

УДК 632.937: 579.64:663.15

UDC 632.937:579.64:663.15

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ В  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ  
ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ *PSEUDOMONAS  
FLUORESCENS***

**USING SUCCINIC ACID IN  
BIOTECHNOLOGICAL PROCESS OF  
PRODUCING *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*  
PREPARATIONS**

Котляров Владимир Владиславович  
д.с.-х.н., профессор  
*Кубанский государственный  
аграрный университет, Краснодар, Россия*

Kotlyarov Vladimir Vladislavovich  
Dr.Sci.Agr., professor  
*Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia*

Сединина Наталья Викторовна  
старший научный сотрудник  
*НИИ Биотехнологии и  
сертификации, Кубанский государственный  
аграрный университет, Краснодар, Россия*

Sedinina Natalya Viktorovna  
senior research worker  
*SRI Biotechnology and food manufacturing certifica-  
tion of Kuban State Agrarian University, Krasnodar,  
Russia*

В статье приведена сравнительная оценка влияния добавления янтарной кислоты в питательную среду на основе пшеничных отрубей на биотехнологические показатели при культивировании бактерий *Pseudomonas fluorescens*

This article describes quantitative evaluation of adding succinic acid in the bran substrate when cultivating *Pseudomonas fluorescens*

Ключевые слова: ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ,  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ,  
ПШЕНИЧНЫЕ ОТРУБИ,  
МИКРОФЛОРА

Keywords: PLANT PROTECTION,  
MICROBIOLOGICAL PREPARATION, WHEAT  
BRAN, MICROORGANISMS

Биотехнологический процесс выращивания (культивирования) микроорганизмов – это ряд стадий и особенностей, связанных с необходимостью поддержания определенных температурных условий, pH, аэрации или создания анаэробных условий. При организации биотехнологического производства в сельском хозяйстве и обеспечении хранения полученных препаратов необходимо учитывать сроки жизнеспособности микроорганизмов, особенно при отсутствии возможности пополнения питательной среды или культуральной жидкости новыми питательными компонентами, т. к. процесс носит периодический характер, исключающий воспроизводство, и обычно ограничивается 5-7 сутками культивирования. Поэтому возникает необходимость использовать вещества, вводимые в питательную среду или баковую смесь, продлевающие жизнеспособность микроорганизмов, и, увеличивающие их численность (титр).

В основе технологической схемы производства микробиологических препаратов для защиты растений на базе малотоннажных предприятий, разработанной ООО МИП «Кубанские агротехнологии» Кубанского госагроуниверситета, культивирование микроорганизмов осуществляется глубинным способом в жидкой питательной среде. Обязательными компоненты питательной среды являются отруби и сахар, подобранные в определенном соотношении [1, 2]. В основном это обеспечивает сбалансированность питательных соединений (в виде белков, углеводов и минеральных веществ) для большинства микроорганизмов, что обеспечивает их размножение. К сожалению бактерии рода *Pseudomonas*, входящие в состав жидких препаратов, применяемых для протравливания семенного материала и вегетационных обработок растений, хотя и характеризуются высоким титром, но обладают коротким сроком годности - 30 суток. При этом срок фунгицидного действия ограничивается 5-7 сутками [8]. Для дальнейшей работы их ферментативного комплекса очень важным условием является наличие в питательной среде биологически активных веществ или веществ, стимулирующих рост [4, 6, 7]. Использование этих веществ способствует увеличению количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл готовой культуральной жидкости, что сокращает расход готового препарата, или же позволяет снизить сроки культивирования микроорганизмов. В качестве таких веществ, стимулирующих рост микроорганизмов, применяются различные соли, органические и неорганические кислоты, аминокислоты и т. д. [4]. К одним из таких ростостимулирующих компонентов относится янтарная кислота.

Увеличение численности микроорганизмов при получении препарата на основе бактерий *Pseudomonas fluorescens* стало **целью** исследования.

**В задачи** исследования входило:

1) получение сравнительной оценки количества микроорганизмов *P. fluorescens*, выращенных на питательной среде с добавлением янтарной кислоты и без неё,

2) установление влияния начальной величины рН среды после внесения этой кислоты и в конце процесса культивирования микроорганизмов.

**Объектом** исследования являлись бактерии *Pseudomonas fluorescens* штамм AP-33 (рис.1).

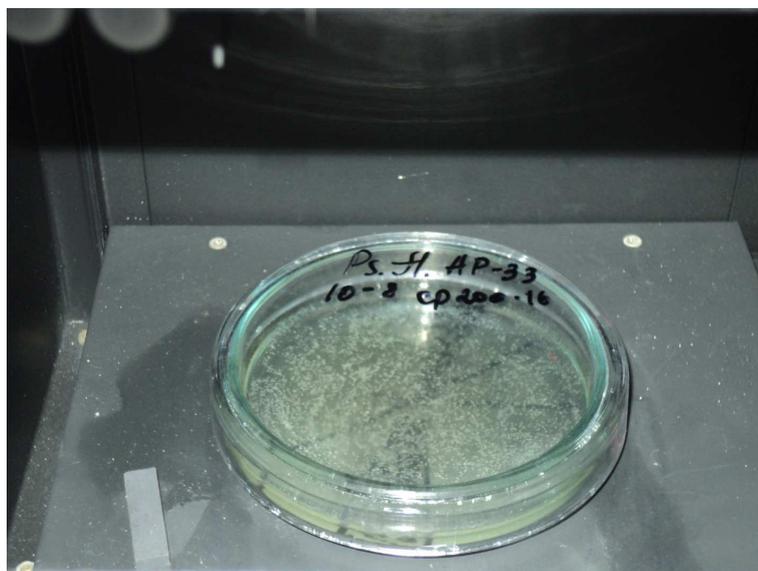


Рисунок 1. *P. fluorescens* штамм AP-33 рост на ГРМ-агаре  
(фото Н.В. Сединой)

Эти бактерии могут расти в интервале температур от +4°C до +41°, способны к окислению глюкозы, относятся к каталазаположительным грамотрицательным палочкам, развиваются в интервале рН от 5,0 до 7,2 (очень чувствительны к его снижению ниже 4,8), сапрофиты, поэтому нуждаются в готовых органических соединениях [3, 5, 9]

Бактерии рода *P. fluorescens*, заселяя ризосферную зону растения, продуцируют ферменты, антибиотики, в том числе вещества фунгицидного действия. Препараты на основе этих бактерии применяются в биологической защите растений от болезней, вызываемых грибами на стадиях ро-

ста их мицелия и споруляции (бурая ржавчина, темно-бурая и сетчатая пятнистости, септориоз, ризоктониоз, гельминтоспориозная корневая гниль и т.д.), а также бактериями и способствуют укреплению иммунитета растений. Применение ограничивается регистрацией препаратов, но эффективно в защите пшеницы, подсолнечника, кукурузы, люцерны, овощей. Известны интересные факты о том, что *P. fluorescens* обнаруживают у насекомых. Так, в 1925 году они были выделены из гусениц озимой совки, а позднее неоднократно были обнаружены в кишечнике насекомых [5].

Янтарная кислота используется в защите растений в качестве регулятора роста и стрессового адаптогена, а так же принимает участие в клеточном дыхании аэробных организмов, способствует увеличению содержания хлорофилла. Применение препаратов на основе янтарной кислоты, стабилизирует жизнедеятельность естественной почвенной микрофлоры, восстанавливает почвы, загрязненные токсичными органическими веществами. В целом считается, что янтарная кислота влияет на активность микрофлоры почвы, которые обеспечивают интенсивную биологическую переработку минеральных веществ [7, 9].

**Материал и методика исследований:** Культивирование микроорганизмов осуществляли на питательной среде, разработанной ООО МИП «Кубанские агротехнологии», основу которой составляют пшеничные отруби (рис. 2).



Рисунок 2. Культивирование *P. fluorescens* штамм AP-33 на среде из отрубей (фото Н.В. Седининой)

Инокуляцию питательной среды в лабораторных условиях проводили суспензией 1 мл чистой культуры *P. fluorescens* штамм AP-33 титр  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл, вносимой в 100 мл среды. Таким образом, уменьшая начальную микробную нагрузку до  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл питательной среды.

Контрольный образец №1 представлял собой культуральную жидкость, полученную путем культивирования микроорганизмов на среде из отрубей и сахара, и, содержащую микроорганизмы *P. fluorescens* штамм AP-33 в вегетативной форме, а так же продукты их метаболизма. В качестве образцов, применяемых для сравнительной оценки, использовали образцы, полученные путём культивирования микроорганизмов *P. fluorescens* на питательной среде такого же состава как для контрольных образцов, в качестве основы, но с добавлением в неё 0,01% и 0,1% (по отношению к объему питательной среды) янтарной кислоты - образцы № 2 и 3. Определение количества жизнеспособных клеток *P. fluorescens* штамм AP-33 осуществляли путём посева разведений, полученных культуральных жидкостей на среды Кинга и ГРМ-агар (гидролизат рыбной муки агар) - питательную среду, применяемую для бактерий и последующим

подсчётом выросших на ней колоний (рис. 3-6). Время культивирования на отрубях ограничили 7 сутками. Температура термостатирования бактерий на питательной среде составляла  $30\pm 2^\circ\text{C}$ .

**Результаты и обсуждение:** Основные результаты культивирования бактерий с использованием добавления в питательную среду янтарной кислоты при двух дозах внесения - 0,01% и 0,1% от объёма питательной среды и при разном времени экспозиции (4 и 7 суток) представлены на рисунках 3-6 и в таблице 1. Так визуально, количество колоний бактерий с использованием янтарной кислоты (см. рис. 5-6) оказалось существенно выше по сравнению с контролем (см. рис. 3-4) при разной продолжительности экспозиции в опыте, что и показали в дальнейшем расчёты (см. таблицу 1).



Рисунок 3. *P. fluorescens*, выращенные на среде из отрубей (контрольный вариант) в течение 4 суток (фото Н.В. Сединой)



Рисунок 4. *P. fluorescens*, выращенные на среде из отрубей (контрольный вариант) в течение 7 суток (фото Н.В.Сединой)



Рисунок 5. *P. fluorescens*, выращенные на среде из отрубей с добавлением янтарной кислоты в течение 4 суток (фото Н.В. Сединой)



Рисунок 6. *P. fluorescens*, выращенные на среде из отрубей с добавлением янтарной кислоты в течение 7 суток (фото Н.В. Сединой)

Таблица 1

Влияние добавления янтарной кислоты в питательную среду на основе пшеничных отрубей на биотехнологические показатели при культивировании бактерий *Pseudomonas fluorescens*

Вариант	Количество КОЕ/мл		рН среды (культуральной жидкости)	
	4 суток роста	7 суток роста	начальный	конечный
№1 - Контроль	$9,6 \times 10^9$	$6,0 \times 10^9$	7,00	5,0
№2 - Культуральная жидкость с добавлением 0,01% янтарной кислоты	$3 \times 10^{10}$	$9,6 \times 10^{10}$	6,95	4,7
№3 Культуральная жидкость с добавлением 0,1% янтарной кислоты	$5 \times 10^{10}$	$7,3 \times 10^{10}$	6,9	4,0

Таким образом, анализируя эти результаты, очевидно, что добавление янтарной кислоты в дозировке 0,01% и 0,1% к объёму питательной среды, способствует увеличению числа колоний бактерий *P. fluorescens*.

Однако культивирование этих бактерий связано со снижением рН, что объясняется гидролизом биополимеров (в основном полисахаридов и белков), хотя определённое влияние на снижение рН оказывает и сама янтарная кислота. Так в экспериментах конечный рН культуральной жидкости при культивировании в течение 7 суток с добавлением 0,1 % янтарной кислоты на 0,5 ниже, чем в варианте с её внесением 0,01% (см. табл. 1). При этом начинается и снижение титра бактерий, что можно связать с достижением рН критического оптимального значения для этих бактерий. Увеличение числа КОЕ/мл с  $6,0 \times 10^9$  в контрольном варианте до  $9,6 \times 10^{10}$  в варианте с добавлением 0,01 % янтарной кислоты позволяет снизить расход препарата, получаемого на основе *P. fluorescens*, для протравливания семян или обработок растений в период вегетации. Кроме того, полученные данные свидетельствуют, о том, что использование в качестве питания только отрубей и сахара для *P. fluorescens* может стать недостаточным для достижения более высокого титра препарата. Поэтому представленный способ использован для оптимизации технологического процесса получения препарата на базе ООО МИП «Кубанские агротехнологии». Кроме того полученные результаты представляют перспективу создания питательной среды с добавлением янтарной кислоты для культивирования микроорганизмов, то есть для биотехнологического производства.

#### Литература:

1. Котляров В.В., Сединина Н. В. Инновационная концепция микробиологической защиты растений // Материалы 3-го Всероссийского съезда по защите растений. Санкт-Петербург. 2013. С. 354-356.

2. Котляров В.В., Сединина Н. В., Котляров Д. В., Донченко Д. Ю. Экологизация и биологизация сельского хозяйства на примере технологии производства и применения бакового средства для защиты растений от болезней и насекомых-вредителей // Материалы 2-ой международной научно-практической конференции «Наука в современном информационном обществе» Москва. 2013. С. 142-144.

3. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В. В., Делекторская Н. Н., Золотницкая Р. П., и др. – М.: Медицина, 1987, - 368 с.

4. Тюкавкина Н. А., Бауков Ю. И. Биоорганическая химия: Учебник. – М.: Медицина, 1991. – 528с.

5. Биологическая защита растений / М. В. Штерншис, Ф. С. –У. Джалилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова; Под ред. М.В. Штерншис. – М.: КолосС, 2004. – 264с.
6. Применение физиологически активных веществ в агротехнологиях /В.В. Котляров, Ю.П. Федулов, К. А. Доценко, Д.В. Котляров, Е.К. Яблонская. – Краснодар: КубГАУ, 2013 – 169с.
7. Котляров В.В. Физиология иммунитета растений: Учебное пособие. /В.В. Котляров – Краснодар, 2006.- 102 с.
8. <http://www.agrariy-39.ru/> В.А. Есельсон. ПЛАНРИЗ. ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ.
9. <http://www.floralworld.ru/regulators/yantarnaya.shtml>

#### References:

1. Kotljarov V.V., Sedinina N. V. Innovacionnaja koncepcija mikrobiologicheskoj zashhity rastenij // Materialy 3-go Vserossijskogo sezda po zashhite rastenij. Sankt-Peterburg. 2013. S. 354-352.
2. Kotljarov V.V., Sedinina N. V., Kotljarov D. V., Donchenko D. Ju. Jekologizacija i biologizacija sel'skogo hozjajstva na primere tehnologii proizvodstva i primenenija bakovogo sredstva dlja zashhity rastenij ot boleznej i nasekomyh-vreditel'ej // Materialy 2-oj mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii «Nauka v sovremennom informacionnom obshhestve» Moskva. 2013. S. 142-144.
3. Laboratornye metody issledovanija v klinike: Spravochnik / Men'shikov V. V., Del'ektorskaja N. N., Zolotnickaja R. P., i dr. – М.: Medicina, 1987, - 368 s.
4. Tjukavkina N. A., Baukov Ju. I. Bioorganicheskaja himija: Uchebnik. – М.: Medicina, 1991. – 528s.
5. Biologicheskaja zashhita rastenij / М. В. Штерншис, Ф. С. –У. Джаллилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова; Под ред. М.В. Штерншис. – М.: КолосС, 2004. – 264с.
6. Применение физиологически активных веществ в агротехнологиях / В.В. Котляров, Ю.П. Федулов, К. А. Доценко, Д.В. Котляров, Е.К. Яблонская. – Краснодар: КубГАУ, 2013 – 169с.
7. Котляров В.В. Физиология иммунитета растений: Учебное пособие./ В.В. Котляров – Краснодар, 2006.- 102 с.
8. <http://www.agrariy-39.ru/> В.А. Есельсон ПЛАНРИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ
9. <http://www.floralworld.ru/regulators/yantarnaya.shtml>