

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии
и физиологии растений

**СОЗДАНИЕ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ШТАММОВ
ДЕСТРУКТОРОВ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента(ки) __2__ курса __241__ группы
направления (специальности) подготовки магистратуры 060401 Биология
биологического факультета
Сорокиной Дарьи Александровны

Научный руководитель
к.б.н., доцент

дата, подпись

О.Ю. Ксенофонтова
инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор

дата, подпись

С. А. Степанов
инициалы, фамилия

Саратов_2016год

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных задач современной биотехнологии является создание биопрепаратов на основе штаммов–деструкторов ксенобиотиков, выделенных из аборигенной микрофлоры, для решения комплекса задач, связанных с реабилитацией загрязненных почв в результате возрастающей техногенной нагрузки. Изучение состава микробоценозов загрязненных почв, его изменений в процессе ремедиации после внесения штамма–деструктора или консорциума микроорганизмов, динамики адаптации и развития внесенного биодеструктора в условиях взаимодействия с аборигенной микрофлорой и под влиянием естественных и антропогенных факторов, представляет значительный научный интерес как для теоретической, так и для прикладной микробиологии.

Для различных видов загрязнений почв используют соответствующие специфичные штаммы–биодеструкторы. Доказано, что выделение микроорганизмов, устойчивых к экотоксикантам, целесообразно проводить из почвы, длительно содержащей высокие концентрации ксенобиотиков. На настоящий момент выделено и депонировано большое количество штаммов пестицид–деструкторов как в виде монокультур, так и в консорциумах. Однако практическое их применение в целях биоремедиации почв возможно только после изготовления из них биопрепаратов.

Таким образом, все вышеизложенное определило цель и задачи исследования.

Цель работы: создание биопрепарата на основе штаммов пестицид–деструкторов, выделенных из аборигенной микрофлоры хронически загрязненных почв.

Задачи исследования:

1. Изучить антагонистические свойства штаммов деструкторов прометрина, гексахлорциклогексана (ГХЦГ) и трихлорметилди(N-хлорфенил)метана (ДДТ).

2. Подобрать оптимальную жидкую питательную среду для культивирования в ферментере и определить время выхода культур в фазу стационарного роста.
3. Изучить численность штаммов деструкторов при совместном культивировании в жидкой питательной среде и определить оптимальную посевную дозу для каждого штамма.
4. Оптимизировать биотехнологические параметры получения биомассы биодеструкторов на лабораторном ферментере.

Материал исследований

В работе использованы штаммы деструкторы пестицидов *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6, *Amphibacillus xylanus* 152, *Amphibacillus xylanus* 165 и *Jonesia denitrificans*, выделенные студентами кафедры микробиологии и физиологии СГУ.

Структура работы

Диплом изложен на 42 страницах и содержит разделы: введение, основная часть, заключение, выводы и список использованных источников. В основной части содержатся главы: 1.1. Основные механизмы очищения почвы от пестицидов; 1.2 Биопрепараты: составы и способы применения; 1.3 Методы промышленной биотехнологии для получения биомассы микроорганизмов, внутри которых имеются подглавы.

Научная новизна

Получен биопрепарат на основе штаммов деструкторов прометрина, гексахлорциклогексана (ГХЦГ) и трихлорметилди(N-хлорфенил)метана (ДДТ). Апробированы параметры совместного культивирования штаммов деструкторов *Amphibacillus xylanus* и *Pseudomonas putida* в жидкой питательной среде М9 с 1% глюкозы.

Положения, выносимые на защиту

При культивировании деструкторов в ГРМ-бульоне наибольший титр клеток (10^8) у штаммов деструкторов достигался на 10-12 часу эксперимента.

Титр клеток, выращенных на глюкозо-пептонной среде через 12 часов достигал своего пика, который соответствовал 10^7 кл/мл.

При росте культур в среде М9 с 1% глюкозы выход в стационарную фазу роста наступает на 24-26 часу культивирования, численность клеток составила $10^7 - 10^8$.

Совместное культивирование деструкторов приводит к снижению численности бактерий *Pseudomonas putida*. Для культивирования штаммов в ферментере, рекомендовано вносить культуры псевдомонад в 2 раза больше чем амфибацилл.

За 24 часа ферментации в лабораторном ферментере выход концентрата биопрепарата с численностью клеток в $4,6 \pm 0,2 \times 10^9$ в мл составляет 60 мл.

Основное содержание

Определение антагонистических свойств у штаммов деструкторов

Определение антагонистических свойств бактерий определяли на плотной питательной среде ГРМ-агаре методом перпендикулярных штрихов. В результате проведенных экспериментов определены антагонистические взаимоотношения между штаммами *Amphibacillus xylanus* и *Jonesia denitrificans* 151, которое проявлялось в ингибировании роста жонезий. В связи с этим для создания биопрепарата были отобраны штаммы *Amphibacillus xylanus* 152, *A. xylanus* 165, *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6.

Подбор оптимальной питательной среды для культивирования штаммов деструкторов в ферментере

Получение высококачественного биопрепарата напрямую зависит как от процесса культивации микроорганизмов так и от состава культуральной среды. Процесс ферментации, в свою очередь, является основным по техническим и по культивационным параметрам фактором оказываемый влияние на качество и эффективность биопрепарата. Задачей данного этапа

исследования является подбор недорогой питательной среды для культивирования бактерий рода *Pseudomonas* и *Amphibacillus* и увеличение выхода биомассы. Нами произведен подбор и анализ состава питательных сред для культивирования *Pseudomonas* sp. и *Amphibacillus*. Проведена сравнительная оценка таких питательных сред как: питательная среда МПБ, являющаяся одной из основных сред для культивирования большинства бактерий, глюкозо-пептонная среда (среда Голубева) для культивирования широкого спектра микроорганизмов и среда М9 с 1 % глюкозы в качестве источника углерода. Известные питательные среды МПБ и глюкозо-пептонная среда обеспечивают хороший рост культур, но имеют недостаток - высокую стоимость. Промышленное производство биопрепаратов на основе этих сред приведет к удорожанию целевого продукта. Использование же среды М9 с глюкозой, было обусловлено доступными и недорогими компонентами, входящих в состав этой среды, а также хорошим ростом на ней бактерий деструкторов. Полученные результаты скорости роста штаммов деструкторов на разных средах, представлены на рисунках 1-4.

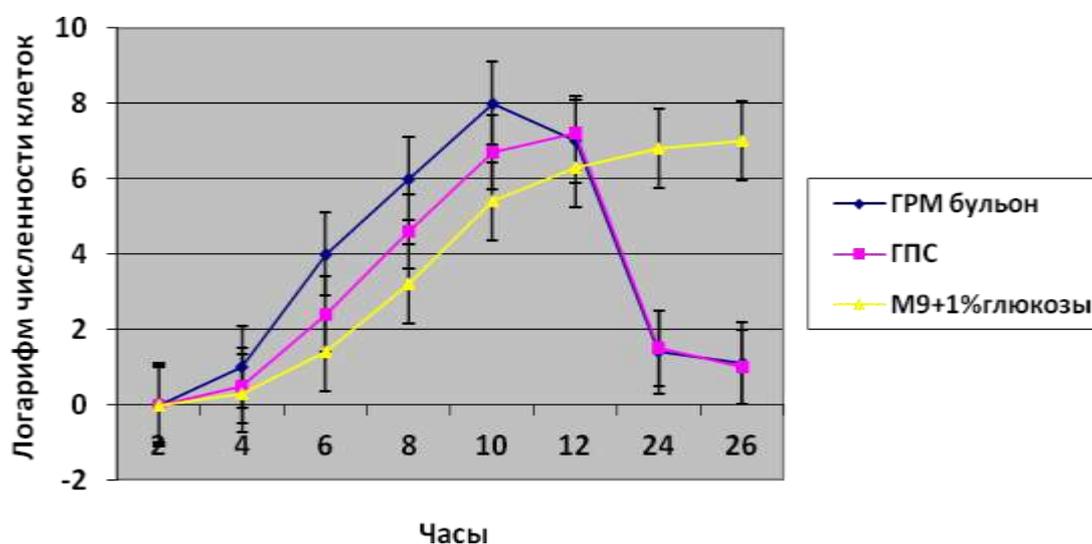


Рисунок 1- Кривая роста культуры *Amphibacillus xylanus* 152 в различных средах

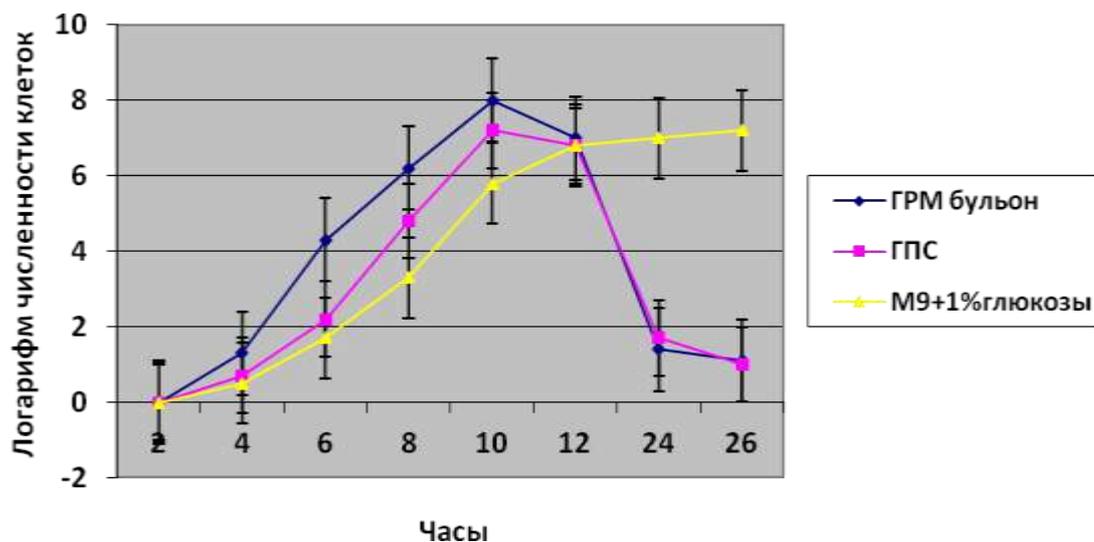


Рисунок 2- Кривая роста культуры *Amphibacillus xylanus* 165 в различных средах

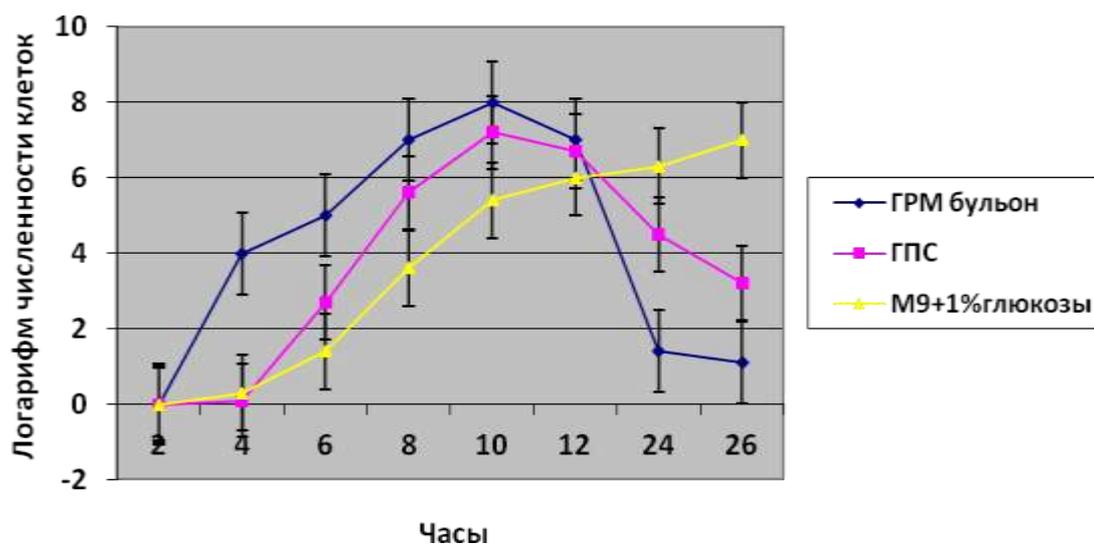


Рисунок 3- Кривая роста культуры *Pseudomonas putida* П2 в различных средах

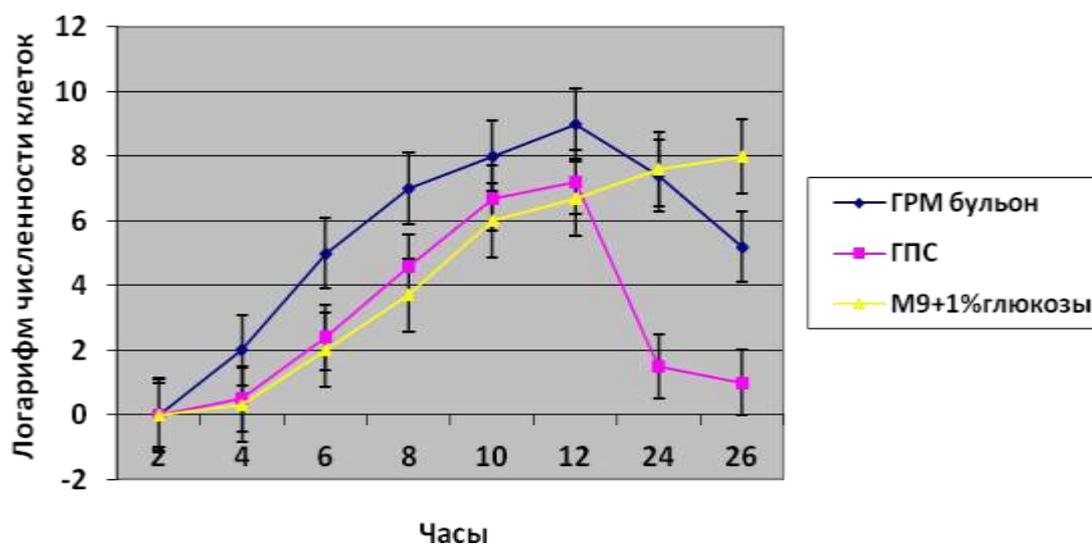


Рисунок 4- Кривая роста культуры *Pseudomonas putida* Пб в различных средах

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в среде ГРМ-бульон наибольший титр клеток (10^8) у всех изученных штаммов деструкторов достигался на 10-12 часу культивирования. Титр клеток, выращенных на глюкозо-пептонной среде, был немного ниже и через 12 часов достигал своего пика, который соответствовал 10^7 кл/мл. Затем рост культур шел на спад.

Рос культур в среде М9 с 1% глюкозы был несколько медленней, однако все культуры достигли своего пика численности, равного $10^7 - 10^8$ на 24-26 часу культивирования. На основании полученных данных, для культивирования в ферментере была выбрана среда М9 с глюкозой, т.к. она более экономична. Однако время ферментации необходимо увеличить до 26 часов для получения наибольшей биомассы штаммов деструкторов.

Изучение антагонистических взаимоотношений при совместном культивировании штаммов в жидкой питательной среде М9 с 1 % глюкозы

Изученные ранее антагонистические отношения методом диффузии в агар позволили выявить ингибирование бактерий *Jonesia denitrificans* штаммами *Amphibacillus xylanus*. Однако, возможно, не все метаболиты бактерий способны диффундировать в агар или обладают низкой скоростью

диффузии, в результате чего их влияние не было учтено. В результате, нами не были в полной мере изучены возможные отрицательные взаимодействия между штаммами. Анализ численности бактерий при совместном и раздельном культивировании бактерий в жидкой питательной среде при одинаковых условиях дает полное представление о возможных взаимодействиях между культурами. Это также позволяет подобрать наиболее оптимальные посевные дозы для наращивания биомассы штаммов в ферментере. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Численность бактерий при совместном и раздельном культивировании в течение 24 часов в жидкой среде М9 с 1% глюкозы

Сочетания культивируемых пар деструкторов	Численность штаммов деструкторов, КОЕ/мл	
	<i>Amphibacillus xylanus</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Amphibacillus xylanus</i> 152+ <i>Pseudomonas putida</i> П2	$4,6 \pm 0,2 \times 10^6$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^6$
<i>Amphibacillus xylanus</i> 165+ <i>Pseudomonas putida</i> П2	$5,6 \pm 0,5 \times 10^6$	$2,6 \pm 0,1 \times 10^5$
<i>Amphibacillus xylanus</i> 152 + <i>Pseudomonas putida</i> П6	$7,2 \pm 0,5 \times 10^6$	$3,5 \pm 0,5 \times 10^6$
<i>Amphibacillus xylanus</i> 165 + <i>Pseudomonas putida</i> П6	$6,6 \pm 0,3 \times 10^6$	$2,6 \pm 0,5 \times 10^6$
<i>Amphibacillus xylanus</i> 152	$5,6 \pm 0,5 \times 10^6$	-
<i>Amphibacillus xylanus</i> 165	$5,6 \pm 0,5 \times 10^6$	-
<i>Pseudomonas putida</i> П2	-	$6,6 \pm 0,2 \times 10^6$
<i>Pseudomonas putida</i> П6	-	$5,7 \pm 0,8 \times 10^6$

Анализ полученных данных показал, что при совместном культивировании снижается численность бактерий *Pseudomonas putida*. Возможно, *Amphibacillus xylanus* проявляет ингибирующие свойства по

отношению к псевдомонадам, либо обладает большей скоростью роста в данных условиях.

Следовательно, для культивирования штаммов в ферментере, целесообразно вносить культуры псевдомонад в 2 раза больше чем амфибацилл.

Выращивание биомассы деструкторов в ферментере

При изучении процесса роста культур было замечено, что стационарная фаза наступала на 24-26 часу ферментации. Показатели оптической плотности при таком режиме культивирования в среднем достигали 25–25 оптических единиц, что соответствовало $(4,6 \pm 0,2) \times 10^8$ кл/мл. В ферментер с 540 мл стерильной среды М9 вносили 60 мл (10 % от общего объема культуральной жидкости) инокулята. В конце цикла, после выхода культуры в стационарную фазу роста, культуральную жидкость сливали полностью и откручивали на центрифуге Sigma 6–16KS при 8000 об/мин в течение 20 мин при 25 °С. Отмытый осадок биомассы ресуспендировали до общего объема 60 мл для получения однородного десятикратного концентрата биомассы $(4,6 \pm 0,2) \times 10^9$ кл/мл. Концентрированную суспензию хранили в холодильнике в стерильной емкости при 4 °С не более недели.

Таким образом, выход концентрата препарата с численностью клеток в $4,6 \pm 0,2 \times 10^9$ в мл составил 60 мл за 24 часа ферментации. Для приготовления рабочего раствора биопрепарата из концентрата, его необходимо разбавлять в 100 раз для получения раствора с рекомендуемой для ремедиации земель концентрацией клеток деструкторов, равной $4,6 \pm 0,2 \times 10^7$. Полученный объем биопрепарата составит 6 л, что достаточно для обработки 6 кг земли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом перпендикулярных штрихов определены антагонистические взаимоотношения между штаммами *Amphibacillus xylanus* и *Jonesia denitrificans* 151, которое проявлялось в ингибировании роста жонезий. В связи с этим для создания биопрепарата были отобраны штаммы *Amphibacillus xylanus* 152, *A. xylanus* 165, *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6.

Сравнительная оценка роста культур на различных питательных средах (МПБ, глюкозо-пептонная среда (среда Голубева) и среда М9 с 1 % глюкозы в качестве источника углерода) определила время выхода культур в стационарную фазу. При росте на среде ГРМ-бульоне у штаммов *Pseudomonas* и *Amphibacillus* наибольший титр клеток (10^8) отмечен на 10-12 часу культивирования, на глюкозо-пептонной среде через 12 часов культивирования максимальная численность составила 10^7 кл/мл. Рост культур в среде М9 с 1% глюкозы пик максимальной численности отмечен на 24-26 часу культивирования и достигал значений $10^7 - 10^8$ кл/мл.

Таким образом, выход концентрата препарата с численностью клеток в $4,6 \pm 0,2 \times 10^9$ в мл составил 60 мл за 24 часа ферментации. Для приготовления рабочего раствора данного биопрепарата из концентрата необходимо разбавлять в 100 раз для получения раствора с рекомендуемой для ремедиации земель концентрацией клеток деструкторов, равной $4,6 \pm 0,2 \times 10^7$ в 1 мл. Полученный объем биопрепарата составит 6 л, что достаточно для обработки 60 кг земли.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы *Amphibacillus xylanus* обладают антагонистической активностью к штамму *Jonesia denitrificans* 151, которое проявляется в ингибировании на плотной питательной среде.
2. При росте на среде ГРМ-бульоне у штаммов *Pseudomonas* и *Amphibacillus* наибольший титр клеток (10^8) отмечен на 10-12 часу культивирования, на глюкозо-пептонной среде через 12 часов культивирования максимальная численность составила 10^7 кл/мл. Рост культур в среде М9 с 1% глюкозы пик максимальной численности отмечен на 24-26 часу культивирования и достигал значений $10^7 - 10^8$ кл/мл.
3. При культивировании бактерий *Pseudomonas putida* и *Amphibacillus xylanus* в жидкой питательной среде М9 с 1 % глюкозы необходимо увеличивать посевную дозу псевдомонад в 2 раза.
4. Культивирование бактерий деструкторов в течение 24 часов в лабораторном ферментере с общим объемом 1 л при температуре 30 °С, скорости перемешивания 300 об/мин, рН культуральной жидкости $7,0 \pm 0,05$, аэрации воздухом 0,6 л/мин приводит к выходу 60 мл концентрата препарата с численностью клеток бактерий деструкторов $4,6 \pm 0,2 \times 10^9$ в мл. Объем рабочего раствора с концентрацией клеток деструкторов, равной $4,6 \pm 0,2 \times 10^7$ в 1 мл составит 6 литров, что позволяет обработать 60 кг загрязненной почвы.