

DOI: 10.33184/dokbsu-2021.5.6

## **Возможность совместного культивирования *Pseudomonas aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-10436 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317**

А. С. Пронин\*, Т. С. Колмыкова, А. С. Лукаткин

Национальный исследовательский Мордовский Государственный университет  
им. Н. П. Огарева

Россия, Республика Мордовия, 430005 г. Саранск, улица Большевистская, 68.

\*Email: proninbio@gmail.com

Показана возможность совместного культивирования *Pseudomonas aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-10436 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317. Подобраны оптимальные режимы культивирования микроорганизмов и их влияние на изменения биомассы.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aureofaciens*, *Azotobacter vinelandii*, *Saccharomyces cerevisiae*, биоудобрение, биомасса, режимы культивирования.

В последние годы на российском рынке сельского хозяйства наблюдается тенденция к увеличению использования биологических удобрений и средств защиты растений. Сформировались крупные производственные площадки по производству биологических удобрений, активно ведутся разработки по созданию и оптимизации технологии производства этих препаратов. Одним из них является препарат, созданный на основе *Pseudomonas aureofaciens*; он используется для обработки семян и растений злаковых культур, кукурузы, зернобобовых, томатов [1, 2]. Псевдомонады синтезируют широкий спектр метаболитов, оказывающих на растение ростостимулирующие и антифунгальное действие [3]. Наряду с применением для защиты растений культур *Pseudomonas*, большое внимание уделяется использованию в качестве биоудобрения *Azotobacter vinelandii* – бактерии, способной фиксировать азот в процессе анаэробного роста, синтезировать фитогормоны и витамины [4, 5].

На современном этапе создания различных биопрепаратов для растениеводства внимание исследователей привлекает возможность использования представителей совершенно иной таксономической категории микроорганизмов – грибов. Немногочисленными исследованиями доказано, что некоторые штаммы дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) продуцируют фитогормоны [6].

В связи с выше изложенным целью нашей работы стало изучение влияния режимов культивирования на прирост биомассы при совместном культивировании *Pseudomonas*

*aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-10436, в том числе в присутствии клеток *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317.

В задачи исследования входило: 1) подбор оптимальных режимов культивирования *Pseudomonas aureofaciens* B-5526 и *Azotobacter vinelandii* B-10436 и их влияние на изменение биомассы; 2) подбор оптимальных режимов культивирования *Pseudomonas aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-10436 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317 и их влияние на изменение биомассы.

В исследовании использовали штаммы микроорганизмов, предоставленные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Культивирование штаммов микроорганизмов производили в биологических колбах объемом 250 или 500 мл в шейкере инкубатора BIORUS shaking incubator SPH-2102 при 175 об/мин в течение 20.24.30.38 часов. Температурные режимы культивирования клеток бактерий были различными: 18, 22, 26, 30 или 34 °С.

При исследовании влияния аэрации культивирование осуществляли на лабораторном ферментере фирмы BIORUS с рабочим объемом 5 л.

Для культивирования микроорганизмов использовали следующую питательную среду: меласса (ООО «Ромодановосахар») – 30 г/л,  $\text{NaNO}_3$  – 1.5 г/л,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2 г/л,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 2 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2 г/л.

Для определения биомассы через бумажный фильтр фильтровали точно отмеренный объем культуры (5–10 мл), трехкратно промывали дистиллированной водой. Для определения веса сухой биомассы фильтр с осадком клеток микроорганизмов высушивали при 105 °С до постоянной массы.

Количество жизнеспособных клеток в биопрепаратах определяли методом предельных разведений. Для этого в 12 пробирках последовательно делали стерильное десятикратное разведение культуральной жидкости водой. Из трех последних разведений брали по 0.1 мл суспензии и проводили рассев на глюкозо-пептонный агар. Культивирование проводили при 28°С. По истечении 24 часов вели подсчет выросших колоний и рассчитывали титр жизнеспособных клеток. Количество дрожжевых клеток определяли в счетной камере Горяева [7].

На первом этапе работы определили влияние температуры на накопление биомассы и КОЕ при совместном культивировании *Pseudomonas aureofaciens* и *Azotobacter vinelandii* в течение 20, 24 и 30 часов.

Максимальное значение биомассы при совместном культивировании псевдомонад и азотобактера зафиксировали во всех временных экспозициях при температуре 30 °С

(рис. 1). Для экспозиции 30 часов от начала культивирования значение биомассы в культуральной жидкости составило  $19.1 \pm 0.8$  г/мл. Титры *Pseudomonas aureofaciens* и *Azotobacter vinelandii* составили  $1.8 \times 10^9 \pm 0.4 \times 10^9$  КОЕ/мл и  $5.2 \times 10^4 \pm 0.4 \times 10^4$  КОЕ/мл соответственно. Выход биомассы при температуре 30 °С в среднем был выше на 38% по сравнению с температурным режимом 22 °С, что отмечено при всех исследуемых экспозициях. При повышении температуры выше 30 °С показатели биомассы снижались, и при температуре 34 °С накопление биомассы клетками бактерий было меньше на 12%, чем при температуре культивирования 30 °С. Таким образом, оптимальный режим культивирования *Pseudomonas aureofaciens* В-5526 и *Azotobacter vinelandii* В-10436 – 30 часов при температуре 30 °С.

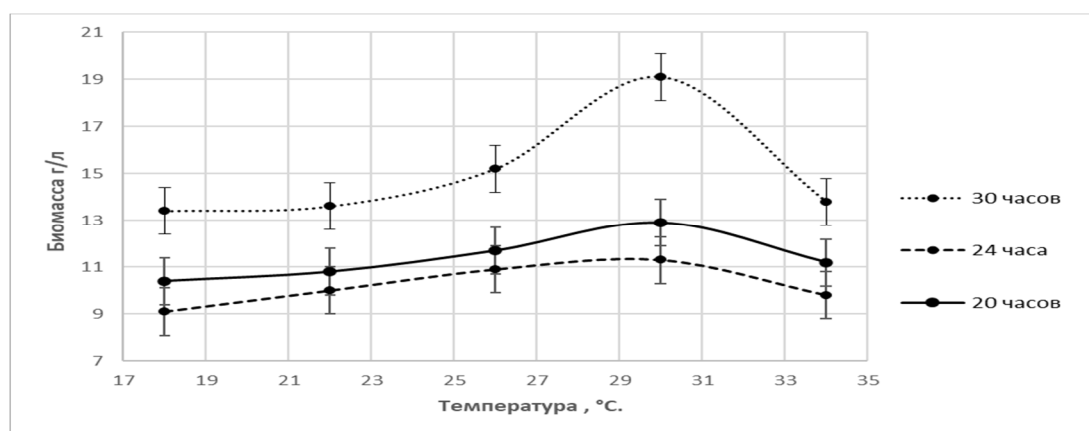


Рис. 1. Изменение биомассы в зависимости от температурного режима при совместном культивировании *Pseudomonas aureofaciens* и *Azotobacter vinelandii*.

На следующем этапе работы изучили изменение биологической массы микроорганизмов и титр жизнеспособных клеток при совместной ферментации *Pseudomonas aureofaciens* В-5526, *Azotobacter vinelandii* В-10436 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317 в зависимости от длительности культивирования и аэрации. Дрожжи по типу дыхания относятся к факультативным анаэробам; присутствие кислорода подавляет спиртовое брожение, и дрожжи активно накапливают биомассу. На рис. 2 показано влияние режимов аэрации на изменение биомассы при совместном культивировании микроорганизмов.

Из представленных данных видно, что лучшие результаты показал режим культивирования 4 м<sup>3</sup>/ч. При такой аэрации зафиксировано максимальное значение биомассы трех совместно культивируемых штаммов микроорганизмов при 30- и 38-часовом культивировании. Однако на более ранних стадиях совместного роста (через 20 и 24 ч от начала ферментации) режимы аэрации не показали достоверных различий. Это можно объяснить тем, что максимальная масса микроорганизмов достигалась в стационарную фазу роста – 30 ч от начала культивирования, и соответственно потребление кислорода возрастало. В итоге режим аэрации достоверно повлиял лишь на поздних

стадиях культивирования – 30 и 38 ч от начала ферментации. В итоге при подаче воздуха 4 м<sup>3</sup>/ч спустя 30 ч культивирования была зафиксирована максимальная биомасса совместной культуры *Pseudomonas aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-10436 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317 – 30.3±0.9 г/л. Данный показатель на 18.6% выше по сравнению с режимом аэрации 2 м<sup>3</sup>/ч. Таким образом, оптимальным является режим совместного культивирования *Pseudomonas aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-10436 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317 – 30 ч при аэрации 4 м<sup>3</sup>/ч и температуре 30 °С.

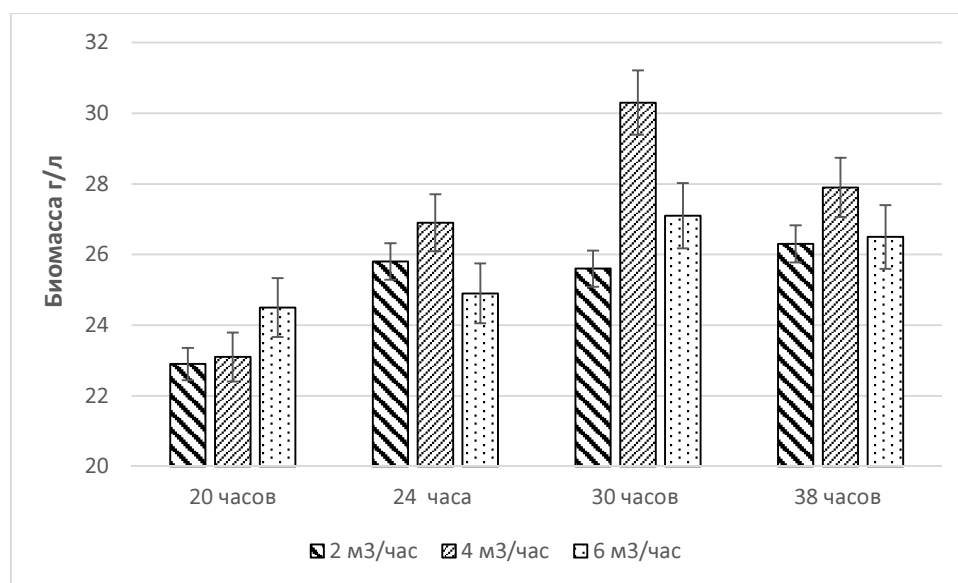


Рис. 2. Изменение биомассы *Pseudomonas aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-1043 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317 при температуре культивирования 30 °С в зависимости от длительности культивирования и интенсивности аэрации.

Таблица 1. Влияние аэрации на количество жизнеспособных клеток *Pseudomonas aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-10436 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317 на 30 сутки от начала культивирования при температуре 30 °С

Режим аэрации, м <sup>3</sup> /час	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> B-5526, КОЕ/мл	<i>Azotobacter vinelandii</i> B-10436, КОЕ/мл	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-4317, КОЕ/мл
2	2.5×10 <sup>9</sup> ±0.4×10 <sup>9</sup>	4.0×10 <sup>4</sup> ±0.2×10 <sup>4</sup>	3.3×10 <sup>7</sup> ±0.2×10 <sup>7</sup>
4	2.7×10 <sup>9</sup> ±0.4×10 <sup>9</sup>	3.8×10 <sup>4</sup> ±0.2×10 <sup>4</sup>	8.2×10 <sup>7</sup> ±0.4×10 <sup>7</sup>
6	2.3×10 <sup>9</sup> ±0.4×10 <sup>9</sup>	4.1×10 <sup>4</sup> ±0.2×10 <sup>4</sup>	4.1×10 <sup>7</sup> ±0.2×10 <sup>7</sup>

Обнаружено, что при совместном культивировании *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317 с *Pseudomonas aureofaciens* B-5526 и *Azotobacter vinelandii* B-10436 дрожжевые клетки достоверно не влияли на количество клеток бактерий *Pseudomonas* и *Azotobacter* (табл. 1). Интенсивность аэрации воздействовала только на *Saccharomyces cerevisiae*. Это можно

объяснить тем, что сахаромицеты в процессе метаболизма нуждаются в достаточно большом количестве кислорода для накопления собственной биомассы.

Таким образом, оптимальный режим культивирования *Pseudomonas aureofaciens* В-5526 и *Azotobacter vinelandii* В-10436 – 30 ч при температуре 30 °С. Оптимальный режим совместного культивирования *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317 с *Pseudomonas aureofaciens* В-5526 и *Azotobacter vinelandii* В-10436 составил 30 ч при аэрации 4 м<sup>3</sup>/ч и температуре 30 °С. Полученные данные являются предпосылкой производства препарата в производственных масштабах, за счет снижения технологических издержек и минимальных требований к используемому оборудованию.

### Литература

1. Колмыкова Т. С., Пронин А. С., Кудряшова В. И., Гудошникова Т. Н. / Сортвые реакции растений пшеницы на предпосевную обработку семян биопрепаратом на основе *Pseudomonas aureofaciens* // East European Scientific Journal. – 2016. – Т 14, №1. – С. 19–21.
2. Лукаткин А. А., Ю. А. Бурова, С. А. Ибрагимова и др. Получение биопрепарата на основе бактерий *Pseudomonas aureofaciens* 2006 // Всеросс. конф. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем». – Краснодар, 2010. – С. 415–417.
3. Paulitz T. et al. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens // Journal of Chemical Ecology. – 2000. – V. 26. – №. 6. – С. 1515–1524.
4. Menhart N., Thariath A., Viswanatha T. Characterization of the pyoverdines of *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 with regard to heterogeneity // Biology of Metals. – 1991. – V.4, N 4. – P. 223–32.
5. Тихонович 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.
6. Diemaite J. Peculiarities of the formation of indole-3-acetic acid-protein complexes in yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasmalemma // Biologia. – 2004. – TV. 10. – P. 36–38.
7. Горнова И. Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Де Ли принт, 2004. – С.36.

Статья рекомендована к печати кафедрой биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета (д-р. биол. наук, проф. Р. Г. Фархутдинов)

---

## **Possibility of joint cultivation of *Pseudomonas aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-10436, and *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317**

A. S. Pronin\*, T. S. Kolmykova, A. S. Lukatkin

*National Research Mordovia State University*

*Russia, Republic of Mordovia, 430005 Saransk, Bolshevistskaya street, 68.*

*\*Email: proninbio@gmail.com*

The possibility of co-cultivation of *Pseudomonas aureofaciens* B-5526, *Azotobacter vinelandii* B-10436, and *Saccharomyces cerevisiae* Y-4317 was shown. Optimal modes of microorganism cultivation and their influence on changes in biomass were selected.

**Keywords:** *Pseudomonas aureofaciens*, *Azotobacter vinelandii*, *Saccharomyces cerevisiae*, biofertilizer, biomass, cultivation modes.