

УДК 579.852.11:632.937

О. А. Дрегваль, Н. В. Черевач, А. І. Вінніков

*Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара*

**ПОДБІР ОПТИМАЛЬНИХ РЕЖИМІВ КИСЛОТНОСТІ СЕРЕДОВИЩА  
ТА АЕРАЦІЇ ПРИ ГЛИБИННОМУ КУЛЬТИВУВАННІ  
*BACILLUS THURINGIENSIS* ТА *BEAUVERIA BASSIANA***

Досліджено вплив кислотності середовища та інтенсивності аерації на ріст та спорування *Bacillus thuringiensis* та *Beauveria bassiana* – основних компонентів комплексного мікробного інсектицидного препарату «Бактофунгін». Оптимальним значенням початкового *pH* середовища для *B. thuringiensis* є 7,0, для *B. bassiana* – 6,0–7,0. Максимальна продуктивність досліджуваних мікроорганізмів спостерігалась в одному діапазоні аерації – 7–14 ммоль  $O_2$ /л/год. Підібрані умови культивування необхідні для отримання комплексного біопрепарату на основі асоціації *B. thuringiensis* та *B. bassiana*.

О. А. Дрегваль, Н. В. Черевач, А. И. Винников

*Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара*

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ РЕЖИМОВ КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ  
И АЭРАЦИИ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ  
*BACILLUS THURINGIENSIS* И *BEAUVERIA BASSIANA***

Изучено влияние кислотности среды и интенсивности аэрации на рост и спорообразование *Bacillus thuringiensis* и *Beauveria bassiana* – основных компонентов комплексного микробного инсектицидного препарата «Бактофунгин». Оптимальным значением начального *pH* среды для *B. thuringiensis* является 7,0, для *B. bassiana* – 6,0–7,0. Максимальная продуктивность исследуемых микроорганизмов наблюдалась в одном диапазоне аэрации – 7–14 ммоль  $O_2$ /л/ч. Подобранные условия культивирования необходимы для получения комплексного биопрепарата на основе ассоциации *B. thuringiensis* и *B. bassiana*.

О. А. Dregval, N. V. Cherevach, A. I. Vinnikov

*Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University*

**SELECTION OF OPTIMUM CONDITIONS OF MEDIUM ACIDITY  
AND AERATION FOR SUBMERGET CULTIVATION OF  
*BACILLUS THURINGIENSIS* AND *BEAUVERIA BASSIANA***

The paper deals with the influence of medium *pH* and aeration rate on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* and *Beauveria bassiana*, which are main constituents of the complex microbial insecticide. It was established optimal medium *pH* for *B. thuringiensis* – 6.0 and for *B. bassiana* – 6.0–7.0. The maximum productivity of the studied microorganisms was observed in the same range of aeration – 7–14 mmol  $O_2$ /l/h. The selected conditions of cultivation are necessary for the production of complex biological insecticide based on the association of *B. thuringiensis* and *B. bassiana*.

## Вступ

Найбільш розповсюджені мікроорганізми, яких використовують як засоби боротьби з комахами-шкідниками – ентомопатогенні бактерії *Bacillus thuringiensis* та гриби *Beauveria bassiana*. Промислове культивування *B. thuringiensis* направлене на отримання високого виходу спорокристалічного комплексу, а *B. bassiana* – на отримання конідій (при поверхневому способі культивування) чи бластоспор (при глибинному культивуванні), що визначає інсектицидну активність препаратів. Перевагу віддають глибинному культивуванню, оскільки накопичення спорового матеріалу відбувається за короткий час і дозволяє легко підтримувати стерильність виробництва [3]. Крім складу живильного середовища велике значення для росту та спороутворення мікроорганізмів мають інтенсивність аерації та початкове значення *pH* живильного середовища.

Відомо, що *B. thuringiensis* належить до факультативних анаеробів. Літературні дані стосовно потреб у кисні на різних стадіях культивування цих бактерій неоднозначні. За даними одних авторів, відбувається різке збільшення газообміну на початку експоненціальної стадії росту [1], за іншими – під час спороутворення використовується більше кисню, ніж в експоненціальній фазі [4]. Деякі автори пропонують підтримувати інтенсивність аерації на постійному рівні протягом усього процесу культивування [11], хоча існують і технології східчастих режимів, коли аерацію змінюють залежно від потреб культури у кисні [1; 4]. Відносно початкового *pH* живильного середовища відомо, що для бактерій групи *B. thuringiensis* воно повинно знаходитись у діапазоні 6,5–7,3, але повідомлялось про існування кислотостійких варіантів штамів, які добре ростуть при *pH* 5,2–6,0 [7; 9]. Із літературних джерел відомо, що збудник білої мускардини *B. bassiana* – аеробний організм, проте вплив аерації на накопичення бластоспор при глибинному культивуванні досліджено недостатньо. Більшість штамів цих грибів ростуть у діапазоні *pH* від 5,0 до 8,0 з оптимумом у кислій області (5,0–5,6), але існують штами, для яких оптимальним значенням *pH* є 6,0–7,0 [5; 8; 10].

Мета даної роботи – підібрати оптимальні значення початкового *pH* середовища та інтенсивність аерації при глибинному культивуванні *B. thuringiensis* та *B. bassiana* – продуцентів комплексного інсектицидного біопрепарату «Бактофунгін».

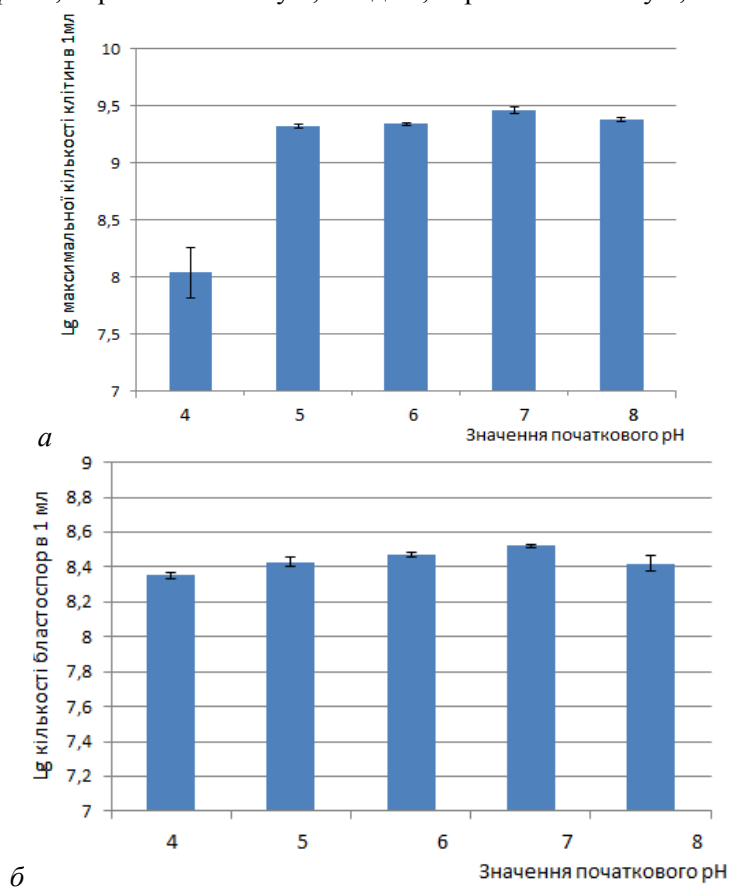
## Матеріал і методи досліджень

У роботі використовували штами ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* В-10 (ІМВ В-7186) та грибів *B. bassiana* F-6 (ІМВ F-100043) із колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та вірусології ДНУ ім. Олеса Гончара. Бактерії та гриби вирощували в середовищі такого складу (%): зелена патока – 1,5, кукурудзяний екстракт – 1,3, гумат – 0,44,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 0,232,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,051. Початкове значення *pH* середовища встановлювали додаванням розчинів соляної кислоти або луку. Вимірювання *pH* проводили за допомогою мілівольтметра (рН-121). Значення *pH*, що досліджували: 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0. Інтенсивність надходження кисню змінювали за допомогою вирощування у різному об'ємі живильного середовища в конічних колбах на 500 мл і балонах на 1 л. Ступінь аерації оцінювали сульфітним методом [6]. Засів *B. thuringiensis* здійснювали нічною бульйонною культурою в кількості  $1 \times 10^7$  кл./мл, *B. bassiana* – рідинною культурою, отриманою на глюкозо-крохмальному живильному середовищі у кількості  $1 \times 10^6$  бластоспор/мл. Бактерії та гриби вирощували на мікробіологічній качалці (200 об./хв.) при температурі +28 °С. Концентрацію клітин *B. thuringiensis* визначали за допомогою методу нефелометрії на 22–24-й годині культивування. Вимірювали оптичну густину суспензій бактерій на фотоелектроколори-

метрі КФК-2МП при 540 нм, кількість клітин у 1 мл визначали за калібрувальним графіком. Відсоток ендоспор у культуральній рідині на кінець культивування визначали за допомогою мікроскопічного дослідження фіксованих і пофарбованих карболовим фуксином мазків. Кількість бластоспор *B. bassiana* в 1 мл культуральної рідини визначали підрахунком в камері Горяєва на третю та четверту добу вирощування. У кінці культивування вимірювали *pH* культуральної рідини.

### Результати та їх обговорення

При початковому *pH* 4,0 ріст *B. thuringiensis* В-10 пригнічувався, ендоспори не утворювались (рис. 1а). При *pH* 5,0 відзначалось пригнічення росту протягом першої доби культивування, споруутворення починалось тільки через 40 год., а закінчувалось лише через 72 год., тоді як при *pH* 6,0–8,0 диференціація відбувалась у звичайний для цієї культури термін (20–48 год.). Слід зазначити, що досліджуваний штам виявився відносно кислотостійким, що пов'язано з підлогуванням середовища у процесі росту культури до *pH* 5,8 при початковому 5,0 та до 6,7 при початковому 6,0.



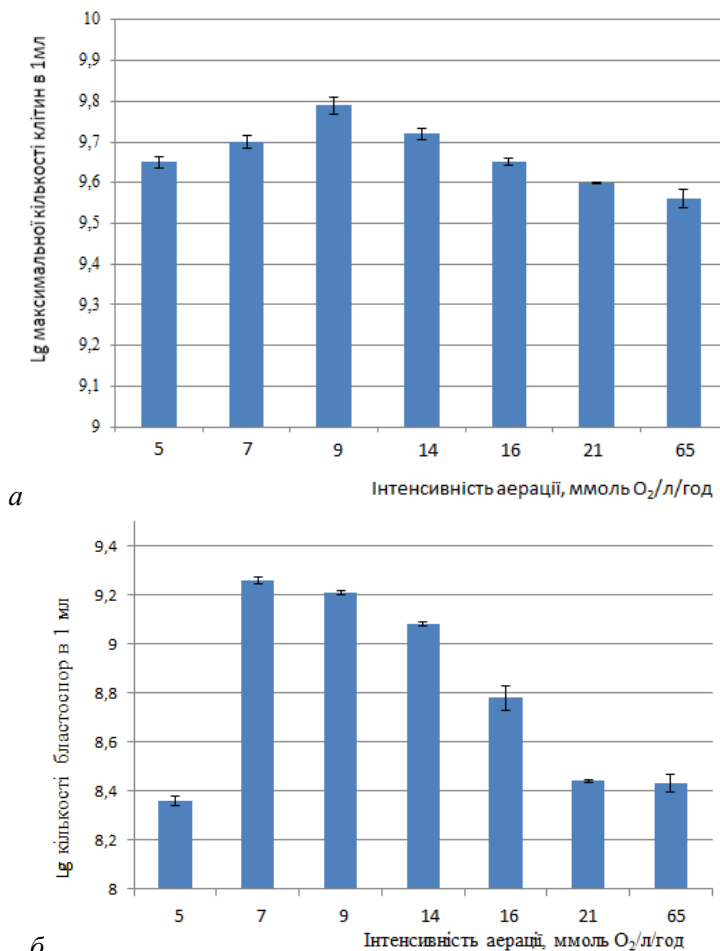
**Рис. 1.** Вплив початкового *pH* живильного середовища на накопичення клітин *B. thuringiensis* (а) та бластоспор *B. bassiana* (б)

Осадча зі співавторами [7] також повідомляли про існування кислотостійких варіантів штаму *B. thuringiensis* – продуцента біопрепарату «Бактокуліцид», які добре розвивалися при *pH* 5,2–6,0. Автори цієї роботи відмічали повніше використання основних компонентів живлення, збільшення виходу біомаси, синхронність споруутворення, високий вихід спорокристалічного комплексу при вирощуванні кислотостійких варіантів

у середовищі з кислим початковим значенням  $pH$ . У наших дослідженнях оптимальним  $pH$  для *B. thuringiensis* В-10 виявилось значення 7,0, при якому відбувалося найбільше накопичення клітин і повніший процес спороутворення. Утворення бластоспор *B. bassiana* F-6 відзначалося в усьому досліджуваному діапазоні  $pH$  (рис. 1б).

Кислі середовища гриб підлюговував, наближаючи значення  $pH$  до нейтрального, у нейтральному середовищі підлюговування було незначним, а в лужному відбувалося невелике підкислення. Оптимум  $pH$  для *B. bassiana* перебував у діапазоні 6,0–7,0, оскільки при цих значеннях кислотності утворювалося найбільше бластоспор.

Дослідження впливу інтенсивності аерації на ріст та спороутворення *B. thuringiensis* показало, що бактерії здатні рости в усьому діапазоні, який вивчався (5–65 ммоль  $O_2$ /л/год.), але найбільша продуктивність культури відмічалася при вирощуванні від 7 до 14 ммоль  $O_2$ /л/год. (рис. 2а).



**Рис. 2. Вплив інтенсивності аерації на накопичення клітин *B. thuringiensis* (а) та бластоспор *B. bassiana* (б)**

Подальше збільшення інтенсивності аерації дещо знижувало накопичення клітин бактерій. Подібне явище спостерігали Ігнатенко зі співавторами при вирощуванні *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* при рівні аерації вище 60 мг  $O_2$ /л/хв. (112 ммоль  $O_2$ /л/год.) [2]. Спороутворення *B. thuringiensis* В-10 відмічалось у всьому діапазоні аерації на рівні 93,0–95,2 %. Накопичення бластоспор *B. bassiana* в процесі культивуван-

ня відмічалось у всьому досліджуваному діапазоні аерації (рис. 2б). Найбільша продуктивність культури відмічалась при вирощуванні від 7 до 14 ммоль  $O_2$ /л/год. Вищі рівні аерації (21 і 65 ммоль  $O_2$ /л/год.), як і нижчі (5 ммоль  $O_2$ /л/год.), знижували накопичення бластоспор.

### Висновки

Оптимальним значенням початкового *pH* середовища для культивування штаму *Bacillus thuringiensis* B-10 (ІМВ В-7186) є 7,0, для *Beauveria bassiana* F-6 (ІМВ F-100043) – 6,0–7,0. Найбільша продуктивність досліджуваних бактерій і грибів спостерігається в одному діапазоні аерації – 7–14 ммоль  $O_2$ /л/год. Установлені параметри культивування необхідні для отримання комплексного біоінсектицидного препарату на основі асоціації *B. thuringiensis* та *B. bassiana*.

### Бібліографічні посилання

1. **Влияние** интенсивности массообмена по кислороду на рост *Bacillus thuringiensis* var. *dendrolimus* / В. И. Огарков, В. С. Муратов, А. А. Мяскин и др. // Биотехнология. – 1989. – Т. 5, № 2. – С. 164–167.
2. **Влияние** температуры и аэрации на рост и спорообразование *Bacillus thuringiensis* / Ю. Н. Игнатенко, З. В. Сахарова, М. П. Ховрычев и др. // Микробиология. – 1983. – Т. 52, вып. 5. – С. 716–718.
3. **Волова Т. Г.** Биотехнология. – Новосибирск : Изд-во СО РАН, 1999. – 252 с.
4. **Оптимизация** условий аэрации в процессе культивирования *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* шт. z-52 с использованием интегральной квазидинамической модели / В. В. Лаврикова, В. А. Ириков, Т. Г. Юдина и др. // Биотехнология. – 1992. – № 2. – С. 61–65.
5. **Пат.** 2172588 Российская Федерация, МПК7 А01N63/04, С12N1/14, С12N1/14, С12R1:645. Штамм гриба *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill ВКМ F-3732D, используемый для получения энтомопатогенных препаратов / А. И. Пахтуев, Б. В. Прилепский, Ф. Н. Чегодаев; заявитель и патентообладатель Бердский завод биологических препаратов. – № 2000133361/13; заявл. 27.12.2000, опубл. 27.08.2001.
6. **Практикум** по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 307 с.
7. **Рост** и развитие продуцента бактокулицида в зависимости от *pH* среды / А. И. Осадчая, В. С. Подгорский, С. Ф. Прокопченко и др. // Микробиол. журн. – 1990. – Т. 52, № 1. – С. 24–27.
8. **Doundji-Mtiche B.** Effect of some physicochemical and nutritional factors on the mycelium growth and sporulation of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* / B. Doundji-Mtiche, F. Z. Bissaad // Ninth Arab Congress of Plant Protection, 19–23 November 2006, Damascus, Syria. – P. 202.
9. **Icgen Y.** Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and *pH* / Y. Icgen, B. Icgen, G. Ozcengiz // Res. Microbiol. – 2002. – Vol. 153, N 9. – P. 599–604.
10. **Karthikeyan A.** Effect of different media and *pH* on the growth of *Beauveria bassiana* and its parasitism on eating Caterpillars / A. Karthikeyan, V. Shanthi, A. Nagasathya // Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. – 2008. – Vol. 4, N 2. – P. 117–119.
11. **Scale-up** approach for fermentation process of production of *Bacillus thuringiensis* var. *kenyae* based biopesticide / R. G. Muley, S. Sarkar, B. L. Bhan et al. // J. Sci. and Ind. Res. – 1999. – Vol. 58, N 10. – P. 781–784.

Надійшла до редколегії 29.06.2010