

Воздействие низкой температуры на динамику численности и проявление биоконтролирующего эффекта бактериями родов *Pseudomonas* и *Bacillus*

Канд. техн. наук Е.И.КИПРУШКИНА
СПбГУНиПТ

Specific effects of different temperatures (4, 14, 24, 34°C) on the numbers and the exhibition of biocontrolling effect by bacteria of genera Pseudomonas and Bacillus are considered. The values of specific rate of growth (dying off) of the cells of Pseudomonas and Bacillus have been found; the antagonistic activity of these microorganisms at different temperatures of the experiment have been determined.

Биологический контроль фитопатогенов – обязательный элемент современных интегрированных биотехнологий в растениеводстве.

Однако и в процессе хранения в холодильных камерах при температурах, близких к криоскопической, растительная продукция поражается психрофильными патогенными микроорганизмами. Плоды и овощи нуждаются в безопасных и эффективных средствах защиты в процессе длительного холодильного хранения, поскольку потери урожая от болезней в осенне-зимний период могут быть значительно выше, чем во время вегетации.

Эксперименты, проводимые в Санкт-Петербургском государственном университете низкотемпературных и пищевых технологий совместно с ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, показали высокую эффективность применения штаммов ризосферных бактерий для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур и защиты их от заболеваний [1, 2, 3]. В результате многолетних исследований был разработан биопрепаратор комплексного действия «Экстрасол» [Гос. рег. № 05-9117-9120-01-7-01], активным биоагентом которого являются ризосферные азотфикссирующие бактерии и их метаболиты.

Важным фактором биологической защиты является способность бактерий-антагонистов, входящих в состав биопрепарата, адаптироваться к внешним условиям и продуцировать биологически активные соединения, ответственные за антагонизм. В связи с этим необходимо изыскание оптимальных условий, технологических режимов биообработки, способствующих проявлению потенциальных антагонистических свойств, продуцированию биоконтрольных веществ применяемых бактерий-антагонистов в условиях холодильного хранения.

Методика

В качестве объектов исследования были выбраны аген-

ты биологического контроля фитопатогенов штаммы *Pseudomonas fluorescens* 228, *Bacillus subtilis* 076 и *Bacillus subtilis* 083, входящие в состав биопрепарата.

Бактерии штамма *Pseudomonas fluorescens* 228 для приготовления бактериальной суспензии выращивали в жидкой среде Кинга Б (пептон – 20 г/л, глицерин – 10 г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 г/л, KH_2PO_4 – 0,2 г/л) на качалке или в ферментере в течение 24...26 ч при 26...30 °C до достижения в культуральной жидкости титра 10^9 кл/мл.

Культуры бактерий *Bacillus subtilis* 076 и *Bacillus subtilis* 083 выращивали в жидкой питательной среде следующего состава: пептон – 20 г/л, глицерин – 10 г/л, $MgSO_4$ – 1,5 г/л, K_2HPO_4 – 1,5 г/л, на качалке или в ферментере при 37 °C в течение 24...36 ч до достижения в культуральной жидкости титра 10^9 кл/мл.

Адаптогенность бактериальных клеток изучали при температурах 4, 14, 24 и 34 °C; определяли численность бактерий и анализировали антагонистическую активность в течение 40 сут проведения эксперимента. Исходная плотность бактериальных суспензий в этих опытах составляла: *Pseudomonas fluorescens* 228 – $7,4 \cdot 10^9$ кл/мл, *Bacillus subtilis* 076 – $7,5 \cdot 10^9$ кл/мл и *Bacillus subtilis* 083 – $5,6 \cdot 10^9$ кл/мл.

Антагонистическую активность вышеуказанных штаммов оценивали по отношению к тест-грибу *Botrytis cinerea* – одному из наиболее агрессивных и опасных фитопатогенов. С этой целью *Botrytis cinerea* высевался газоном на агаризованную среду, состоящую из отвара отрубей с мелом. Одновременно методом «колодцев» в указанную среду вносились культуры бактерий-антагонистов.

Результаты и их обсуждение

Большой интерес представляет изучение кинетических закономерностей роста и отмирания исследуемых культур и выявление факторов, влияющих на численность популяции антагонистов.

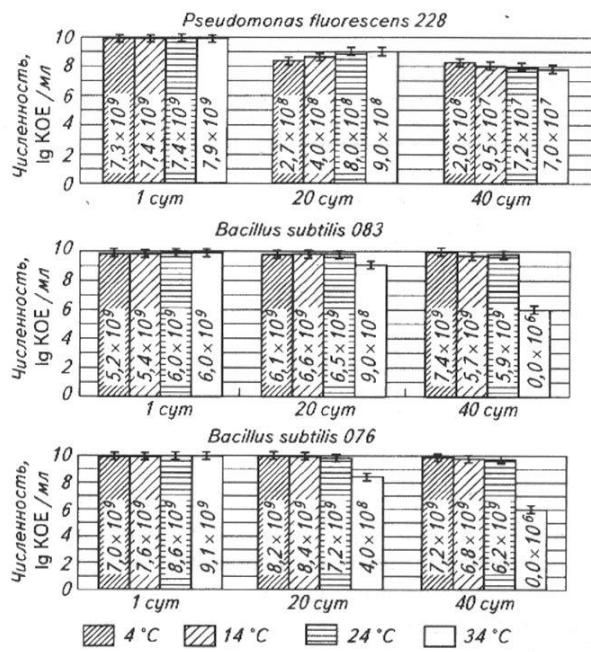


Рис. 1. Динамика численности культур *Pseudomonas fluorescens* 228, *Bacillus subtilis* 076 и *Bacillus subtilis* 083 при различных температурных режимах хранения бактериальных супензий

Рассматривая адаптивную способность бактерий-антагонистов, входящих в состав используемого защитного биопрепарата, при низких температурах, близких к оптимальному температурному режиму холодильного хранения плодово-овощной продукции, исследовали влияние температуры на динамику численности бактериальных клеток и антрафунгальную активность.

На рис. 1 приведены данные по динамике численности культур *Pseudomonas fluorescens* 228, *Bacillus subtilis* 076 и *Bacillus subtilis* 083 при различных температурах хранения. Эти же экспериментальные данные представлены на рис. 2, 3 и 4 в виде графиков в полулогарифмических координатах «логарифм численности популяции – время» ($\ln N - t$).

Динамика популяции в условиях периодического культивирования описывается следующим дифференциальным уравнением [5]:

$$dN/dt = \mu N,$$

где N – число клеток;

μ – удельная скорость роста/отмирания клеток.

Это уравнение является уравнением с разделяющими-ся переменными и легко может быть решено:

$$N = N_0 \exp[\mu t],$$

где N_0 – начальное число клеток.

В полулогарифмических координатах данное уравнение может быть представлено следующим образом:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t.$$

Анализ кинетических кривых (рис. 2, 3 и 4) показал, что экспериментальные данные группируются около прямой линии: существует линейная зависимость между ло-

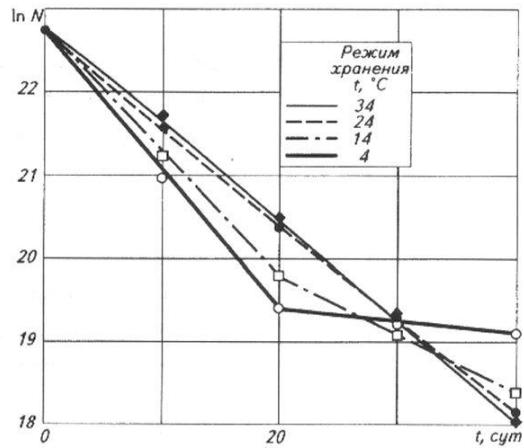


Рис. 2. Определение кинетических параметров отмирания культуры *Pseudomonas fluorescens* 228 при различных температурных режимах хранения

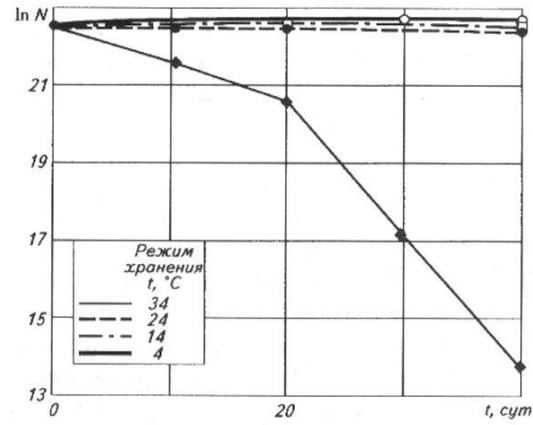


Рис. 3. Определение кинетических параметров роста (отмирания) культуры *Bacillus subtilis* 083 при различных температурных режимах хранения

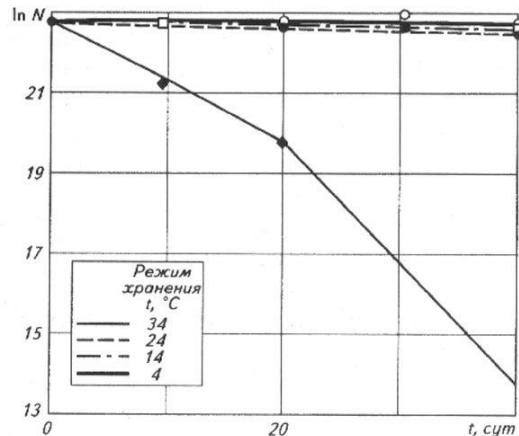


Рис. 4. Определение кинетических параметров роста (отмирания) культуры *Bacillus subtilis* 076 при различных температурных режимах хранения

Таблица 1
Влияние температуры на изменение удельной скорости роста
(отмирания) бактериальных клеток

Вид бактериальной культуры	Удельная скорость роста (отмирания) культур μ , сут ⁻¹							
	$\mu_{роста}$				$\mu_{отмирания}$			
	4 °C	14 °C	24 °C	34 °C	4 °C	14 °C	24 °C	34 °C
Pseudomonas fluorescens 228	—	—	—	—	0,1661	0,1472	0,116	0,1168
Bacillus subtilis 083	0,007	0,0003	0,0013	—	—	—	—	0,34
Bacillus subtilis 076	0,0023	0,0028	0,0035	—	—	—	—	0,2995

графиком численности клеточных культур *Pseudomonas fluorescens* 228, *Bacillus subtilis* 076 и *Bacillus subtilis* 083 и временем. Тангенс угла наклона прямой равен удельной скорости роста (отмирания) культуры (табл. 1).

Как следует из рис. 1 и 2, бактерии рода *Pseudomonas fluorescens* 228 обладают способностью адаптироваться к различным температурам (4, 14, 24, 34 °C) и сохраняют высокое значение титра на протяжении длительного времени во всех вариантах опыта.

В начале проведения эксперимента наибольшее значение титра бактерий *Pseudomonas fluorescens* 228 было при температуре 34 °C. В ходе эксперимента с течением времени наименьшая численность бактериальных клеток была характерна именно для данного варианта (34 °C).

Первоначально удельная скорость отмирания клеток *Pseudomonas fluorescens* 228 была максимальна при температурах 4 и 14 °C в течение 20 сут (участки прямой с большим углом наклона на рис. 2, соответствующие быстрой стадии снижения бактериального титра). В табл. 1 приведены величины удельной скорости отмирания на этой стадии. Однако в дальнейшем происходило приспособление псевдомонад к пониженным температурам, резко снижалась скорость отмирания, и соответственно увеличивалась стабильность титра данных бактерий.

При исследовании бактериальных суспензий штаммов *Bacillus subtilis* 076 и *Bacillus subtilis* 083 установлено, что данные бактерии также хорошо адаптируются в условиях низких температур. Численность клеток бацилл на протяжении всего модельного эксперимента в диапазоне температур от 4 до 24 °C изменялась незначительно (рис. 3, 4).

При температуре 4 °C даже на 40-е сутки отмечен хотя и незначительный, но рост титра бактериальной суспензии *Bacillus subtilis* 083.

При температуре 34 °C скорость отмирания бактериальных клеток бацилл обоих штаммов максимальна, особенно в последние 20 сут проведения эксперимента (в табл. 1 указано значение удельной скорости отмирания клеток в этот период). Вероятно, увеличение температуры ведет к необратимой инактивации клеточных компо-

нентов, прежде всего к денатурации белков и нуклеиновых кислот, и гибели клетки и (или), скорее всего, при повышенной температуре увеличивается скорость потребления субстрата, что в последующем лимитирует рост бактериальных клеток.

Псевдомонады и бациллы – типичные представители психрофильных микроорганизмов. Ряд исследователей [4, 6] отмечают, что скорость роста психрофилов меньше зависит от снижения температуры, чем скорость роста мезофиллов.

Таким образом, поддерживается жизнедеятельность психрофилов в диапазоне температур, приемлемых для холодильного хранения плодовоовощной продукции, что способствует их применению в составе защитных биологических препаратов.

Приспособление психрофильных микроорганизмов к пониженным температурам проявляется в изменении состава мембран (в них повышается содержание ненасыщенных жирных кислот), ферменты имеют низкие температурные оптимумы активности. В целом белки психрофилов по сравнению с мезофильными содержат больше полярных групп, чем гидрофобных, их транспортные системы также работают лучше при низких температурах [5, 6].

Наиболее устойчивыми к разнообразным неблагоприятным физическим и химическим факторам являются бактерии рода *Bacillus*, которые образуют эндоспоры, имеющие большое значение для выживания в неблагоприятных условиях [7].

Представители родов *Pseudomonas* и *Bacillus* являются «поставщиками» биоконтролирующих агентов.

Существенное влияние на проявление антагонистических свойств бактерий оказывает температура. Однако данные о температурной зависимости продуцирования антагонистами биоконтрольных веществ неоднозначны. Так, у некоторых бактериальных популяций рода *Bacillus* нижний порог образования антибиотических веществ на глюкозодрожжевом экстракте составляет 12 °C, а при росте на почвенном экстракте 14...16 °C [7]. Флуоресцирующие псевдомонады лучше проявляли антагонизм при 12 или

Таблица 2
Влияние температуры на антифунгальную активность бактерий-антагонистов

Штаммы антагонистов	Температура, °C	Диаметр зоны ингибирования <i>Botrytis cinerea</i> , мм	
		20 сут	40 сут
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 228	4	34,3±1,3	33±1,2
	14	35±1,1	27,4±1,6
	24	31±2	26±2
	34	31±1,8	12,4±0,8
<i>Bacillus subtilis</i> 076	4	31±0,3	26,5±1,2
	14	26±1	23±0,4
	24	27,1±1,7	18,5±1,7
	34	23,4±1,9	0
<i>Bacillus subtilis</i> 083	4	15,4±0,8	25,2±1
	14	15±1,0	35±1,2
	24	13,2±0,9	24,8±0,8
	34	22,1±1,7	0

18 °C, чем при более высоких температурах. У штамма *Pseudomonas fluorescens* 88W биоконтрольная активность лучше при 5 и 15 °C, чем при 25 °C [8].

Исследуемые бактериальные суспензии были протестированы на наличие антагонистической активности по отношению к фитопатогенному грибу *Botrytis cinerea*. Следует отметить, что по способности поражать плодово-овощную продукцию при холодильном хранении наиболее вредоносными являются именно грибы рода *Botrytis*. Холодильные камеры представляют собой искусственную нишу для данного патогена, которому свойственна адаптация синтеза ферментов при низких температурах, что определяет возможность участия данного гриба в процессах, вызывающих ухудшение качества и потери массы растительной продукции при холодильном хранении.

Все исследованные штаммы бактерий *Pseudomonas fluorescens* 228, *Bacillus subtilis* 076 и *Bacillus subtilis* 083 ингибировали развитие гриба *Botrytis cinerea* (табл.2).

Для псевдомонад было характерно пролонгированное воздействие на фитопатоген в течение всего времени проведения эксперимента. Повышение температуры с 24 до 34°C отрицательно сказалось на эффективности подавления роста *Botrytis cinerea*: антагонистическая зона сократилась более чем в 2 раза.

Культура бацилл *Bacillus subtilis* 076 проявляла больший антагонизм (биоконтроль) на 20-е сутки исследования бактериальных суспензий. Причем диаметры зон ингибирования роста грибного мицелия вокруг лунок с бакте-

риальной культурой варьировали при разных температурах незначительно (в пределах 23...31 мм).

Бациллы штамма *Bacillus subtilis* 083 в начале эксперимента слабее действовали на патоген, затем при адаптации к условиям окружающей среды активность их возрастала. Чувствительность патогена к бациллярным антибиотикам снижалась с повышением температуры. При 34 °C на 40-е сутки зоны антагонистической активности отсутствовали. Со снижением численности бактерий снижалась и их антифунгальная активность.

Для бацилл и псевдомонад характерен незначительный интервал оптимальных температур (4...14 °C), в котором отмечена пролонгированная и максимальная эффективность антифунгальной активности, причем реакция на изменение температуры зависит от видовой принадлежности штамма.

В целом явно прослеживается тенденция снижения биоконтроля с повышением температуры и со снижением численности популяций бактерий-антагонистов.

Проведенные эксперименты показывают возможность применения штаммов *Pseudomonas fluorescens* 228, *Bacillus subtilis* 076 и *Bacillus subtilis* 083 для создания защитных биопрепараторов, которые могут быть использованы для сокращения потерь растительной продукции от инфекционных заболеваний при длительном холодильном хранении.

Список литературы

1. Кипрушкина Е.И., Колодязная В.С., Хотянович А.В. Экспериментальное обоснование биотехнологических основ хранения растительного сырья // Доклады РАСХН. 2003. № 3.
2. Кипрушкина Е.И., Колодязная В.С., Чеботарь В.К. Экологически безопасный биологический метод сохранения сельскохозяйственной продукции // Вестник защиты растений. 2003. № 3.
3. Кипрушкина Е.И., Петров В.Б., Чеботарь В.К. Защитно-стимулирующие свойства биопрепарата при вегетации и хранении картофеля // Доклады РАСХН. 2005. № 3.
4. Кудряшева А.А. Микробиологические основы сохранения плодов и овощей. – М.: Агропромиздат, 1986.
5. Метаболизм микроорганизмов: Учеб.пособие / Под ред. Н.С.Егорова. – М.: Изд-во Моск.ун-та, 1986.
6. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ.вузов/ А.И.Нетрусов, Е.А.Бонч-Осмоловская и др.; Под ред. А.И.Нетруса. – М.: издат.центр «Академия», 2004.
7. Lengkeek V.H., Otta J.D. Biological control attempts using five species of bacillus as seed-treatments of wheat//Proc. N.D.Acad.Sci. 1979/ - V.33.
8. Vandenhove H., Merckx R., Wilmost H., Vlassak K. Survival of *Pseudomonas fluorescens* inocula of different physiological stages in soil//Soil Biol. Biochem. 1991.V23.