



УДК 579.22.7; 632.9; 632.95

**ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. *THURINGIENSIS* ШТ. 98**

**И.Е. Парамонова, Н.И. Некрасова, И.В. Чарыкова, М.В. Фоменко,
Н.А. Талжанов, Д.С. Балпанов**

ТОО «Научно-аналитический центр «Биомедпрепарат», г. Степногорск, РК
biomedpreparat@bk.ru

Изучено влияние различных источников азотного и углеродного питания на рост и продуктивность культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* шт. 98. Разработана и оптимизирована питательная среда для культивирования *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* шт. 98 - продуцента β -экзотоксина, содержащая кормовые дрожжи, кукурузную муку и минеральные соли, не уступающая по продуктивности и содержанию β -экзотоксина паспортной среде ДПС.

Ключевые слова: средства защиты растений, штамм-продуцент, β -экзотоксин, *Bacillus thuringiensis*, энтомоцидные кристаллы, культивирование.

Введение

При разработке систем интегрированной защиты растений, позволяющих обеспечить высокий выход высококачественной и безвредной сельскохозяйственной продукции, все большее внимание уделяется методам биологического контроля численности насекомых, в частности, использованию микробиологических средств защиты растений. Одним из наиболее эффективных и широко применяемых (около 90-95% рынка биопестицидов) средств борьбы с насекомыми являются препараты на основе культуры *Bacillus thuringiensis* (Bt) [1, 2].

Преимуществами биопестицидов на основе Bt по сравнению с химическими инсектицидами являются отсутствие загрязняющих остатков, высокая специфичность действия, обуславливающая их безопасность для нецелевых организмов и низкая стоимость регистрации. Однако, в то же время, они обладают рядом недостатков: сравнительно узкий спектр действия, слишком короткое время жизни, высокая стоимость, что не позволяет им стать полноценной альтернативой химическим агентам борьбы с насекомыми. Уменьшение стоимости производства может быть, в

частности, достигнуто и достигается за счет оптимизации условий выращивания, использования более дешевых питательных сред и повышения образования β -экзотоксина.

Размножение *Bacillus thuringiensis* при периодическом культивировании обычно проводится на сложных питательных средах неопределенного состава, обязательно содержащих источники углеродного и азотного питания: это могут быть дрожжи белково-витаминного концентрата (БВК), кукурузный экстракт, отходы пивоваренного производства, дрожжевой экстракт, меласса, гидролизат казеина и т.д., а также минеральные соли, регуляторы роста [3, 4].

В состав дрожже-полисахаридной среды (ДПС) для культивирования *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* шт. 98 входят мука кукурузная и дрожжи БВК, в настоящее время снятые с производства.

Совершенствование технологического процесса культивирования *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* шт. 98 предполагает поиск новых более эффективных и дешевых субстратов и оптимизацию питательной среды по источнику азотного и углеродного питания.

Целью настоящей работы является разработка рецептуры продуктивной питатель-



ной среды для культивирования штамма *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* *um.* 98 на основе оптимального подбора питательных субстратов, не уступающей по продуктивности паспортной питательной среде ДПС.

Материалы и методы

Объектом исследований служил штамм-продуцент *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um.* 98.

Компоненты и состав питательных сред для культивирования штамма подбирали исходя из потребностей культуры в углеводном, азотном питании. В опытах изучали влияние различных форм органического азота и углерода на продуктивность *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um.* 98. При этом исследовали питательные субстраты, наиболее распространенные в практике производства микробиологических препаратов. В качестве источников азота испытывали: соевую муку, кормовые дрожжи; в качестве источников углерода: кукурузную муку, картофельный крахмал.

Первоначальную оценку перспективности использования каждого из новых видов сырья осуществляли путем замены дрожжей БВК и кукурузной муки на другие виды сырья в количестве, обеспечивающем содержание в исходной питательной среде крахмала (0,9-1,5)% и аминного азота (50-80) мг%.

Для засева питательных сред использовали посевной материал (2% по объему), полученный при помощи смыва спор культуры со скошенной агаризованной среды СПА 1,5%.

Культивирование проводили в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл, с объемом среды – 15 мл, на термостатируемой качалке с числом оборотов 240 мин⁻¹ при температуре (30±1)°С до появления в культуре не менее 95% свободных спор.

В качестве контрольной среды использовали питательную среду ДПС (3,0:1,5).

В культуральной жидкости (КЖ) определяли: стадию и синхронность

развития культуры, концентрацию клеток, содержание β-экзотоксина, концентрацию питательных веществ.

Стадию и синхронность развития культуры оценивали в процессе культивирования методом микроскопии живых препаратов с подсчетом процента вегетативных форм клетки, а в состоянии спорообразования – свободных спор и кристаллов.

Микробиологическую продуктивность штамма оценивали по титру спор на 1 мл КЖ и содержанию β-экзотоксина.

Титр бактериальных спор в КЖ определяли методом серийных разведений с последующим высевом в плотную питательную среду. Подсчет количества выросших колоний производили после 24-часового выращивания культуры в термостате при температуре (30±1)°С.

Содержание β-экзотоксина определяли согласно утвержденной лабораторной методике по определению содержания β-экзотоксина в культуральной жидкости *Bacillus thuringiensis* спектрофотометрическим методом [5].

Метод основан на способности β-экзотоксина показывать максимум поглощения YZ-лучей при длине волны 260 нм, а при длине волны 290 нм – незначительное остаточное поглощение. Отношение $\sum 290 / \sum 260$ является для чистого экзотоксина величиной постоянной и равно 0,023.

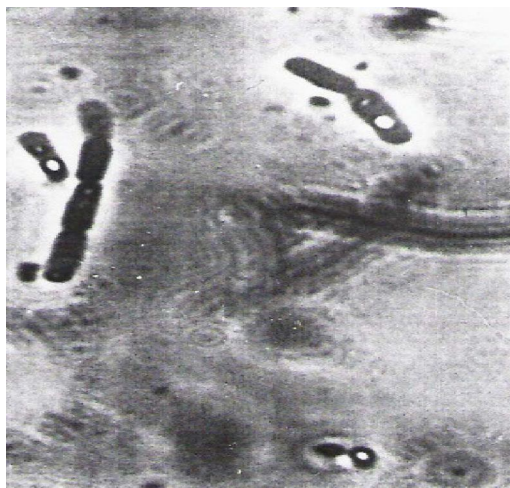
В питательных средах определяли биохимические показатели: pH, аминный азот, крахмал. pH среды определяли потенциометрическим методом [6]. Содержание аминного азота определяли методом формольного титрования [7]. Содержание крахмала определяли методом Бертрана [8].

Результаты и обсуждение

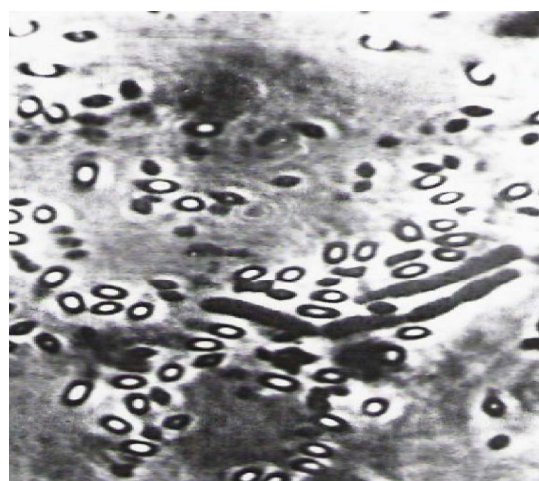
Характеристика штамма *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um.* 98: при глубинном культивировании в культуре вырастают перетрихальные, грам-положительные, спорообразующие палочки (рисунок 1а). Морфологической особенностью клеток продуцента является



наличие в спорангии одного, иногда двух белковых параспоральных включений – токсический кристалл (ромбовидной и круглой формы) (рисунок 1б).



а)



б)

Рис. 1. 2-суточная культура *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* шм. 98 на среде ДПС:

а) вегетативные и заспорованные клетки палочковидной формы, расположены одиночно или в цепочках; б) кристаллы δ -токсинов и овальные споры (препарат «раздавленная капля», увеличение в 2080 раз)

Кроме кристалловидных δ -токсинов, бактерии выделяют в среду растворимые в воде энтомоцидные вещества, из которых наибольший интерес представляет термостабильный токсин, или β -экзотоксин. В отличие от энтомоцидных кристаллов, разрушающихся при 50-60°C, β -экзотоксин не разрушается даже при 100-120°C. Он является сравнительно низкомолекулярным

соединением нуклеотидной природы. β -экзотоксин представляет собой 2-0-(4-0-5-L-дезоксиаденозин-5-ил-D-глюкопиранозил)-4-O-фосфо-D-алларовую кислоту. В составе термостабильного экзотоксина обнаружены два родственных вещества, названных турингиензинами – А и В.

Препараты, разработанные на основе штаммов, образующих в процессе своего развития β -экзотоксин, имеют более широкий спектр инсектицидной активности против чешуекрылых, жесткокрылых, двукрылых, прямокрылых насекомых и против клещей.

Питательная среда для культивирования *Bacillus thuringiensis* обязательно содержит углерод, который служит первичным сырьем для синтеза нового клеточного материала или вырабатываемых клетками продуктов. Доступным источником углерода обычно выступают углеводы. Они являются одной из важнейших составных частей сред для культивирования микроорганизмов. Источником углеродного питания может служить спирт $C_2 - C_5$ (этиловый, бутиловый), глюкоза, кукурузный и картофельный крахмал, меласса, сусло из зерновой сечки, отходы переработки зерна, зерновой ферментативный крахмал. Оптимальным содержанием углеводов в среде для роста и развития культуры *Bacillus thuringiensis* является 1,0-1,5%, увеличение количества ухудшает спорообразование, а снижение уменьшает концентрацию клеток.

Динамика потребления азотистых компонентов характеризуется двухфазностью развития популяции: вегетативным ростом и спорообразованием. В первой фазе происходит активное потребление этих ингредиентов с момента начала активного роста популяции до стадии спорообразования. Во второй фазе наблюдается некоторое накопление азотистых продуктов в связи с их поступлением в среду из-за разрушения клеточных стенок. В качестве источников азотного питания можно использовать соевую муку, дрожжи



пекарские, фильтрат барды, кукурузный экстракт, муку из обезжиренных эндоспермов семян хлопчатника, дрожжевые экстракты, сыворотку, гидролизаты казеина, соли аммония.

Минеральные соли также необходимы для роста микроорганизмов. Так, например, для споруляции клеток требуется марганец, для термостойкости спор – кальций. При добавлении в питательную среду ионов кальция и марганца повышается степень патогенности *Bacillus thuringiensis* [9].

Некоторые соли могут быть необходимы только для клеточного роста. Установлено действие солей железа, бария, висмута, алюминия, натрия и калия на токсиногенез *Bacillus thuringiensis* [10].

Для замены дефицитного сырья и подбора оптимальных условий для культивирования *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um. 98* разработано 4 варианта питательных сред на основе кормовых дрожжей и соевой муки (таблица 1).

Таблица 1

Продуктивность культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um. 98* и содержание β-экзотоксина на питательных средах разного компонентного состава

Компоненты питательных сред, г/л	ДПС контроль	КДПС	СКС	СКС -1
Дрожжи БВК	30,0			
Кормовые дрожжи		30,0		
Соевая мука			20,0	20,0
Кукурузная мука	15,0	15,0		10,0
Крахмал картофельный			10,0	
K ₂ HPO ₄				1,0
KH ₂ PO ₄				5,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄			1,5	1,0
K ₂ SO ₄			0,1	
CaCl ₂	1,5	1,5	1,5	4,0
MgSO ₄			1,3	0,5
MnSO ₄			0,2	0,5
NaCl				1,0
ZnSO ₄				0,2
Вода водопроводная	До 1 л			
Титр, спор/мл 10 ⁹	3,96±0,15	4,1±0,26	3,24±0,24	3,41±0,22
Содержание β-экзотоксина, мкг/мл	1064	852	435	391

Как показывают результаты экспериментов, дрожже-полисахаридная среда на основе кормовых дрожжей (КДПС) по экзотоксинообразованию незначительно уступает контрольной среде ДПС, а по титру спор несколько превышает. На соево-кукурузной среде (СКС, СКС-1) титр спор находится на уровне контроля, содержание β-экзотоксина снижается в 2,7 раза.

В дальнейшем проведены работы по оптимизации состава ферментационной питательной среды на основе кормовых дрожжей (КДПС) с целью снижения

содержания балластных веществ и повышения продуктивности.

Подработаны прописи 4 питательных сред на основе кормовых дрожжей с добавлением минеральных солей (таблица 2).

Добавление минеральных солей к основному составу питательной среды КДПС позволяет увеличить синтез β-экзотоксина в 1,5 раза (среда КДПСМ-2), при снижении содержания в питательной среде кормовых дрожжей с 30,0 до 20,0 г/л (среды КДПСМ-3, 4) продуктивность штамма по содержанию β-экзотоксина остается на высоком уровне.



Таблица 2

Продуктивность культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* um.98 и содержание β-токсина на питательных средах, разработанных на основе кормовых дрожжей

Компоненты питательных сред, г/л	КДПС контроль	КДПСМ	КДПСМ- 1	КДПСМ- 2	КДПСМ- 3	КДПСМ- 4
1	2	3	4	5	6	7
Кормовые дрожжи	30,0	30,0	30,0	30,0	20,0	20,0
Кукурузная мука	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
K ₂ HPO ₄			5,0	5,0	5,0	5,0
KH ₂ PO ₄			5,0	5,0	5,0	5,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄				1,0	1,0	2,0
CaCl ₂		1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
MgSO ₄			0,1	0,1	0,1	0,1
MnSO ₄			0,2	0,2	0,2	0,2
Вода водопроводная	1,5					
Титр, спор/мл 10 ⁹	3,96±0,15	4,1±0,23	2,95±0,21	3,27±0,36	3,73±0,2	3,73±0,28
Содержание β-экзотоксина, мкг/мл	1064±96	852±86	910±95	1248±120	1245±132	1212±104

Таким образом, в процессе работ разработана питательная среда для глубинного культивирования *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* 98 на основе кормовых дрожжей (КДПСМ-3), содержащая в %: дрожжи кормовые – 2,0; мука кукурузная – 1,5; калий фосфорнокислый двузамещенный – 0,5; калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,5; аммоний фосфорнокислый двузамещенный – 0,1; кальций хлористый – 0,15; магний сернокислый – 0,01; марганец сернокислый – 0,02; вода водопроводная – до 100.

Оптимальная продолжительность культивирования на данной среде при температуре (29±1)°C 40 – 45 ч.

Предлагаемая питательная среда КДПСМ-3 не уступает по продуктивности спор паспортной питательной среде ДПС, по содержанию β-экзотоксина превышает в 1,2 раза. В состав среды КДПСМ-3 входят

более дешевые субстраты по сравнению со средой ДПС.

Заключение

В результате проведенных исследований разработана новая питательная среда (КДПСМ-3) на основе кормовых дрожжей, кукурузной муки с добавлением минеральных солей для глубинного культивирования *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* um. 98, превышающая продуктивность среды ДПС по содержанию β-экзотоксина в 1,2 раза. Данная среда может быть рекомендована для использования в производстве биологического инсектицидного препарата «Битокситурин», применяемого для борьбы с гусеницами и личинками вредоносных насекомых (колорадский жук, паутинный клещ, капустная совка, златогузки, пяденицы т.д.).

Литература

1. Азизбеян Р.Р., Миненкова И.Б., Смирнова Т.А., Шагов Е.М., Константинова Г.Е., Дебабов В.Г., Параскевов В.Г., Калужский В.Е., Турков М.И. Штамм бактерий *Bacillus thuringiensis*, предназначенный для приготовления инсектицидного препарата против жесткокрылых насекомых и инсектицидный препарат на его основе // Описание изобретения к авторскому свидетельству. – 2003.



2. Азизбеян Р.Р., Гулько М.А., Миненкова И.Б., Соколов А.К. Штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* – продуцент эндотоксина против жесткокрылых насекомых и его культивирования // Описание изобретения к авторскому свидетельству. – 2004.
3. Африкян Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. – Ереван, 1973. – 420 с.
4. Абросимова Л.Н. Некоторые условия образования экзотоксина различными штаммами *Bacillus thuringiensis* // Бюллетень ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. – Л., 1982. – №38. – 43 с.
5. МВИ №30135217-02-2009 «Метод определения содержания β -экзотоксина в препарате «Битокситурин» и других препаратах на основе *Bacillus thuringiensis*».
6. ЛМХ/СОП-01 «Определение pH в пробах воды».
7. ЛМ «Определение аминного азота методом формольного титрования».
8. ЛМ «Определение редуцирующих веществ методом Бертрана».
9. Абросимова Л.Н., Бабаева П.В., Зубарева Г.М., Шевцов В.В. Влияние минеральных солей на экзотоксинообразование и продуктивность культуры *Bacillus thuringiensis* // Микробиология. – Т. 55, вып. 3, 1986. – С. 40-44.
10. Петрова И.Д., Татьков С.И. Влияние ионов металлов на процессы культивирования *Bacillus thuringiensis* // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 1983. – №1. – С.56-59.

Түйін

Бұл мақалада *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 98 штамын өсіруде қолайлы қоректік субстраттарды таңдау барысында құнарлы қоректік орта құрамы дайындалды. *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 98 табиғи түрінің өнімділігіне және өсуіне әртүрлі азотты және көміртекті қорегінің әсері зерттелді. Құрамында азықты ашытқылар, ұн және минералды тұздар бар *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 98 шт. β -экзотоксин продуцентін өсіруде қолайлы қоректік орта өңделді.

Summary

This paper presents results of research dedicated to development of the protocol for productive nutrient medium for cultivation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain 98 based on optimal selection of nutrient substrates. Here the effects of different sources of nitrogen and hydrocarbon nourishment on growth and productivity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain 98 were studied. The nutrient medium for cultivation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain 98 producing β -exotoxin containing food yeasts, corn flour and mineral salts was developed and optimized.