УДК 579.841.2 + 579.852.1]:57.032:[663.033:57.083.1

А.О. Рой, О.Г. Кістень, І.Ю. Царенко, І.К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ БАКТЕРІЙ *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 І *Bacillus subtilis* IMB B-7023 В ЧИСТИХ ТА ЗМІШАНІЙ КУЛЬТУРАХ ЗА УМОВ ЇХ ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

Досліджені особливості росту Azotobacter vinelandii IMB B-7076 і Bacillus subtilis IMB B-7023 в оптимізованих середовищах у моно- та змішаній культурах за їх глибинного культивування для моделювання стадії нарощування біомаси в біотехнології створення комплексного бактеріального препарату для рослинництва. При вирощуванні B. subtilis IMB B-7023 в монокультурі питома швидкість росту цих бактерій була вищою, ніж у A. vinelandii IMB B-7076. Зважаючи на це, при культивуванні змішаної культури живильне середовище в ферментері інокулювали суспензіями бактерій A. vinelandii + B. subtilis у співвідношенні 10:1. Найбільше накопичення біомаси спостерігали після 24 годин вирощування змішаної культури. Відпрацьовані умови глибинного культивування A. vinelandii IMB B-7076 і B. subtilis IMB B-7023 у ферментері можуть бути рекомендовані для отримання як монокультур, так і змішаної культури цих штамів бактерій з високим вмістом життєздатних клітин у біотехнології промислового виготовлення комплексного бактеріального препарату для рослинництва.

К л ю ч о в і с л о в а: Azotobacter vinelandii IMB B-7076, Bacillus subtilis IMB B-7023, змішана культура, глибинне культивування, особливості росту.

Одним із важливих напрямків сучасної біотехнології є створення комплексних біопрепаратів для рослинництва на основі двох або декількох штамів мікроорганізмів, що спричиняють суттєвий синергетичний, стимулювальний вплив на ріст і розвиток рослин [1]. Створення комплексних біопрепаратів пов'язане зі складностями, які обумовлені необхідністю селекції високоактивних штамів мікроорганізмів, які б не пригнічували фізіолого-біохімічну активність при співіснуванні у змішаній культурі.

Розробка біотехнології створення комплексних мікробних препаратів, як правило, передбачає нарощування достатніх кількостей біомаси, що досягається у процесі глибинного культивування мікроорганізмів. Одним із першочергових етапів вирішення даної проблеми є підбір складу живильного середовища, яке б забезпечувало ростові потреби та біологічну активність штамів у змішаній культурі, оскільки використання монокультур та їх роздільне вирощування є економічно менш доцільним для одержання біомаси бактерій.

Нами селекціоновані високоефективні штами азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 і фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* IMB B-7023 [2–3], на основі яких створено комплексний бактеріальний препарат для рослинництва «Азогран», що покращує азот-

© А.О. Рой, О.Г. Кістень, І.Ю. Царенко, І.К. Курдиш, 2016

не та фосфорне живлення рослин, стимулює їх ростову активність завдяки синтезу біологічно-активних речовин, захищає рослини від фітопатогенів, деяких видів фітофагів та стресових факторів [4–6]. Препарати для рослинництва на основі цих штамів бактерій одержували при їх вирощуванні в монокультурах з подальшим змішуванням суспензій в об'ємному співвідношенні 1:1. Умови глибинного культивування цих бактерій у ферментерах не відпрацьовані.

Метою роботи було дослідження особливостей росту *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 і *Bacillus subtilis* IMB B-7023 в оптимізованих середовищах у моно- та змішаній культурах за їх глибинного культивування для відпрацювання умов нарощування біомаси в біотехнології створення комплексного бактеріального препарату для рослинництва.

Матеріали і методи. У дослідженнях використовували азотфіксувальні бактерії *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 [2] та фосфатмобілізувальні бактерії *Bacillus subtilis* IMB B-7023 [3], виділені та селекціоновані у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

На першому етапі дослідження бактерії вирощували у колбах Ерленмейєра (об'ємом 750 мл), що містили по 100 мл поживного середовища наступного складу (г/л): меляса – 15,0; 30,0; 50,0; кукурудзяний екстракт – 2,0–7,0; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 0,25; KH_2PO_4 – 0,25; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3; NaCl – 0,3; $CaCO_3$ – 3,0; pH= 7,0–7,2 в умовах періодичного культивування на качалках (240 об/хв) при 28 °С протягом 24 год [7, 8]. Це середовище інокулювали суспензією *B. subtilis* IMB B-7023 та *A. vinelandii* IMB B-7076 у різних співвідношеннях.

Досліди з відпрацювання ефективних режимів глибинного культивування штамів *A. vinelandii* IMB B-7076 та *B. subtilis* IMB B-7023 проводили в лабораторному ферментері «BIOTEC» (Швеція) (робочий об'єм 2,5 л). Дослідження проводили за наступних умов: режим аерації в перші 4 години роботи апарату встановлювали на рівні 0,1 л/хв, збільшуючи його у подальшому до 0,25 л/хв. Швидкість обертання мішалки в перші 4 години становила 200 об/хв. У подальшому її збільшували до 300 об/хв$^{-1}$, що забезпечувало підвищення сульфітного числа з 0,5 до 1,7 гO_2/л·год. При глибинному культивуванні азотобактера та бацили в лабораторному ферментері у середовищі з мелясою протягом перших 3-х годин спостерігали утворення піни, яка може спричиняти негативний вплив на ріст бактерій. У зв'язку з цим нами застосовано режим включення аеродинамічного піногасника. Через кожну годину стерильно відбирали зразки суспензії і визначали pH та оптичну густину суспензії за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 при довжині хвилі 540 нм, кювета 0,5 см. З інтервалом у 3 години визначали чисельність життєздатних клітин методом десятикратних розведень і висіву на агаризоване середовище Ешбі – для азотобактера, та на картопляний агар – для бацили, з наступним підрахунком колонієутворюючих одиниць (КУО). Питому швидкість росту бактерій розраховували за загальноприйнятими в мікробіології методами [9].

Досліди проводили у трьох повторах. Статистичну обробку результатів робили за Лакіним (1990), використовуючи критерій Стьюдента при 5 % рівні значимості [10].

Результати та їх обговорення. У попередніх дослідженнях були оптимізовані живильні середовища з мелясою для культивування бактерій-компонентів комплексного препарату для рослинництва. Оптимізоване середовище для вирощування *A. vinelandii* IMB B-7076 містило 50,0 г/л меляси, 7,0 г/л кукурудзяного екстракту та 0,6 г/л фосфатвмісних неорганічних солей. При культивуванні у цьому середовищі в періодичних умовах у колбах Ерленмейєра, за 24 години чисельність життєздатних клітин азотобактера досягала $1{,}1 \cdot 10^9$ КУО/мл [11]. Оптимізоване середовище для *B. subtilis* IMB B-7023 містило 15,0 г/л меляси, 2,0 г/л кукурудзяного екстракту та 0,4 г/л фосфатвмісних неорганічних солей. При вирощуванні бацили у такому середовищі в періодичних умовах при вихідній кількості клітин $1{,}0 \cdot 10^6$ за 24 години культивування їх чисельність досягала $1{,}3 \cdot 10^{10}$ КУО/мл [12]. За таких умов вирощування питома швидкість росту бацили на 24 годину становила μ=0,054 год $^{-1}$, а азотобактера – μ=0,046 год$^{-1}$.

Таким чином, оптимізовані середовища з мелясою та кукурудзяним екстрактом для вирощування азотобактера та бацили в монокультурах дозволяли одержати високі показники чисельності клітин. Такі результати отримані в середовищах, що містили різні рівні меляси, оптимальні для кожного з цих штамів, при вирощуванні в періодичних умовах в колбах Ерленмейєра на качалках (240 об/хв).

Для виготовлення комплексного бактеріального препарату бажано вирощування цих штамів у змішаній культурі, що є більш економічно вигідним. Для цього потрібне середовище, яке б забезпечувало швидкий ріст кожного з досліджених штамів. Тому, в подальшому використовували середовище, що містило 30 г/л меляси та 2 г/л кукурудзяного екстракту, в якому в періодичних умовах визначали ростову активність азотобактера та бацили. Ріст *B. subtilis* IMB B-7023 на такому середовищі в періодичних умовах культивування представлений на рис. 1. За таких умов вирощування бацили її чисельність на 24 годину становила $9{,}8 \cdot 10^9$ КУО/мл, що на порядок нижче ніж у попередніх дослідах. У той же час швидкість росту *B. subtilis* була в 2 рази більша ніж на раніш оптимізованому середовищі [12].

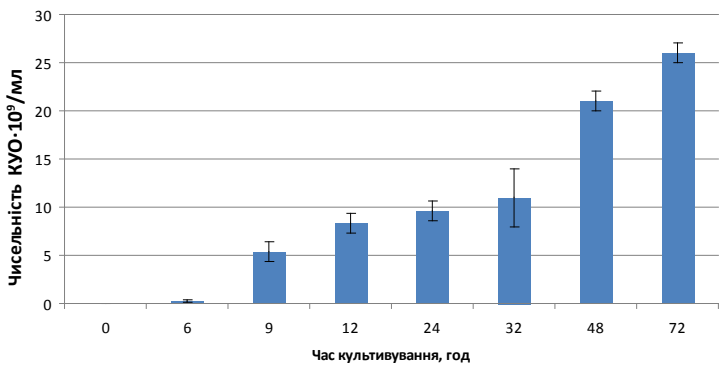

Рис. 1. Чисельність бактерій *B. subtilis* IMB B-7023 за їх культивування в періодичних умовах у середовищі, що містило 30 г/л меляси та 2 г/л кукурудзяного екстракту

Для вирощування *A. vinelandii* IMB B-7076 використовували середовище, що містило 30 г/л меляси та 5 г/л кукурудзяного екстракту (див. Матеріали і методи). Чисельність клітин азотобактера на початку досліду становила $1{,}3 \cdot 10^7$ КУО/мл. При культивуванні азотобактера в такому середовищі в періодичних умовах у колбах на качалці найбільшу кількість клітин спостерігали після 32 годин культивування – $2{,}5 \cdot 10^9$ КУО/мл (рис. 2). Подібна чисельність клітин була раніше отримана після 24 годин вирощування в оптимізованому середовищі [11].

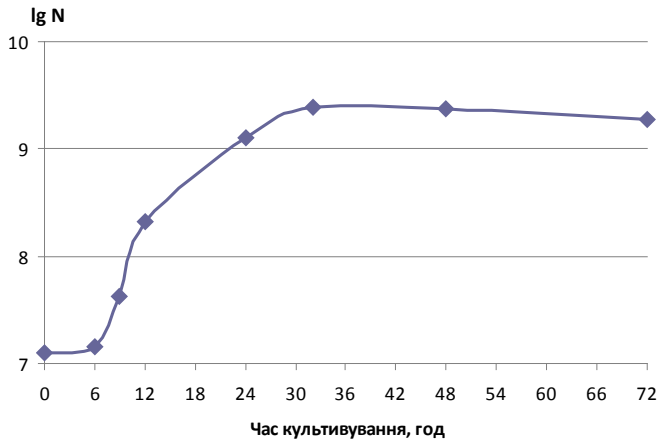

Рис. 2. Чисельність *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 за культивування в періодичних умовах вирощування в середовищі з 30 г/л меляси і 5 г/л кукурудзяного екстракту

У зв'язку з тим, що у процесі виготовлення комплексного препарату доцільно культивувати *B. subtilis* і *A. vinelandii* одночасно у середовищі одного складу, нами визначена ростова активність їх змішаної культури за вмісту в середовищі 30 г/л меляси і 2 г/л кукурудзяного екстракту (див. Матеріали і методи). Так, при вирощуванні змішаної культури цих бактерій у такому середовищі в періодичних умовах у колбах Ерленмейєра з початковою чисельністю життєздатних клітин 10^7 КУО/мл кожного штаму, після 24 годин інкубації кількість бацил зростала до 10^9 КУО/мл, тоді як азотобактера – була на порядок нижчою. Це було обумовлено тим, що швидкість росту бацил у даному середовищі була вищою від азотобактера. У таких умовах *B. subtilis*, що мала меншу лаг-фазу, розмножувалась швидше, інтенсивніше споживала поживні субстрати і підкислювала середовище до pH 5,8–6,0, що не сприяло росту азотобактера. Зважаючи на вищевказане, в наступних дослідах кількість бацил на початку експерименту задавали в середовище на порядок нижчою, ніж азотобактера (табл. 1). За вирощування змішаної культури в середовищі з 30,0 г/л меляси після 24 годин культивування чисельність *A. vinelandii* у ньому досягала $1{,}3 \cdot 10^9$ КУО/мл, а *B. subtilis* – $1{,}6 \cdot 10^9$ КУО/мл (табл. 1). Досліджені умови одночасного культивування азотобактера та бацили в середовищі, що містило 30,0 г/л меляси, дозволили отримати достатньо високі і майже однакові показники чисельності кожного штаму бактерій при їх глибинному культивуванні в періодичних умовах у колбах протягом 24 годин. Штам *A. vinelandii* IMB B-7076 при сумісному вирощуванні з *B. subtilis* IMB B-7023 у даних умовах проявляв таку ж ростову актив-

Таблиця 1

Ріст змішаної культури *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 та *Bacillus subtilis* IMB B-7023 в середовищі з 30 г/л меляси

Час культивування, год.	*A. vinelandii*, КУО/мл	*B. subtilis*, КУО/мл
0	$(1,3\pm0,1)\cdot10^7$	$(7,6\pm0,6)\cdot10^6$
6	$(1,4\pm0,1)\cdot10^7$	$(1,0\pm0,1)\cdot10^8$
9	$(4,2\pm0,2)\cdot10^7$	$(6,0\pm0,4)\cdot10^8$
12	$(2,1\pm0,1)\cdot10^8$	$(4,4\pm0,2)\cdot10^8$
24	$(1,3\pm0,1)\cdot10^9$	$(1,6\pm0,1)\cdot10^9$
32	$(2,4\pm0,1)\cdot10^9$	$(2,5\pm0,2)\cdot10^9$
48	$(2,3\pm0,10)\cdot10^9$	$(2,7\pm0,2)\cdot10^9$
72	$(1,9\pm0,15)\cdot10^9$	$(1,8\pm0,1)\cdot10^9$

ність, як і в оптимізованому раніше середовищі (50,0 г/л меляси) для монокультури азотобактера [11]. Це може свідчити про стимулювання ростової активності цих двох культур при сумісному культивуванні у зазначених умовах вирощування.

Біотехнологічні процеси одержання препаратів для рослинництва потребують апробації культивування в ферментерах, де масообмін кисню буде більшим, що може впливати на ростові характеристики бактерій. Тому, нами відпрацьовані умови визначення ефективних режимів глибинного культивування монокультур штамів *A. vinelandii* IMB B-7076 та *B. subtilis* IMB B-7023 у лабораторному ферментері «BIOTEC». Бактерії *A. vinelandii* IMB B-7076 вирощували в стерильному середовищі наступного складу (г/л): меляса – 30,0; кукурудзяний екстракт – 5,0; $K_2HPO_4\cdot3H_2O$ – 0,25; KH_2PO_4 – 0,25; $MgSO_4\cdot7H_2O$ – 0,3; NaCI – 0,3; $CaCO_3$ – 3,0; pH – 7,3. Це середовище інокулювали суспензією *A. vinelandii* IMB B-7076, яку отримували протягом 24 годин їх культивування при 28 ^{0}C в 750 мл колбах Ерленмейєра, що містили 100 мл середовища указаного вище складу. Середовище в ферментері інокулювали 25 мл отриманої суспензії. Початкова кількість життєздатних клітин азотобактера в середовищі на початку дослідів становила $1,5\cdot10^7$ кл/мл. Одержані дані представлені в таблиці 2.

Результати досліджень свідчать, що при глибинному культивуванні *A. vinelandii* IMB B-7076 вже після 21 години за даних умов роботи ферментера чисельність життєздатних клітин азотобактера досягала $1,0\cdot10^9$ кл/мл, а після 24 годин їх кількість збільшувалась у 2 рази. У той же час, при вирощуванні культури в періодичних умовах у колбах, такої чисельності клітини азотобактера набували тільки після 24 годин культивування в оптимізованому середовищі з 50,0 г/л меляси та після 32 годин культивування в середовищі з 30,0 г/л меляси (рис. 2). Питома швидкість росту *A. vinelandii* в умовах ферментера складала 0,1 год$^{-1}$, що у 2 рази перевищувало цей показник при вирощуванні азотобактера в оптимізованому середовищі в колбах.

Таким чином, відпрацьовані умови глибинного культивування *A. vinelandii* IMB B-7076 у середовищі з мелясою в лабораторному ферментері. Найбільша кількість клітин азотобактера при даному режимі роботи отримана після 21–24 години культивування бактерій, що дає можливість у подальшому в промислових умовах отримувати за цей час

Таблиця 2

Ріст бактерій *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 в середовищі з мелясою при глибинному культивуванні в ферментері «BIOTEC»

Час росту, год	pH	Оптична густина суспензії (ОГ) розведення 1:10	КУО/мл *A. vinelandii*
0	7,3	0,045	$(1,5\pm0,1)\cdot10^7$
3,0	7,2	0,075	$(1,4\pm0,4)\cdot10^7$
6,0	7,2	0,26	$(1,4\pm0,2)\cdot10^7$
9,0	7,2	0,40	$(4,4\pm0,5)\cdot10^7$
12,0	7,5	0,50	$(1,9\pm0,1)\cdot10^8$
15,0	7,5	0,58	$(4,4\pm0,3)\cdot10^8$
18,0	8,2	0,64	$(6,1\pm0,3)\cdot10^8$
21,0	8,3	0,70	$(1,0\pm0,1)\cdot10^9$
24,0	8,5	0,76	$(2,4\pm0,2)\cdot10^9$

суспензію для виготовлененя бактеріального препарату на основі монокультури азотобактера для рослинництва.

Також відпрацьовані умови ефективного глибинного культивування штаму *B. subtilis* IMB B-7023 у лабораторному ферментері «BIOTEC». Бактерії культивували при 28 ^{0}C, використовуючи для цього стерильне середовище наступного складу (г/л): меляса – 15,0; кукурудзяний екстракт – 2,0; $K_2HPO_4\cdot3H_2O$ – 0,2; KH_2PO_4 – 0,2; $MgSO_4\cdot7H_2O$ – 0,3; NaCl – 0,3; $CaCO_3$ – 3,0; pH=6,8–7,2. Це середовище інокулювали суспензією *B. subtilis* IMB B-7023, яку отримували при вирощуванні протягом 24 годин при 28 ^{0}C у 750 мл колбах Ерленмейєра, що містили 100 мл середовища указаного вище складу. Середовище у ферментері інокулювали 60 мл отриманої суспензії. Початкова кількість життєздатних клітин у середовищі на початку дослідів становила $2,7\cdot10^7$ кл/мл. Одержані дані представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Особливості росту *Bacillus subtilis* IMB B-7023 у середовищі з мелясою при глибинному культивуванні в ферментері «BIOTEC»

Час росту, год	pH	Оптична густина (ОГ), розведення 1:10	КУО/мл
0	6,76	0,025	$(2,7\pm0,3)\cdot10^7$
3,0	5,95	0,07	$(8,7\pm1,4)\cdot10^8$
6,0	6,49	0,17	$(2,2\pm0,1)\cdot10^9$
9,0	7,02	0,18	$(6,2\pm0,7)\cdot10^9$
15,0	7,51	0,24	$(2,1\pm0,1)\cdot10^{10}$
18,0	7,75	0,28	$(5,5\pm0,9)\cdot10^{11}$
21,0	7,87	0,30	$(2,4\pm0,3)\cdot10^{11}$
24,0	7,95	0,31	$(2,3\pm0,3)\cdot10^{11}$

Отримані результати свідчать, що, після 18 годин культивування *B. subtilis* IMB B-7023 у ферментері, чисельність життєздатних клітин досягала $5,5\cdot10^{11}$ кл/мл. Питома швидкість росту бацили на цю годину ста-

новила μ=0,31 год$^{-1}$, що у 5,7 рази більше ніж отримана в оптимізованому середовищі після 24 годин вирощування бактерій у періодичних умовах у колбах. Такої чисельності клітин не спостерігали навіть після 72 годин глибинного культивування в періодичних умовах у колбах Ерленмейєра (рис. 1). При таких параметрах роботи апарата відмічали незначне зниження pH середовища за 4 години – від 6,76 до 6,01. Із збільшенням часу культивування pH середовища підвищувалась і на 18 годину роботи ферментера становила 7,75. Отже, одержані дані свідчать про високу швидкість росту бацил у досліджуваному середовищі, що може бути сприятливим для одержання біопрепарату на основі монокультури *B. subtilis* IMB B-7023 за 18 годин у промислових умовах культивування в ферментері.

У подальшому були проведені випробування технології глибинного культивування змішаної культури *A. vinelandii* IMB B-7076 та *B. subtilis* IMB B-7023 в лабораторному ферментері «BIOTEC». Відпрацювання ефективних режимів глибинного культивування змішаної культури у ферментері проводили, використовуючи для цього оптимізоване стерильне живильне середовище, що містило (г/л): меляса – 30,0; кукурудзяний екстракт – 2,0; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 0,2; KH_2PO_4 – 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3; NaCI – 0,3; $CaCO_3$ – 3,0; pH=6,8–7,2. Кількість життєздатних клітин азотобактера у середовищі на початку дослідів становила $1,5 \cdot 10^7$ кл/мл, а *B. subtilis* – $2,1 \cdot 10^6$ кл/мл.

Показано, що при глибинному культивуванні в ферментері змішаної культури в перші 3 години чисельність бацил в культуральній рідині зростала з $2,1 \cdot 10^6$ КУО/мл до $1,5 \cdot 10^7$ КУО/мл. Після шести годин культивування чисельність *B. subtilis* в культуральній рідині досягала $7,9 \cdot 10^7$ КУО/мл, а *A. vinelandii* – $5,3 \cdot 10^7$ КУО/мл. Подальше культивування цих бактерій супроводжувалось інтенсивним ростом обох штамів (табл. 4). Одержані дані свідчать, що, при глибинному культивуванні *A. vinelandii* IMB B-7076 у змішаній культурі з *B. subtilis* IMB B-7023, вже після 18 годин за досліджених умов роботи ферментера чисельність життєздатних клітин азотобактера зростала до $8,2 \cdot 10^9$ КУО/мл. За цих умов вирощування чисельність *B. subtilis* IMB B-7023 досягала $1,7 \cdot 10^{10}$ КУО/мл (табл. 5). Тобто, при сумісному культивуванні азотобактера та бацили при даних режимах роботи ферментера, бактерії *B. subtilis* IMB B-7023 швидше росли, ніж *A. vinelandii*. Після 21 години вирощування змішаної культури в глибинних умовах обидва штами накопичували майже однакову кількість клітин у середовищі. За таких умов культивування pH середовища варіювало від 6,8 (початкова) до 8,6 (на 21–24 годину) (табл. 4).

Таким чином, відпрацьовані у ферментері умови сумісного культивування *A. vinelandii* IMB B-7076 та *B. subtilis* IMB B-7023 у середовищі з мелясою та кукурудзяним екстрактом дозволили оптимізувати процес отримання найбільшої кількості клітин обох штамів бактерій після 21–24 годин їх культивування. Визначені умови глибинного культивування змішаної культури азотобактера і бацил у ферментері можуть бути рекомендовані для біотехнологічних процесів отримання суспензії з високим вмістом життєздатних клітин обох штамів з метою промислового виготовлення комплексного бактеріального препарату для рослинництва.

Таблиця 4

Динаміка росту змішаної культури *Azotobacter vinelandii* + *Bacillus subtilis* у середовищі з мелясою при глибинному культивуванні в ферментері

Час росту, год	pH	Оптична густина (ОГ) розведення х10	КУО/мл A. vinelandii B. subtilis
0	6,8	0,045	$(1,5\pm0,1)\cdot10^7$ $(2,1\pm0,1)\cdot10^6$
3,0	7,04	0,075	$(9,5\pm0,4)\cdot10^6$ $(1,5\pm0,2)\cdot10^7$
6,0	6,8	0,26	$(5,3\pm0,5)\cdot10^7$ $(7,9\pm0,8)\cdot10^7$
9,0	7,4	0,40	$(7,8\pm0,6)\cdot10^8$ $(7,6\pm0,3)\cdot10^8$
12,0	7,7	0,50	$(1,3\pm0,1)\cdot10^9$ $(4,0\pm0,5)\cdot10^9$
15,0	7,9	0,58	$(1,3\pm0,1)\cdot10^9$ $(1,7\pm0,1)\cdot10^{10}$
18,0	8,03	0,64	$(8,2\pm0,8)\cdot10^9$ $(1,7\pm0,2)\cdot10^{10}$
21,0	8,6	0,70	$(1,1\pm0,2)\cdot10^{10}$ $(8,4\pm0,7)\cdot10^{10}$
24,0	8,6	0,76	$(1,5\pm0,8)\cdot10^{10}$ $(1,1\pm0,1)\cdot10^{11}$

А.А. Рой, А.Г. Кистень, И.Ю. Царенко, И.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

ОСОБЕННОСТИ РОСТА БАКТЕРИЙ *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 И и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 В ЧИСТЫХ И СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРАХ ПРИ ИХ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Р е з ю м е

Исследованы особенности роста *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 в оптимизированных средах в моно- и смешанной культурах при глубинном культивировании для моделирования стадии наращивания биомассы в биотехнологии создания комплексного бактериального препарата для растениеводства. При выращивании *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 в монокультуре удельная скорость роста этих бактерий была выше, чем у *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076. Поэтому при культивировании смешанной культуры питательную среду в ферментере инокулировали суспензиями бактерий *A. vinelandii* + *B. subtilis* в их численном соотношении 10:1. Наибольшее накопление биомассы наблюдали после 24 ч выращивания смешанной культуры. Отработанные условия глубинного культивирования *A. vinelandii* ИМВ В-7076 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 в ферментере могут быть рекомендованы для получения суспензии как монокультур, так и смешанной культуры этих штаммов бактерий с высоким содержанием жизнеспособных клеток в биотех-

нологии промышленного изготовления комплексного бактериального препарата для растениеводства.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076, *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, смешанная культура, глубинное культивирование, особенности роста.

A.A. Roi, A.G. Kisten, I.Yu. Tsarenko, I.K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
54 Academ. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

PECULIAZITIES GROWTH OF BACTERIA *Azotobacter vinelandii* IMV V-7076 AND *Bacillus subtilis* IMV V-7023 IN PURE AND MIXED CULTURES AT SUBMERGED CULTIVATION

S u m m a r y

The features of the growth of *Azotobacter vinelandii* IMV V-7076 and *Bacillus subtilis* IMV V-7023 in optimized environments in single and mixed culture at deep cultivation to simulate the accumulation stage (*capacity*) biomass biotechnology creation of complex bacterial preparation for crop production. When growing *Bacillus subtilis* IMV B-7023 in monoculture specific growth rate of the bacteria was higher than that of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076. Therefore, by cultivating a mixed culture medium in the fermenter was inoculated with the bacterial suspension *A. vinelandii* + *B. subtilis* in a ratio of 10:1. The greatest biomass accumulation was observed after 24 hours of cultivation of mixed cultures. Spent submerged culture *A. vinelandii* IMV B-7076 and *B. subtilis* IMV B-7023 in the fermenter can be recommended for suspension of high-viable cells of both strains in biotechnology industrial manufacturing complex bacterial preparation for crop production.

K e y w o r d s: *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076, *Bacillus subtilis* IMV B-7023, a mixed culture, submerged cultivation, growth characteristics.

1. *Курдиш І.К.* Інтродукція мікроорганізмів у агроекостистеми. К.: Наукова думка, 2010. – 253 с.
2. *Пат.* 72856 України. Штам бактерій *Azotobacter vinelandii* для одержання бактеріального добрива для рослинництва / Курдиш І.К., Бега З.Т. Опубл. 15.08.2006. Бюл. № 8.
3. *Пат.* 54923 України Штам *Bacillus subtilis* ІМВ В – 7023 для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.
4. *Рой А.А., Залоило О.В., Чернова Л.С., Курдиш И.К.* Антагонистическая активность фосфатмобилизирующих бацилл к фитопагенным грибам и бактериям // Агроэкологический журнал. – 2005.– № 1.– С. 50–55.
5. *Курдиш І.К., Рой А.О., Пасічник Л.А.* Ефективність застосування комплексного бактеріального препарату Азогран в овочівництві // Тези доп. Всеукраїнської науково-практичної конференції (29–30 травня 2014 р., Житомир «Екологічний моніторинг, інноваційні та ресурсозберігаючі технології в системі захисту картоплі і овочевих культур від шкідливих організмів». Житомир, 2014. – С. 22–23.
6. *Скороход И.А., Рой А.А., Мелентьев А.И., Курдиш И.К.* Влияние биологически активных веществ фосфатмобилизирующих штаммов рода *Bacillus* на семена растений, подвергнутые оксидативному стрессу // Мікробіологія і біотехнологія

2013, № 2. – С. 41–57.
7. ДСТУ 3696-98 Меляса бурякова. Технічні умови.
8. ТУ У 18.243-95 Екстракт кукурудзяний згущений.
9. *Перт Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. – 330 с.
10. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
11. *Пат.* На корисну модель № 44883, Середовище для культивування азотфіксувальної бактерії *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 для одержання бактеріальних добрив / Царенко І.Ю., Курдиш І.К. Опубл. 26.10.2009 Бюл. № 20.
12. *Царенко И.Ю., Рой А.А., Курдиш И.К.* Оптимизация питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* // Мікробіол. журн., 2011, Т. 73, № 2. – С. 13–19.

Отримано 12.11.2015