таболин, Е.Н. Бугаева // АГРО XXI. – 2008. – №1–3. – С. 23–27.
3. Боронин, А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №10. – С. 25–31.
4. Andrews J.H., Harris R.F. The ecology and microbiology of microorganisms on plant surface // Annu. Rev. Phytopathol. – 2000. – Vol. 38. – P. 145–180.
5. Лукаткин, А.А. Культивирование бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на постлеспиртовой барде / А.А. Лукаткин, С.А. Ибрагимова, В.В. Ревин // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития: Матер. Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Киров, 27–29 ноября 2007 г. – Киров, 2007. – Вып. 5, Ч. 2. – С. 359–360.
6. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. Т. 2. / [Н. Криза, П. Смита]; под ред. Дж. Хоулта, перевод с англ. под ред. Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1997. – 430 с.
7. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести – Взамен ГОСТ 12038-66; введ. 1986-07-01; с изм. 1990-06-01, 1995-03-01. – М.: Издательство стандартов, 2004.
8. Химический каталог. Введение в биотехнологию [Электронный ресурс] / Автор М.Е. Бекер. – Copyright ©, 2012. – Режим доступа: http://www.ximicat.com/ebook.php?file=becer_bio.djvu&page=26, свободный. – Загл. с экрана.
9. Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria // Crit. Rev. Microbiol. – 1995. – Vol. 21. – №1. – P. 1–18.
10. Katsy, E. Participation of Auxins in Regulation of Bacterial and Plant Gene Expression // Russian Journal of Genetics. – 1997. – Vol. 33, №5. – P. 463–474.
11. Boruah H., Kumar B. Biological activity of secondary metabolites produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* II Folia Microbiol (Praha). – 2002. – Vol. 47. – P. 359–363.
12. Jousset A., Lara E., Wall L., Valverde C. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO to escape protozoan grazing // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 72, №11. – P. 7083–7090.
13. Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria // New Phytologist. – 2003. – V. 157. – P. 503–523.
14. Paulitz T., Nowak-Thompson B., Gamard P., Tsang E., Loper J. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens // J. Chem. Ecol. – 2000. – V. 26. – P. 1515–1524.
15. Дьяков, Ю.Т. Общая и молекулярная фитопатология: Учеб. пособие / Ю.Т. Дьяков, О.Л. Озерецковская, В.Г. Джавахия, С.Ф. Багирова. – М.: Изд-во Общество фитопатологов, 2001. – 302 с.

Сведения об авторах:

Бурова Юлия Александровна, аспирант кафедры биотехнологии Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарева, e-mail: burova13@gmail.com

Ибрагимова Светлана Александровна, доцент кафедры биотехнологии Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарева, кандидат биологических наук, e-mail: ibragimova-s@yandex.ru

Ревин Виктор Васильевич, профессор кафедры биотехнологии Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарева, доктор биологических наук, e-mail: biotesh@moris.ru 430032, г. Саранск, ул. Ульянова, 266

UDC 579.841.11

Burova Y.A., Ibragimova S.A., Rev V.V.

Mordovian N.P. Ogareva State University, e-mail: Burova13@gmail.com

PRODUCTION A BACTERIAL SUSPENSION *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* 2006 ON MOLASSES MEDIUM AND STUDY OF ITS SEVERAL PROPERTIES

The possibility of using molasses as the main component of the cultural medium of the bacteria *Pseudomonas aureofaciens* 2006. Optimal concentrations of molasses, nitrogen (NaNO_3) and phosphorus (KH_2PO_4) sources at which the maximum increase in biomass were chosen. Bacterial cultural medium stimulates the growth of wheat and processes of antifungal effect.

Key words: *Pseudomonas aureofaciens*, molasses, cultivation, biomass, phytopathogens, antifungal effect.