

## Изучение антагонистической активности бактерий рода *Bacillus* в процессе жидкостного культивирования.

Е. В. Минлигареева\*, Т. Н. Кузнецова

*НВП «БашиИнком»*

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

*\*Email: missis.ladykolos@ya.ru*

Настоящая статья посвящена разработке технологии получения биологического препарата на основе штамма бактерий рода *Bacillus subtilis*. В ходе исследования изучалась динамика роста бактериальных популяций. Определяли каждые два часа рН, титр, антагонистическую активность культуральной жидкости. Контролируется стабильность титра, антагонистическая активность в интервале времени до 4 лет хранения.

**Ключевые слова:** антагонизм, биологическая активность, титр КОЕ.

В настоящее время основным средством повышения урожая сельскохозяйственной продукции является использование химических средств защиты растений от болезней и вредителей. Однако возрастающее загрязнение окружающей среды, рост заболеваний животных и человека, рост наследственных и онко-заболеваний требуют незамедлительного снижения их применения.

Наиболее перспективным направлением в разработке экологически безопасных средств защиты растений является использование биологических препаратов, действующим началом которых являются живые бактерии, выделенные из эндотканей здоровых растений и обладающие высокой антагонистической активностью к фитопатогенным грибам и бактериям. Использование препаратов из «полезных» эндофитных бактерий совершенно безопасно для окружающей среды [1].

Для получения биопрепарата необходимо получить высокоэффективный штамм и разработать технологию его культивирования с целью получения максимального титра КОЕ биомассы и максимального уровня антагонистической активности [2].

Использование жидкофазного культивирования является наиболее эффективным методом получения биомассы, т.к. менее затратное, менее продолжительное и в составе получаемого продукта содержится не только споровая биомасса производственного штамма, но и синтезированные ею метаболиты, что увеличивает эффективность получаемой биомассы [3].

**Целью** нашего исследования являлась отработка условий культивирования производственных штаммов, почасовая проверка в ходе культивирования титра и антагонисти-

ческой активности с целью выбора наилучших условий для культивирования и отработки технологии культивирования [4].

Материалом исследования являлась культуральная жидкость, производственных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 26Д, 1К, Б2, полученная методом гомогенного глубинного культивирования на полусинтетической питательной среде в ферментерах АК-10 в условиях термостатирования с принудительной аэрацией.

Динамику роста бактериальных популяций отслеживали каждые 2 часа, путем взятия выемок культуральной жидкости. В пробах определяли: титр КОЕ, pH, морфологию и архитектуру колоний [5–6]. Антагонистическую активность определяли методом отсроченного антагонизма на диагностической среде в отношении тестовых штаммов фитопатогенных грибов: *Fusarium culmorum* и *Helminthosporium sativum* [7].

Результаты и обсуждение. Динамика роста штаммов *Bacillus subtilis* 26Д, 1К, Б2 в процессе гомогенного глубинного культивирования практически не отличалась. Графики представлены на рисунках 1–3. Первые 2–4 часа культивирования наблюдалась латентная фаза (лаг-фаза), экспоненциальная фаза – стадия активного роста составляла 2 часа, продолжительность стадии замедления скорости роста составляла 16–18 часов – наиболее продуктивная фаза по нарастанию биомассы и продукции антибиотических веществ. На стадии активного роста, на 12ч у культуральной жидкости штамма 26Д отмечается максимально высокий титр КОЕ =  $3.3 \times 10^9$ R и антагонизм к фитопатогенным грибам, который составил к *Helminthosporium sativum* 24–28.5 мм (зона задержки роста), к *Fusarium culmorum* – 17–19.5 мм.

Максимальный титр КОЕ у штамма 1К наблюдался на 16 часах роста и составил  $9.0 \times 10^8$ R, при этом антагонистическая активность культуральной жидкости к *Helminthosporium sativum* составила 20–26 мм.

Максимальный титр КОЕ штамма Б2 отмечался на 22 часах роста и составил  $1.8 \times 10^9$ R, при этом антагонистическая активность к грибу *Helminthosporium sativum* составила 28–36 мм. Данная культура отмечается длительным ростом (22 часа), что нетехнологично для производства.

У культуральной жидкости штаммов 26Д, 1К, Б2, на разных часах культивирования оценивали биологическую эффективность защиты от корневых гнилей на проростках пшеницы методом рулонов (ГОСТ 12044–93). У штамма 26Д максимальная биологическая активность (41.1%) отмечена у культуральной жидкости на 12 часах, у штамма 1К на 16 часах культивирования максимальная биологическая активность составила – 35.4%, у штамма Б2 на 20 часах – 23.9%.

Для производства препарата мы остановили свой выбор на штаммах 26Д и 1К, данные штаммы отмечаются быстрым ростом (12–16ч), стабильным и необходимым для про-

изводства биологического препарата титром и антагонизмом, а так же высокой биологической активностью.

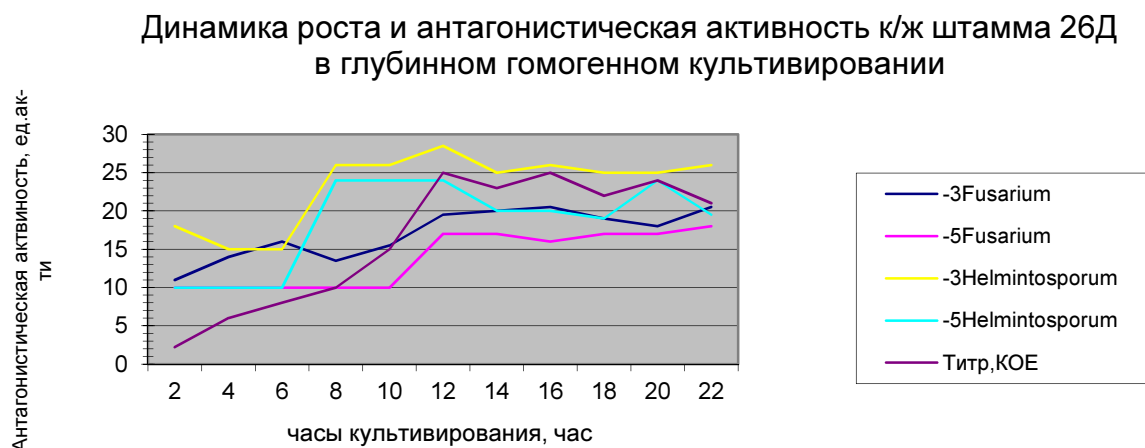


Рис. 1. Динамика роста и антагонистическая активность к/ж штамма 26Д в глубинном гомогенном культивировании.

Как следует из рисунка: 2–4ч. – латентная фаза, 4–10 ч. – экспоненциальная фаза, 12ч начало стационарной фазы – наблюдаем 100% переход в споры, максимальная антагонистическая активность.

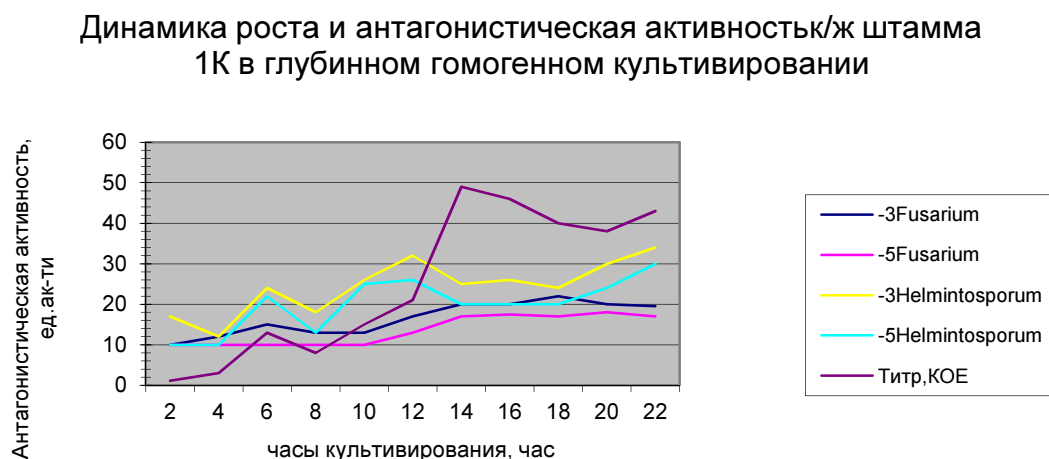


Рис. 2. Динамика роста и антагонистическая активность к/ж штамма 1К в глубинном гомогенном культивировании.

Как следует из рисунка: 2–4ч. – латентная фаза, 4–6ч – экспоненциальная фаза, с 6–16 часов стационарная фаза. С 16 часов начинается фаза замедления роста. На 22ч максимальная антагонистическая активность к грибу Helmintosporium. По грибу Fusarium максимальный антагонизм на 18, 20 часах.

Динамика роста и антагонистической активности к/ж штамма Б2 в глубинном гомогенном культивировании

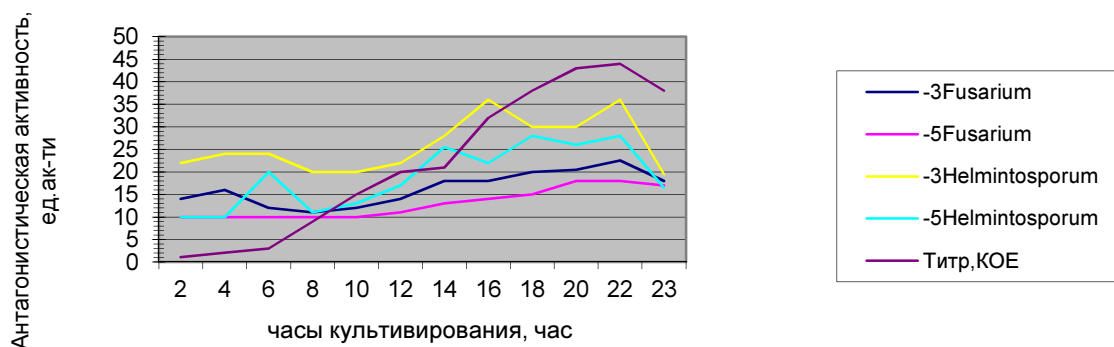


Рис. 3. Динамика роста и антагонистической активности к/ж штамма Б2 в глубинном гомогенном культивировании.

Таблица 1. Стабильность свойств культуральной жидкости в процессе хранения

Культуральная жидкость	Время Хранения, дни	Титр КОЕ, кл/мл, морфология колоний
Ф7 26д (22часа)	1день	1.6x10 <sup>9</sup> R – форма
Вторич.рост	10дней	1.0x10 <sup>9</sup> R
	20дней 1 года	1.1x10 <sup>9</sup> R
	1, 2, 3, 4 года	1.1x10 <sup>9</sup> R
Ф7 26д (12часов)	1 день	3.3x10 <sup>9</sup> R
	10 дней	3.1x10 <sup>9</sup> R
	20 дней	1.27x10 <sup>9</sup> R
	1 месяц	1.28x10 <sup>9</sup> R
	1, 2, 3, 4 года	1.27x10 <sup>9</sup> R
Ф8 1к (16часов)	1 день	9.0x10 <sup>8</sup> R
	10 дней	2.6x10 <sup>8</sup> R
	20 дней	1.3x10 <sup>8</sup> R
	1–4 года	2.6x10 <sup>8</sup> R
Вторич. рост	10 дней	3.6x10 <sup>8</sup> R
Ф8 1К (22часа)	20 дней	7.2x10 <sup>8</sup> R
	1–4 года	2.6x10 <sup>8</sup> R
Ф9 Б2 (20часов)	1 день	1.3x10 <sup>9</sup> R
	10 дней	1.2x10 <sup>9</sup> R
	20 дней	1.0x10 <sup>9</sup> R
	1–4 года	1.0x10 <sup>9</sup> R
Ф9Б2 (22часа)	1 день	1.8x10 <sup>9</sup> R
	10 дней	1.9x10 <sup>9</sup> R
	20 дней	8.5x10 <sup>8</sup> R
	1–4 года	8.5x10 <sup>8</sup> R

Как следует из рисунка: латентная фаза – 6ч, экспоненциальная – 6–12ч. 12–22 часа – фаза замедления роста. Максимальный антагонизм на 22ч, на данном часе к/ж имеет максимальный титр  $1.8 \times 10^9 R$ . Высокий антагонизм к грибу *Fusarium culmorum* и *Helminthosporium sativum*. Отличается более длительным ростом.

На следующем этапе исследования было необходимым провести исследование стабильности свойств (титр КОЕ, антагонистическая активность) в процессе хранения при температуре  $(22 \pm 4)^\circ C$ . Данные представлены в таблице №1.

Как следует из представленных данных наибольшая стабильность отмечается у культуральной жидкости на основе штамма Б2, полученного на 22часах роста; а также у штамма 1К на 22 часах культивирования, у культуральной жидкости штамма 26Д, полученной на 12 часах роста, происходило небольшое снижение титра с  $3.3 \times 10^9$  до  $1.2 \times 10^9$ , но которые стабилизировались после 20 дней хранения.

В таблице два представлены данные по стабильности антагонистической активности культуральной жидкости в процессе хранения.

Таблица 2. Стабильность свойств культуральной жидкости штамма 26Д (антагонистическая активность) в процессе хранения

Час кул-ия, ч	Зона задержки роста фитопатогенных грибов, мм							
	Разведение культуральной жидкости (-3) – в 1000 раз, (-5) – в 100 000 раз							
	0 дней				14 дней			
	<i>Fusarium culmorum</i>		<i>Helminthosporium sativum</i>		<i>Fusarium</i>		Helmint.	
	-3	-5	-3	-5	-3	-5	-3	-5
12	19.5	17	28.5	24	16	12	22	17
22	20.5	18	26	<b>19.5</b>	20	18.5	26	<b>24</b>

Сохраняется стабильность антагонистической активности у к/ж ф7 26д (12ч) на протяжении 14 дней, отмечается некоторое повышение антагонизма у к/ж ф7 26Д (22ч) по грибу *Helminthosporium* в -5 разведении с 19.5–24.

Таблица 3. Стабильность свойств культуральной жидкости штамма 1К (антагонистическая активность) в процессе хранения

Час кул-ия, час	Зона задержки роста фитопатогенных грибов, мм							
	Разведение культуральной жидкости (-3) – в 1000 раз, (-5) – в 100 000 раз							
	0 дней				14 дней			
	<i>Fusarium culmorum</i>		<i>Helminthosporium sativum</i>		<i>Fusarium</i>		Helmint.	
	-3	-5	-3	-5	-3	-5	-3	-5
16	20	17.5	<b>26</b>	20	20	16	<b>22</b>	19.5
22	19.5	17	<b>34</b>	<b>30</b>	21	14	<b>20</b>	<b>17.5</b>

Сохраняется стабильность антагонистической активности у к/ж штамма 1К на протяжении 14 дней.

Таблица 4. Стабильность свойств культуральной жидкости штамма Б2 (антагонистическая активность) в процессе хранения

Час куль- тия, час	Зона задержки роста фитопатогенных грибов, мм							
	Разведение культуральной жидкости (-3) – в 1000 раз, (-5) – в 100 000 раз							
	0 дней				14 дней			
	Fusarium cul- morum		Helmintosporium sativum		Fusarium		Helmint.	
	-3	-5	-3	-5	-3	-5	-3	-5
20	20.5	18	<b>30</b>	26	19	17	<b>30</b>	28
22	22.5	18	<b>36</b>	<b>28</b>	17	16	<b>36</b>	<b>26.5</b>
23	18	17	<b>19.5</b>	<b>16.5</b>				

Сохраняется стабильность антагонистической активности у к/ж штамма 1К на протяжении 14 дней.

## Выводы

1. В ходе проведенных исследований установлено, что динамика роста производственных штаммов *Bacillus subtilis* 26Д, 1К, Б2 одинакова в процессе периодического гомогенного глубинного культивирования и имеет длительность 14–16 часов кроме штамма Б2 с длительностью роста 22 часа.
2. Культуральная жидкость с максимальной биологической активностью у штамма 1К на 16 часах роста, у штамма 26Д на 12 часах роста, у штамма Б2 на 20 часах роста.
3. Отмечена стабильность свойств культуральной жидкости изученных штаммов на протяжении 1 месяц 1 года хранения.

## Литература

1. Белов Л. П., Шкаликов В. А., Дунаева Ю. С. Возможности использования препаратов на основе *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* в растениеводстве // АгроXXI.-2008.- №4-6.- С.58–59.
2. Гринько О. М., Зверев В. В., Калошин А. А., Михайлова Н. А. Выделение и изучение перспективного спорообразующего пробиотического штамма спорообразующих бактерий рода *Bacillus* // Сб. тезис. Всеросс. научно-практ. конф. «Вакцинология 2008. Совершенствование

- иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – Москва, 10–11 ноября 2008. – С. 44.
3. Бирюков, В. В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / В. В. Бирюков, В. М. Кантере. М.: Наука, 1985.-291 с.
  4. Дебабов, В. Г. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. М.: Высшая школа, 1988. – 280 с.
  5. Смирнов В. В., Резник С. Р., Василевская И. А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ.- Киев: Наукова думка, 1982.- 280 с.
  6. Бурцева, Э. И. Влияние состава среды на диссоциацию *Bacillus subtilis* 82 / Э. И. Бурцева, А. С. Тихомирова А. С. // Тезисы доклада Всесоюзной конференции «Достижения биотехнологии агропром. Комплексу» (г. Черновцы, 14–16 окт.). – 1991. – С. 86.
  7. Гринько О. М., Зверев В. В., Михайлова Н. А. Изучение влияния питательной среды на антагонистические свойства бактерий *B. pumilus*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2010. – №1. – С.72–76.

## **Study of the antagonistic activity of bacteria of the genus *Bacillus* in the process of liquid culture**

E. V. Minligareyeva\*, T. N. Kuznetsova

*NVP "BashInkom"*

*37/1 Karl Marx Street, 450015 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*\*Email: missis.ladykolos@ya.ru*

This article is devoted to the development of a technology for the preparation of a biological preparation based on the strain of bacteria of the genus *Bacillus subtilis*. In the course of the study, the growth dynamics of bacterial populations was studied. Every two hours, pH, titer, antagonistic activity of the culture liquid was determined. The stability of titre, antagonistic activity in the time interval up to 4 years of storage is monitored.

**Keywords:** antagonism, biological activity, CFU titer.