

УДК 579.017.8

## ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОУДОБРЕНИЯ «АЗОЛЕН»

© Т.Н. Леонтьева, Е.В. Кузина, О.Н. Логинов

С помощью метода полного факторного эксперимента ПФЭ 2<sup>4</sup> разработана питательная среда, оптимизированная по двум параметрам: титр клеток и антигрибная активность.

Ключевые слова: биоудобрение, «Азолен», питательная среда, математическое моделирование, антигрибная активность.

При промышленном производстве биопрепаратов высокая стоимость питательных сред значительно повышает стоимость целевого продукта. Снижение затрат на отдельные компоненты сред путем замены их на аналогичные, более дешевые варианты является перспективной задачей.

Основой микробиологического удобрения «Азолен» является выделенный в Институте биологии УНЦ РАН штамм бактерий *Azotobacter vinelandii* ИБ 4, обладающий антигрибной и ростостимулирующей активностью [1]. Для культивирования штамма *A. vinelandii* ИБ 4 ранее использовалась среда ВКМ №40 [2], в состав которой входит такой дорогостоящий компонент, как дрожжевой экстракт, что не позволяет использовать эту среду для промышленного получения биоудобрения «Азолен». В качестве альтернативы дрожжевого экстракта может быть использован автолизат хлебопекарных дрожжей, который содержит весь аминокислотный комплекс, а также витамины группы В, но при этом характеризуется более низкой стоимостью и доступностью.

Известно, что качество получаемого биопрепарата напрямую зависит от сбалансированности состава питательной среды. Для подбора оптимального соотношения компонентов среды с целью повышения количества биомассы и увеличения накопления антибио-

тических веществ микроорганизмов в культуральной жидкости нами были использованы методы математического планирования эксперимента, которые позволяют изучить действие нескольких факторов на исследуемый процесс [3].

Таким образом, целью настоящей работы являлась оптимизация состава питательной среды для промышленного производства биоудобрения «Азолен».

**Материал и методы.** Культуру *A. vinelandii* ИБ 4 выращивали при 28° С и  $n = 180$  мин<sup>-1</sup> на установке УВМТ-12-250 в колбах емкостью 250 мл со 100 мл питательной среды в течение 48 ч. За основу была взята среда для *Azotobacter* следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,2$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,8$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,2$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,1$ ,  $\text{FeCl}_3 -$  следы,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 -$  следы, дрожжевой экстракт – 0,5, сахароза – 20,0, вода дистиллированная. В опытных вариантах варьировали источник углерода, а также источники азота и фосфора. В качестве источника азота нами был использован дрожжевой автолизат, полученный путем термостатирования при 50° С в течение суток смеси хлебопекарных дрожжей с водой и хлороформом, последующего автоклавирования и декантации.

Оптимизацию состава ферментационной питательной среды проводили с приме-

ЛЕОНТЬЕВА Татьяна Николаевна, Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: biolab316@yandex.ru  
КУЗИНА Елена Витальевна – к.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: biolab316@yandex.ru  
ЛОГИНОВ Олег Николаевич – д.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: biolab316@yandex.ru

нением математического планирования эксперимента в два этапа: 1 – построение адекватной математической модели процесса; 2 – нахождение оптимального состава среды методом крутого восхождения [3].

Для получения простейшей адекватной модели потребовалось связать выходные параметры системы с входными – концентрациями компонентов питательной среды. В качестве выходных параметров были взяты: антигрибная активность ( $Y_1, Y_2$ ), которую оценивали методом лунок на тест-культурах и титр клеток ( $Y_3$ ), который устанавливали с использованием метода предельных разведений с последующим высевом на агаризованную среду. В качестве тест-культур были взяты фитопатогенные грибы *Bipolaris sorokiniana* Shoem. и *Fuzarium oxysporum* Schlecht (коллекция микроорганизмов Института биологии УНЦ РАН) – возбудители обыкновенных корневых гнилей.

В эксперименте одновременно проверяли серию вариантов ферментационных сред, в которых все компоненты (факторы) варьировались на двух количественных уровнях (верхнем «+» и нижнем «-»). Для проведения полного факторного эксперимента были выбраны только те компоненты питательной среды, уровень которых оказывает влияние на исследуемые нами выходные факторы. Число вариантов полного факторного экспери-

мента (ПФЭ) соответствовало числу всех возможных сочетаний варьируемых компонентов среды. Таким образом, для  $n$  факторов, каждый из которых был взят на 2-х уровнях концентрации, число вариантов состава сред равняется  $2^n$ . Такой факторный эксперимент обозначается как ПФЭ- $2^n$ .

В качестве четырех факторов варьирования были взяты сахароза ( $X_1$ ), дрожжевой автолизат ( $X_2$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_3$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $X_4$ ). Уровни варьирования представлены в табл. 1, содержание остальных компонентов ферментационной среды было зафиксировано на следующих уровнях:  $\text{MgSO}_4$  – 0,2 г/л,  $\text{CaSO}_4$  – 0,1 г/л,  $\text{FeCl}_3$  – 0,01 г/л,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  – 0,01 г/л.

После соответствующей математической обработки экспериментальных данных зависимость антигрибной активности (титра клеток) штамма от концентрации в среде варьируемых компонентов представляется в виде многофакторного уравнения регрессии, являющегося искомой математической моделью процесса [3].

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n,$$

где  $x_n$  – содержание соответствующего компонента в среде в условных единицах («+1» – верхний уровень, «-1» – нижний уровень);  $Y$  – активность штамма (мм), титр клеток (КОЕ/мл среды);  $b_n$  – коэффициенты регрессии, отра-

Т а б л и ц а 1

Компоненты питательной среды и их уровни варьирования в ПФЭ  $2^4$

Компонент среды	Фактор	Средний уровень «0»	Нижний уровень «-»	Верхний уровень «+»	Единица варьирования
Сахароза, г/л	$X_1$	20,00	5,00	35,00	15,00
Дрожжевой автолизат, мл/л	$X_2$	5,00	2,00	8,00	3,00
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , г/л	$X_3$	0,20	0,10	0,30	0,10
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ , г/л	$X_4$	0,80	0,50	1,10	0,30
$\text{MgSO}_4$ , г/л	Постоянный уровень – 0,20				
$\text{CaSO}_4$ , г/л	Постоянный уровень – 0,10				
$\text{FeCl}_3$ , г/л	Постоянный уровень – 0,01				
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , г/л	Постоянный уровень – 0,01				

жающие степень влияния концентрации в среде  $n$ -го фактора на антигрибную активность (титр клеток)  $Y$ .

Для расчета  $b_n$  использовалась формула Йейтса:

$$b_n = \frac{(\sum X_n Y_n)}{N},$$

где  $X_n = 1$  – значение фактора в соответствующем варианте факторного эксперимента;  $Y_n$  – величина активности штамма (титра клеток) в соответствующем варианте;  $N$  – общее число вариантов в ПФЭ.

Следующий этап – определение оптимального состава ферментационной среды по схеме «крутого восхождения», в вариантах которого последовательно, с определенным шагом изменяли концентрации компонентов в среде. В серии вариантов одновременно увеличивали или уменьшали дозы тех факторов, коэффициенты регрессии при которых имели соответственно знаки «+» или «-».

**Результаты и их обсуждение.** Было проведено 16 экспериментов согласно существующей матрице планирования с различным варьированием исследуемых факторов (табл. 2).

В результате экспериментов были получены результаты, позволяющие вычислить коэффициенты уравнений регрессии математических моделей зависимости функций  $Y_1$  и  $Y_2$  (антигрибная активность на грибе *B. sorokiniana* Shoem и *F. oxysporum* Schlecht соответственно) и  $Y_3$  (титр клеток) от концентрации в ферментационной среде компонентов  $X_1, X_2, X_3, X_4$ .

Соответственно уравнения регрессии выглядят следующим образом:

$$Y_1 = 26,62 + 0,56X_1 - 0,27X_2 - 0,69X_3 - 0,4X_4,$$

$$Y_2 = 25,33 + 0,13X_2 - 0,21X_2 - 1,63X_3 + 0,62X_4,$$

$$Y_3 = 4,87 + 3X_1 + 1,72X_2 + 0,7X_3 - 0,02X_4.$$

Таблица 2

ПФЭ и его результаты для штамма *A. vinelandii* ИБ 4

Вариант	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y_1, мм$	$Y_2, мм$	$Y_3, млрд КОЕ/мл$
1	-	-	-	-	24,3±0,50	26,0±0,50	0,16±0,04
2	+	-	-	-	28,3±0,50	26,7±0,50	6,49±0,07
3	-	+	-	-	26,0±0,50	28,7±0,50	3,60±0,20
4	+	+	-	-	30,3±0,50	23,7±0,50	6,77±0,13
5	-	-	+	-	26,3±0,50	19,7±0,50	1,20±0,10
6	+	-	+	-	23,3±0,50	24,3±0,50	8,01±0,09
7	-	+	+	-	27,3±0,50	22,3±0,50	2,62±0,12
8	+	+	+	-	28,3±0,50	26,3±0,50	10,25±0,63
9	-	-	-	+	29,3±0,50	28,3±0,50	0,64±0,34
10	+	-	-	+	28,0±0,50	24,3±0,50	2,37±0,13
11	-	+	-	+	25,7±0,50	28,3±0,50	3,74±0,13
12	+	+	-	+	24,7±0,50	29,7±0,50	9,58±0,34
13	-	-	+	+	24,3±0,50	26,0±0,50	0,66±0,14
14	+	-	+	+	29,3±0,50	29,0±0,50	5,65±0,11
15	-	+	+	+	25,3±0,50	22,3±0,50	2,33±0,07
16	+	+	+	+	25,0±0,50	19,7±0,50	13,82±0,28
17	0	0	0	0	28,7±0,50	23,3±0,50	10,96±0,26

Из полученных уравнений следует, что зависимости для антигрибной активности штамма *A. vinelandii* ИБ 4 на различных фитопатогенных грибах носят несколько отличный характер.

Установлено, что увеличение концентрации сахарозы, дрожжевого автолизата и калия фосфорнокислого однозамещенного положительно образом влияет на титр клеток штамма *A. vinelandii* ИБ 4. При этом избыточное содержание в среде азота и фосфора ведет к снижению антигрибной активности.

Опираясь на приведенные выше уравнения, по методу «крутого восхождения» был рассчитан оптимальный состав питательной среды для получения культуральной жидкости штамма *A. vinelandii* ИБ 4 с высоким титром и значительной антагонистической активностью.

Таким образом, оптимизированная питательная среда для производства биоудобрения

«Азолен» имеет следующий состав (г/л, мл/л): сахараза – 26,0, дрожжевой автолизат – 4,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1,  $\text{FeCl}_3$  – следы,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  – следы, вода дистиллированная.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Пугачева Е.Г. Бактерии *Azotobacter vinelandii* – основа биопрепарата, обладающего фунгицидной активностью: дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2004.
2. Дзержинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов: учеб. пособие. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. 348 с.
3. Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1969. 126 с.

## OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION IN AZOLEN BIOFERTILIZER PRODUCTION

© T.N. Leonteva, E.V. Kuzina, O.N. Loginov

The paper describes a complete factorial experiment CFE 2<sup>4</sup> by means of which we have optimized the nutrient medium composition in the production of Azolen biological fertilizer.

Key words: biofertilizer, biological product, nutrient, mathematical modeling, antifungal activity.