

Изучение роста бактерий рода *Pseudomonas* в периодическом гомогенном глубинном культивировании

Е. М. Спиридонова*, Т. Н. Кузнецова

НВП «БашиИнком»

Россия, Республика Башкортостан, 450015 г. Уфа, улица К. Маркса, 37к1.

*Email: katerina26803@mail.ru

Для получения биомассы бактерий рода *Pseudomonas* с высоким уровнем антагонистической активности к фитопатогенам предложено культивирование штамма *Pseudomonas aureofaciens* ИМВ 2687, выделенного из ризосферы капусты, в жидких питательных средах.

Ключевые слова: бактерии, биофунгицид, антагонистическая активность, корневые гнили, фитопатогены.

Бактерии рода *Pseudomonas* широко используются в сельскохозяйственной практике в качестве биофунгицидов, поскольку они синтезируют вещества, обладающие антибиотическими свойствами, например: пиоцианин, хлорорафин, оксихлорорафин, феназин-1-карбоновая кислота и эругинозин [1]. Все перечисленные химические вещества являются пигментами с различной окраской и обладают антибиотической активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов, некоторые штаммы обладают инсектицидной активностью [2].

Псевдомонады обладают также ростостимулирующим действием, входят в ризосферную зону растений и повышают их стрессоустойчивость. К окрашенным веществам, синтезируемым псевдомонадами, относятся также витамины. В состав желто-зеленого флуоресцирующего пигмента, синтезируемого псевдомонадами, входят рибофлавин, фолиевая кислота и птерин [1].

В связи с большой практической значимостью бактерий рода *Pseudomonas* является актуальным изучение процессов культивирования в жидких питательных средах для получения биомассы бактерий с высоким уровнем физиологической активности.

Цель и задачи исследования – изучение процесса жидкостного культивирования бактерии рода *Pseudomonas* вида *aureofaciens* штамма ИМВ 2687 в жидкой питательной среде для получения биомассы с высоким уровнем антагонистической активности к фитопатогенам. Поставлены **следующие задачи**:

- Изучение динамики роста и культуральных свойств штамма *Pseudomonas aureofaciens* ИМВ 2687 в процессе культивирования (рН, титр КОЕ, антагонизм, морфология колоний),

- Выделение вариантов штамма по окраске и архитектонике колоний,
- Сравнительный анализ вариантов штамма по уровню их антагонистической активности к фитопатогенам и биологической эффективности на проростках пшеницы.

Материалы и методы. Объектом исследования служил штамм *Pseudomonas aureofaciens* ИМВ 2687, который не является ГМО и относится к микроорганизмам, непатогенным для человека. Работа с ним не требует специальных мер предосторожности.

Способ культивирования бактерий рода *Pseudomonas* предусматривает приготовление жидкой питательной среды, содержащей пептон, глицерин, минеральные соли и воду при заданном соотношении компонентов. Проводят засев микроорганизмами полученной питательной среды с последующим культивированием при температуре 28–30°C в течение 30–42 ч.

Антагонистическую активность к тестовым штаммам фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum* и *Helminthosporium sativum* определяли методом «in vitro» в тесте отсроченного антагонизма методом колодцев.

Биологическую эффективность на проростках пшеницы определяют рулонным методом согласно к ГОСТу 12044–93: обрабатывают семена на 2–3 часа штаммом *Pseudomonas aureofaciens* ИМВ 2687. Для создания искусственного фона заражают семена смесью фитопатогенов (гильментоспориз+фузариоз) титр патогенов $1 \cdot 10^6$ кл/мл согласно схеме опыта, затем раскладывают семена в рулоны и убирают под свет.

На 7-е сутки определяют пораженность семян фитопатогенами на естественном и искусственном (зараженном фитопатогенами) фоне, рассчитывают по формуле биологическую эффективность, распространенность, развитие болезни согласно методике ВИЗР и снимают биометрические показатели, длину надземной и подземной части, биомассу общую, надземной и подземной части проростка.

Показатель биологической эффективности (Э) показывает, на сколько процентов данный препарат снижает распространение или развитие болезни по сравнению с контролем (без обработки).

Для ее расчета используют формулу Аббота, которая включает влияние и других факторов, снижающих болезнь в контроле:

$$\text{Э}\% = (K - O / K) \cdot 100,$$

где: Э = биологическая эффективность,

К = развитие (пораженность) болезни в контроле (без обработки),

О = развитие (пораженность) болезни в испытываемом варианте после обработки.

Результаты и обсуждения. Культурально-морфологические признаки штамма *Pseudomonas aureofaciens* ИМВ 2687: граммотрицательные палочки, подвижные; на МПА образует колонии гладкие, круглые, блестящие, пастообразные. Культура образует диффундирующий в среду красно-оранжевый пигмент (смесь феназин-карбоновых кислот). В сельском хозяйстве штамм используется как биофунгицид и инсектицид, поскольку обладает фунгицидной активностью, а также энтомопатогенной активностью в отношении яблоневого плодового жука и колорадского жука.

Выращивание биомассы штамма проводили на полусинтетической питательной среде с пептоном, в ферментере АК-10 с принудительной аэрацией и перемешиванием, в течение 44 часов при температуре $(30 \pm 1)^\circ \text{C}$ (условия культивирования штамма в ферментере: МПБ, температура $28\text{--}30^\circ \text{C}$, перемешивание 200 об/мин.).

В процессе культивирования не происходило изменения морфологических свойств штамма, клетки оставались мелкими, подвижными, одиночными. Однако прослеживалось изменение их биохимических и культуральных свойств. На 12–14 часах роста на плотных питательных средах была выявлена заметная диссоциация популяции по архитектонике колоний на плотной питательной среде [4]. До 80% колоний оставались гладкими, круглыми, блестящими, пастообразными, образующими диффундирующий в среду красно-оранжевый пигмент (смесь феназин-карбоновых кислот), 10% колоний имели белый цвет и кашицеобразное состояние. После 16 часов роста диссоциации выявлено не было. Культуральная жидкость имела красно-оранжевый цвет, рН среды более 8,0, при отстаивании обнаруживался слизистый осадок клеток культуры.

В процессе культивирования титр КОЕ достиг максимального значения на 28 часах роста ($\text{КОЕ} = 3.8 \times 10^9$) с появлением красного пигмента в ферментере. Максимальное накопление антагонистической активности культуральной жидкости к грибам *Fusarium culmorum* и *Helminthosporium sativum* наблюдалось к 42–44 часам роста при снижении титра КОЕ до 1×10^9 (рис. 1).

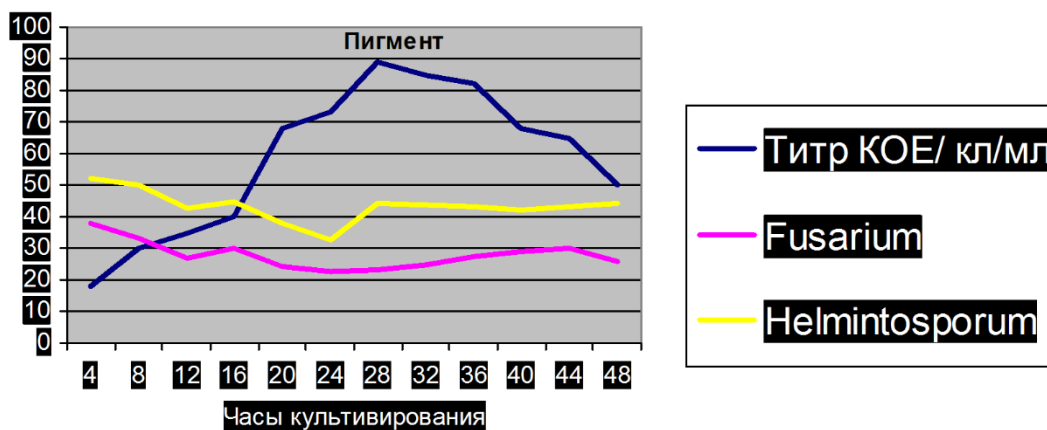


Рис. 1. Динамика роста *Pseudomonas aureofaciens* ИМВ 2687 в процессе культивирования (ось X – часы культивирования, ось Y – зона задержки роста грибов, мм).

Снижение температуры культивирования до $(26 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ приводило к изменению цвета культуральной жидкости на ярко желтый, диссоциация выявлена с 10 часов и далее сохранялась на протяжении всего процесса культивирования. При титрации культуральной жидкости на плотной питательной среде выявлены 3 типа колоний: красные с ровными краями средней величины – до 20%, крупные слизистые кремового цвета колонии – 38%, которые через 2 суток изменили цвет на зеленый и мелкие прозрачные колонии до 40%. Мелкие прозрачные колонии при последующих посевах на твердую питательную среду не образовывали пигмента, образовывали много слизи [3].

Полученные диссоцианты были выделены в чистой культуре: Вар 1 дающий зеленый пигмент и Вар 2 – образующий мелкие бесцветные колонии, Культивирование диссоциантов проводили также в течение 44 часов. Культуральная жидкость на основе Вар 1 – зеленого цвета, с $\text{pH} = 5.6$, на основе Вар 2 – культуральная жидкость без пигмента с $\text{pH} = 7.2$. Титр КОЕ культуральной жидкости колебался незначительно и составил к окончанию культивирования $(1.5-2.4) \times 10^9$ кл/мл.

Проведено изучение антагонистической активности исходного штамма *Ps. aureofaciens* ИМВ 2687 и выделенных из него диссоциантов Вар 1 и Вар 2 к тестовым штаммам фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum* и *Helminthosporium sativum*. Полученные данные представлены в таблице №1.

Таблица 1. Антагонистическая активности штамма *Ps* ИМВ 2687 и его диссоциантов, мм

Пробы	Штамм <i>Ps</i> ИМВ 2687			Вариант №1			Вариант №2		
	-1-	-3-	-5-	-1-	-3-	-5-	-1-	-3-	-5-
Разведения									
<i>Fusarium</i>	23	20	12	32	23	20	30	24	15
<i>Helminthosporium</i>	34	30	22	60	58	30	50	28	24

Как следует из представленных данных, антагонистическая активность вариантов штамма Вар1 и Вар 2 превосходила исходный штамм.

Проведено изучение биологической эффективности против корневых гнилей культуральной жидкости на основе исходного варианта штамма *Ps. aureofaciens* ИМВ 2687 и выделенных из него диссоциантов (Вар 1 и Вар 2) на проростках пшеницы. Данные представлены в таблице №2.

Биологическая эффективность Вар 1 составила 43.4% , а у Вар 2–42.0%, у исходного штамма БЭ = 23.8%. Высокий уровень биологической эффективности Вар 1 и Вар 2 сопровождался высоким уровнем ростостимулирующей активности культуральной жидкости.

Таблица 2. Биологическая эффективность штаммов против корневых гнилей в модельном опыте на проростках пшеницы

Показатели	Штамм Ps ИМВ 2687	Вариант №1	Вариант №2
Биологическая эффективность, %	23.8	43.4%	42.0
Ростостимулирующая активность			
Длина побегов, %	104.2±0.41	106.2±0.37	107.2±0.32
Кол-во корней, 5	101±2.2	101±1.7	103±2.5
Биомасса побега	101±2.5	103±2.1	105±0.3
Биомасса корня	102±0.5	104±0.9	105±0.2
Общая биомасса	101±3.7	100±2.4	111±4.4

Таким образом, в процессе жидкостного культивирования штамма *Ps. aureofaciens* выявлена диссоциация по пигментации и архитектонике колоний на 4 морфологических варианта. Из них 2 варианта (Var 1 и Var 2) обладают более высокой антагонистической и биологической активностью по сравнению с исходным штаммом и не диссоциировали в процессе жидкостного культивирования.

В настоящее время продолжается изучение культуральных и биохимических свойств вариантов штамма *Ps. aureofaciens* с целью получения нового производственного штамма («природного мутанта»), который не подвержен диссоциации, как другие, и стабильно проявляет наиболее сильный антагонизм к возбудителям корневых гнилей.

Литература

1. Бороздина И. Б. «Сравнительная характеристика бактерий рода *Pseudomonas* при культивировании на искусственных питательных средах», – Вестник ВГУ, серия химия, биология, фармация, 2010, №2.
2. Бухарин О. В., Гриценко В. А. «Экологическая детерминированность внутривидового разнообразия патогенных бактерий», – Журн. Микробиол., эпидемиол., и иммунобиол., 2000, №1, С. 103–106.
3. Варвашевич Т. Н., Ковтун Г. Ю и др. «Возможные механизмы адаптации микробных популяций к низким положительным температурам», – Микробиол. журн., 1991, т.53, №1, С. 22–27.
4. Милько Е. С., Егоров Н. С. «Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации», – М. Изд-во МГУ, 1991, 142 с.

The study of bacterial *Pseudomonas* growth in periodic homogeneous deep cultivation

E. M. Spiridonova*, T. N. Kuznetsova

SIP «Bashinkom»

37k1 K. Marx Street, 450015 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**Email: katerina26803@mail.ru*

We offer strain *Pseudomonas aureofaciens* ИМБ 2687 cultivation for bacterial biomass production with high antagonistic activity level against phytopathogens selected from the cabbage rhizosphere in liquid nutrient medium.

Keywords: bacteria, biological fungicide, antagonistic activity, root rots, phytopathogens.