

УДК 573.6.086.835:579.8

Т.А. Смолягина, О.М. Минаева, Е.Е. Акимова

Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ *Pseudomonas* sp. В-6798 В УСЛОВИЯХ ПЕРИОДИЧЕСКОГО И НЕПРЕРЫВНОГО РЕЖИМОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Материалы опубликованы в рамках проекта ФЦП «Организационно-техническое обеспечение проведения Международной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»» (ГК № 14.741.12.0153 от 07 июня 2011 г.).

*Изучена биологическая активность бактерий Pseudomonas sp. В-6798 в условиях периодического и непрерывного режимов культивирования. Установлено, что биологическая активность бактерий Pseudomonas sp. В-6798 зависит от режима культивирования: непрерывное культивирование повышает биологическую активность штамма продуцента, по сравнению с периодическим. В меньшей степени наблюдается вариация фунгистатической активности, в большей – ростстимулирующей активности. При бактеризации семян культурой, выращенной в периодическом режиме культивирования, эффективность подавления семенных инфекций составила 14–16,5%, а при бактеризации культурой, поддерживаемой в протоке, 24–27%. Бактерии, выращенные в периодическом режиме, способствовали увеличению длины проростков пшеницы в два раза, а бактерии, поддерживаемые на протоке, – в шесть раз по сравнению с семенами без бактеризации.*

**Ключевые слова:** *Pseudomonas* sp. В-6798; периодическое и непрерывное культивирование; биореактор.

### Введение

В последнее время в сельском хозяйстве увеличивается применение химических средств защиты растений от вредителей и возбудителей заболеваний, что приводит к ухудшению экологической обстановки в агрофитоценозах. Пестициды оказывают негативное воздействие на различные компоненты природных экосистем: уменьшают биологическую продуктивность фитоценозов, видовое разнообразие животного мира, снижают численность полезных насекомых и птиц. Биологический метод рассматривается как альтернативный в системе защитных мероприятий и в то же время, в силу своих специфических особенностей, является основой для разработок экологически безопасных, экономичных и долговременных программ борьбы с вредными организмами [1–2].

Бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798, предложенные в качестве агента биопрепарата, дают значительный положительный эффект при инокуляции целого ряда сельскохозяйственных растений: пшеницы, овса, кукурузы, льна-долгунца, картофеля, огурца. Использование бактериями формальдегида в

составе питательных сред в качестве единственного источника энергетического субстрата, являющегося одновременно ингибитором роста значительного количества других микроорганизмов, позволяет проводить культивирование в режиме незащищенной ферментации, а значит для получения биомассы возможно использовать режим непрерывного культивирования [3–4].

Целью данной работы являлось изучение биологической активности бактерий *Pseudomonas sp.* В-6798 в условиях периодического и непрерывного режимов культивирования.

### Материалы и методики исследования

Культивирование бактерий проводилось в типовом лабораторном ферментере ( $V = 200$  мл) на минеральной среде с формальдегидом (концентрация 2 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Объем посевной культуры составлял 10% от рабочего объема биореактора, концентрация растворенного кислорода поддерживалась на уровне 70–75%.

При непрерывном незащищенном режиме культивирования подача среды осуществлялась включением автономного дозатора по электронному таймеру. Одновременно, с помощью перистальтического насоса по установленному уровню происходило изъятие излишек культуральной жидкости. В данном режиме были опробованы протоки от 0 до  $0,03 \text{ ч}^{-1}$ . В установившихся стационарных режимах, определявшихся по отсутствию изменения оптической плотности культуры, отбиралась проба, в которой учитывались титр продуцента и его биологическая активность.

Титр агента и частота культуры определялись фотометрически (спектрофотометр Apel PD 303, Япония) и методом предельного разведения высева на плотные питательные среды [5]; биологическая активность – по результатам фитосанитарной экспертизы семян (снижение общей пораженности при обработке и увеличение всхожести и длины проростка) [6]. В качестве контроля использованы семена без бактериализации.

### Результаты исследования и обсуждение

В режиме незащищенного периодического культивирования бактерии выращивались до достижения численности  $6,8 \times 10^8$  клеток/мл. Несмотря на то что маточная культура была однородной и состояла из морфологически идентичных клеток, после периодического культивирования в ферментере без соблюдения правил асептики обнаружены 6 морфологически различных типов колоний, отнесенных нами к различным изолятам, среди которых отмечено как наличие диссоциантов (численность около  $1 \times 10^4$  клеток/мл), так и контаминантов (общая численность около  $8,5 \times 10^4$  клеток/мл). Принадлежность выделенных из культуры изолятов к исходному штамму, контаминантам или диссоциантам оценивалась по окислению бактериальными клетками формальдегида до муравьиной кислоты в пробирках с формальдегидом и индикатором (бромтимоловым синим) визуальное по изменению цвета индикатора в культурах по сравнению с контрольной пробиркой.

Далее исследуемая бактериальная культура переведена на проточный режим культивирования ( $D = 0,003 \text{ ч}^{-1}$ ). По истечении недели культура стабилизировалась на протоке с численностью  $6,5 \times 10^4$  клеток/мл. При посеве на плотную питательную среду наличие диссоциации штамма и посторонней микрофлоры отмечено не было; выросшие колонии морфологически были идентичны колониям исходного штамма.

Установлено, что биологическая активность бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 зависит от режима культивирования: непрерывное культивирование повышает биологическую активность штамма продуцента по сравнению с периодическим. В меньшей степени наблюдается вариация фунгистатической активности, в большей – ростстимулирующая активность. При бактериализации семян культурой, выращенной в периодическом режиме культивирования, эффективность подавления семенных инфекций составила 14–16,5%, а при бактериализации культурой, поддерживаемой в протоке, 24–27%. Бактерии, выращенные в периодическом режиме, способствовали увеличению длины проростков пшеницы в два раза, а бактерии, поддерживаемые на протоке, увеличили длину проростка в шесть раз по сравнению с семенами без бактериализации.

### Заключение

Таким образом, переход от периодического режима культивирования к непрерывному, в условиях незащищенной ферментации, способствует поддержанию чистоты бактериального консорциума (на протяжении месяца непрерывного культивирования не отмечено появления контаминантов в культуре) и увеличению биологической активности бактерий.

### Литература

1. Боронин А.М., Кочетков В.В. Биологические препараты на основе псевдомонад // АгроXXI. 2000. № 3. С. 35–41.
2. Соколов М.С., Литвишко Е.В. Биологическая защита растений в США // Защита растений. 1993. № 11. С. 18–20.
3. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Семенов С.Ю. Антагонистическое действие на фитопатогенные грибы и стимулирующее влияние на рост и развитие растений формальдегидутилизующих бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2008. № 2(3). С. 28–42.
4. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Евдокимов Е.В. Кинетические аспекты ингибирования роста фитопатогенных грибов ризосферными микроорганизмами // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44, № 5. С. 565–570.
5. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. ; под ред. А.И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
6. Чулкина В.А. Борьба с болезнями сельскохозяйственных культур Сибири / В.А. Чулкина, Н.М. Коняева, Т.Т. Кузнецова. М. : Россельхозиздат, 1987. 252 с.

Поступила в редакцию 21.07.2011 г.

Tatjana A. Smoljagina, Oksana M. Minaeva, Elena E. Akimova

*Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia*

### BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Pseudomonas* sp. B-6798 BACTERIA IN BATCH AND CHEMOSTAT CULTURE

The usage of chemical plant protection substances against pests and pathogenic agents has been increasing lately in agriculture, which results in the deterioration of the environmental situation in agrophytocenoses. The biological method is viewed as an alternative one in the system of protective measures and at the same time, due to its specific features, is the basis for elaborating ecologically safe, economical and long-run programs for fighting harmful organisms.

*Pseudomonas* sp. B-6798 bacteria, presented as a biopreparation agent, give a significant positive effect while inoculating a variety of agricultural plants. The possibility of the bacteria to use formaldehyde in the composition of nutrient solutions as a single source of energy substrate, that is at the same time a growth inhibitor of a significant quantity of other organisms, allows carrying out cultivation in the regime of unprotected fermentation, and, therefore, it is easily fulfilled in the chemostat.

The aim of this work was to study biological activity of *Pseudomonas* sp. B-6798 in batch and chemostat culture.

The cultivation of bacteria was carried out in a standard laboratory fermenter ( $V=200$  ml) on a mineral medium with formaldehyde with the concentration of 2 g/L as a single source of carbon and energy. The volume of inoculum amounted to 10% of the bioreactor working volume; the concentration of dissolved oxygen was kept at the level of 70–75%. In the regime of unprotected batch cultivation bacteria were grown up to their achieving the abundance of  $6,8 \times 10^8$  cells/ml. Despite the fact that the stock culture was homogeneous and consisted of morphologically identical cells, after batch cultivation in the fermenter, without following aseptic rules, we identified six morphologically different types of colonies and classified them as different isolates. Further, the bacterial culture under investigation was put into the chemostat ( $D=0,003$  p<sup>-1</sup>). After a week the culture was stabilized at the dilution rate with the abundance  $6,5 \times 10^4$  cells/ml. While inoculating solid medium, the presence of strain dissociation and the presence of extraneous microflora were not found; new colonies were morphologically identical to the colonies of the stock strain.

During the cultivation, antifungal and growth stimulating activities of *Pseudomonas* sp. B-6798 bacteria were estimated on wheat seeds in batch and continuous culture. It is established that biological activity of *Pseudomonas* sp. B-6798 bacteria depends on the cultivation regime: continuous cultivation increases biological activity of the producer-strain by contrast to batch one. During seed bacterization with the culture grown in batch cultivation, the efficiency of seed infection suppression made up 14–16,5%, whereas during bacterization with the chemostat culture it was 24–27%. The bacteria grown in batch fermentation fostered an increase in wheat seedlings length twice, while the bacteria from the chemostat increased the seedling length six times in comparison with seeds without bacterization.

**Key words:** batch fermentation; chemostat; dilution rate.

Received July 21, 2011