

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

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *BACILLUS SUBTILIS* ИМВ В-7023

С помощью метода ортогональных латинских прямоугольников оптимизирована питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. Определены оптимальные концентрации в среде источника углерода (15,0 г/л мелассы), азота (2,0 г/л кукурузного экстракта) и фосфорсодержащих неорганических солей (0,4 г/л). При выращивании данного штамма в периодических условиях при  $t^{\circ} = 28^{\circ} \text{C}$ , значения массопереноса кислорода 0,4 – 0,6 г $\text{O}_2$ /л·ч и исходном содержании  $1 \cdot 10^6$  КОЕ/мл за 24 ч культивирования количество жизнеспособных клеток бацилл достигало  $1,3 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл. Оптимизированную среду можно рекомендовать для культивирования *B. subtilis* ИМВ В-7023 в производственных условиях.

*Ключевые слова:* оптимизация, культивирование, *Bacillus subtilis*, среда для культивирования.

Перспективным направлением экологизации сельского хозяйства является внедрение в практику растениеводства биопрепаратов на основе различных видов микроорганизмов [3, 4, 6, 11, 13]. Одними из наиболее перспективных являются препараты на основе высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis*, которые не только защищают растения от фитопатогенных микроорганизмов, но и улучшают фосфорное питание растений, синтезируют ростостимулирующие вещества [7, 10, 14]. В отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях Института микробиологии и вирусологии НАН Украины на основе штаммов азотфиксирующих *Azotobacter vinelandii* и фосфатмобилизирующих бактерий *B. subtilis* создан препарат комплексного действия для растений – Комплегран. Бактерии, включенные в состав препарата, улучшают азотное и фосфорное питание растений, синтезируют биологически активные соединения, которые положительно влияют на прорастание и всхожесть семян, развитие проростков, защищают от фитопатогенов [8].

Важнейшей стадией в производстве бактериальных препаратов является получение максимума биомассы их компонентов за минимальное время культивирования с достижением максимального экономического эффекта. Таким образом, вопрос оптимизации условий культивирования бактерий является актуальным.

Целью исследований была разработка оптимального состава жидкой питательной среды для культивирования в лабораторных условиях *B. subtilis* ИМВ В-7023 – компонента бактериальных препаратов для растениеводства.

**Материалы и методы.** Объектом исследований был высокоактивный штамм фосфатмобилизирующих бактерий *B. subtilis* ИМВ В-7023, выделенный в отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях и хранящийся в Украинской коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины [14]. На первом этапе исследований для культивирования бацилл использовали четыре варианта среды. Исходной была синтетическая жидкая среда, содержащая (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaCl}$  – 0,3;  $\text{KCl}$  – 0,3;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{CaCO}_3$  – 5,0; глюкозу – 10,0; глицерофосфат кальция – 2,0; дистиллированную воду – 1л; pH – 7,1. Наряду с этой средой использовали общепринятые питательные среды – мясопептонный бульон (МПБ), пептонную среду, а также среду с мелассой. Пептонная среда включала (г/л): пептон – 10,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{NaCl}$  – 3,0; глюкоза – 5,0; дистиллированная вода – 1л; pH 7,2–7,4. Среда с мелассой содержала (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaCl}$  – 0,3;  $\text{CaCO}_3$  – 3,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5; меласса – 20,0; кукурузный экстракт – 1,0; pH 6,8–7,2. Среда, в состав которой входила меласса, готовили на стерильной водопроводной воде.

Культивирование бактерий проводили во флаконах объемом 500 мл на круговых качалках с частотой оборотов 240 об/мин при температуре 30°C. Рабочий объем питательной среды составлял 50 мл, что позволяло обеспечить массоперенос кислорода на уровне 0,4 – 0,6 г  $\text{O}_2$ /л·ч. Посевной материал вносили из расчёта создания начальной численности бактерий в среде

© И.Ю. Царенко, А.А. Рой, И.К. Курдиш, 2011

1,0 – 2,0·10<sup>6</sup> кл/мл. Продолжительность культивирования составляла 24 – 72 ч. В качестве переменных факторов исследовали: мелассу в концентрациях 10,0 – 60,0 г/л; кукурузный экстракт – 0 – 2,0 г/л; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,25 – 0,75 г/л; смесь фосфатов в равных долях K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,25 – 1,0 г/л.

Оптимизацию проводили с помощью метода ортогональных латинских прямоугольников [1]. Критерием оптимизации служила численность жизнеспособных бактерий в культуральной жидкости (КОЕ/мл), количество которых определяли методом серийных разведений с последующим высевом на агаризированую картофельную среду. Концентрацию фосфата в средах определяли методом Фиске-Суббароу [9], глюкозы – фенол-серным методом [12].

Математическую обработку экспериментальных данных проводили путём расчёта эффектов влияния на количество жизнеспособных клеток для всех уровней исследуемых факторов [1]. Эффект влияния различных уровней рассчитывали по разности среднего арифметического значения выхода процесса (число жизнеспособных бактерий, КОЕ/мл) во всех вариантах, где фактор находился на данном уровне и среднего значения для всех серий опытов:

$$\bar{y} = \frac{\sum y_u}{N}; b_{ik} = \frac{\sum y_{yk}}{N} - \bar{y}$$

Где  $\bar{y}$  – среднеарифметическое выхода процесса по всем вариантам опыта;  $\sum y_u$  – сумма выхода процесса по всем вариантам опыта; N – число вариантов;  $b_{ik}$  – эффект каждого уровня;  $ik$  – фактор на  $k$ -уровне;  $\sum y_{yk}$  – сумма всех выходов  $y$  на  $k$ -уровне  $i$ -го фактора.

Результаты обрабатывали статистически [5].

#### Результаты и их обсуждение.

Показано, что при культивировании *B. subtilis* ИМВ В-7023 на изучаемых средах различного состава бактерии проявили неодинаковую ростовую активность. На МПБ и пептонной среде, богатых по содержанию органических соединений, наблюдали наиболее интенсивный рост бацилл (рис. 1). Максимальное содержание клеток в среде после 48 ч культивирования составляло (7,9±1,1)·10<sup>9</sup> и (3,3±0,4)·10<sup>9</sup> КОЕ/мл, соответственно. Однако компоненты данных сред являются дорогостоящими для наработки биомассы клеток в производственных условиях. В тоже время культивирование фосфатмобилизирующего штамма *B. subtilis* ИМВ В-7023 на используемой в лабораторных условиях среде с глюкозой и глицерофосфатом не позволяет достигнуть высокой удельной скорости роста [2]. Максимум численности жизнеспособных бактерий (5,7±0,3)·10<sup>8</sup> КОЕ/мл наблюдали на этой среде после 48 ч культивирования (рис. 1).

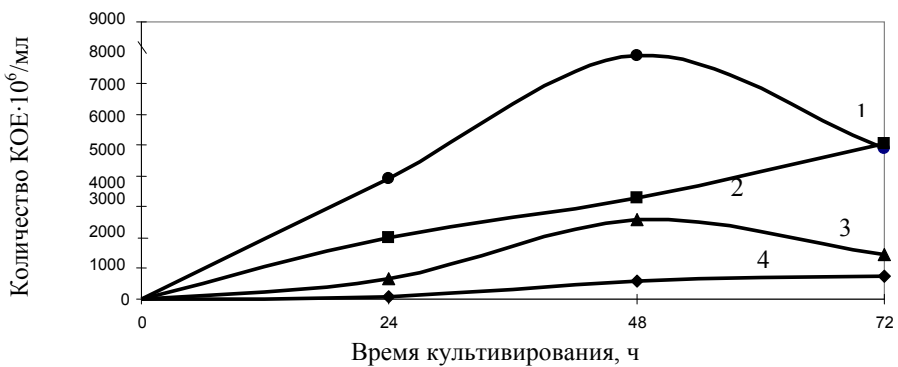


Рис. 1. Рост *B. subtilis* ИМВ В-7023 на разных типах питательных сред.

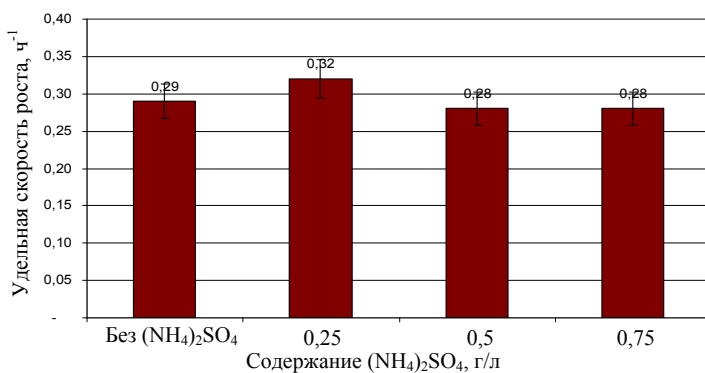
1 – МПБ (удельная скорость роста – 0,32 ч); 2 – пептонная среда (0,29 ч); 3 – среда с мелассой (0,25 ч); 4 – среда с глицерофосфатом (0,15 ч).

Более дешевой для применения в производстве является среда с мелассой, которую бактерии могут использовать в качестве основного источника углерода и энергии. При росте на этой среде в течение 48 ч численность жизнеспособных бацилл составляла

( $2,6 \pm 0,4$ )  $\cdot 10^9$  КОЕ/мл. По показателю численности бактерий за 48 ч выращивания на исследуемых средах можно составить шкалу интенсивности их накопления: МПБ > среда с пептоном > среда с мелассой > среда с глицерофосфатом (рис. 1). Таким образом, показано, что среда с мелассой (как более дешёвая) является приемлемой для дальнейшей оптимизации и использования в производственных условиях.

Исследование ростовой активности бацилл на средах с различным содержанием мелассы (10,0; 20,0; 40,0; 60,0 г/л) проводили в периодических условиях в течение 48 ч. Показано, что наибольшую удельную скорость роста бацилл ( $0,37 \text{ ч}^{-1}$ ) наблюдали после 24 ч выращивания в среде, содержащей 10,0 г/л мелассы. При этом численность клеток бациллы составляла ( $4,3 \pm 0,6$ )  $\cdot 10^9$ , поглощение глюкозы культурой составляло 96,1 %, pH=8,2. Таких показателей не было получено в вариантах сред, содержащих мелассу в концентрациях 20,0; 40,0 и 60,0 г/л. С повышением концентрации мелассы в среде удельная скорость роста бактерий снижалась и составляла соответственно:  $0,29 \text{ ч}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ ч}^{-1}$  и  $0,013 \text{ ч}^{-1}$ , а поглощение глюкозы клетками – 58,8 %; 22,5 % и 2,0 %. Таким образом, с учетом полученных результатов, среда, содержащая 10,0 г/л мелассы, была взята в качестве базовой для дальнейших исследований.

Определяли также оптимальные концентрации источников азотного и фосфорного питания на 4-х уровнях концентраций для каждого из компонентов. Сравнительные данные, полученные при выращивании бактерий на базовой среде с различными концентрациями  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (как источника азотного питания), свидетельствуют о том, что наибольшая удельная скорость роста ( $0,32 \text{ ч}^{-1}$ ) и количество жизнеспособных клеток ( $6,6 \pm 0,8$ )  $\cdot 10^9$  кл/мл после 24 ч культивирования наблюдали в среде, содержащей 0,25 г/л  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (рис. 2).



**Рис 2. Удельная скорость роста *B. subtilis* ИМБ В-7023 на средах с разным содержанием  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .**

При изменении в составе базовой среды, содержащей 0,25 г/л  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , концентрации неорганических фосфатов ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ) от 0,25 г/л до 1,0 г/л с шагом 0,25 г/л, установлено, что наибольшая удельная скорость роста бактерий составляла  $0,33 \text{ ч}^{-1}$  после 24 ч культивирования при содержании в среде 0,5 г/л и 0,75 г/л фосфорнокислых солей (табл. 1).

Таким образом, после первого этапа оптимизации питательной среды для выращивания *B. subtilis* ИМБ В-7023 в периодических условиях культивирования была отобрана среда следующего состава (г/л): меласса – 10,0; кукурузный экстракт – 1,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,25;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,25;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,25;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3; NaCl – 0,3;  $\text{CaCO}_3$  – 3,0; pH – 6,8 – 7,2.

На втором этапе оптимизацию среды для культивирования бациллы проводили при помощи многофакторного эксперимента с дальнейшей математической обработкой полученных данных методом ортогональных латинских прямоугольников. Матрицу планирования составляли по схеме  $3i3k$ , которая позволяла изучить в условиях одного эксперимента взаимное влияние на рост культуры трёх факторов на трёх уровнях. За основу была выбрана среда после первого этапа оптимизации. Так как в данной среде источниками азота для бактерий были меласса, кукурузный экстракт и  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , то существовала потенциальная возможность упрощения её состава путём исключения одного из азотсодержащих компонентов. Меласса и кукурузный экстракт, будучи сложными органическими субстратами непостоянного

состава, являются источниками питательных веществ и ростовых факторов. Исключение из состава среды  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , с одной стороны, привело бы к её удешевлению, а с другой – дало бы возможность проводить подготовку среды без отдельной стерилизации углерод- и азот-содержащих компонентов. Недостаток по азоту в такой среде можно было бы компенсировать увеличением концентрации кукурузного экстракта. Таким образом, для второго этапа оптимизации использовали среду следующего состава (г/л): меласса – 10,0; кукурузный экстракт – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,25;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,25;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaCl}$  – 0,3;  $\text{CaCO}_3$  – 3,0; pH – 6,8 – 7,2.

**Таблица 1**

**Влияние различных концентраций  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  в среде с мелассой (20,0 г/л) на рост *B. subtilis* ИМВ В-7023**

Время культивирования, ч	pH	Численность бактерий, кл/мл	Удельная скорость роста, $\mu, \text{ч}^{-1}$	Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация $\text{PO}_4^{3-}$ , мг/л
без добавления $\text{KH}_2\text{PO}_4$ и $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$					
0	7,1	$(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^6$		15,1 $\pm$ 0,2	415,5 $\pm$ 7,1
24	6,0	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^9$	0,29	1,1 $\pm$ 0,1	82,0 $\pm$ 2,8
0,25 г/л $\text{KH}_2\text{PO}_4$ и $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$					
0	7,1	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^6$		15,1 $\pm$ 0,2	550,0 $\pm$ 14,1
24	6,0	$(2,6 \pm 0,3) \cdot 10^9$	0,3	0,6 $\pm$ 0,1	155,0 $\pm$ 8,4
0,5 г/л $\text{KH}_2\text{PO}_4$ и $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$					
0	7,8	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^6$		15,1 $\pm$ 0,2	693,0 $\pm$ 14,1
24	6,8	$(5,7 \pm 0,2) \cdot 10^9$	0,33	0,4 $\pm$ 0,1	69,0 $\pm$ 4,2
0,75 г/л $\text{KH}_2\text{PO}_4$ и $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$					
0	7,2	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^6$		15,1 $\pm$ 0,2	832,0 $\pm$ 42,4
24	6,1	$(5,9 \pm 0,3) \cdot 10^9$	0,33	0,95 $\pm$ 0,1	85,0 $\pm$ 4,7
1,0 г/л $\text{KH}_2\text{PO}_4$ и $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$					
0	7,2	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^6$		15,1 $\pm$ 0,2	971,0 $\pm$ 14,1
24	6,8	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^9$	0,28	0,95 $\pm$ 0,1	120,0 $\pm$ 3,3

В качестве факторов оптимизации использовали источники углерода (меласса), азота (кукурузный экстракт и меласса) и фосфора (смесь солей  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , взятых в равных массовых долях).

В эксперименте задавали следующие уровни исследуемых факторов:

меласса : 10,0; 15,0; 20,0 г/л (шаг – 5,0 г/л);

кукурузный экстракт: 1,0; 2,0; 3,0 г/л (шаг – 1,0 г/л);

фосфаты (1:1) ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 0,5; 0,6; 0,7 г/л (шаг – 0,1 г/л).

**Таблица 2**

**Численность клеток *B. subtilis* ИМВ В-7023 в вариантах многофакторного эксперимента по оптимизации питательной среды\***

Варианты эксперимента	Концентрация факторов оптимизации, г/л			Численность клеток, кл/мл
	Меласса	Кукурузный экстракт	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (1:1)	
1	10	1	0,5	1,89 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>
2	15	1	0,6	2,31 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>
3	20	1	0,7	1,30 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>
4	10	2	0,6	1,71 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>
5	15	2	0,7	1,57 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>
6	20	2	0,5	1,98 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>
7	10	3	0,7	1,81 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>
8	15	3	0,5	1,95 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>
9	20	3	0,6	1,46 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>

Примечание: \* – первый этап многофакторных экспериментов по оптимизации среды.

В работе руководствовались матрицей планирования, представленной в табл. 2. В результате полученных данных были вычислены эффекты влияния всех факторов на их уровнях

(табл. 3). Выяснено, что максимальный эффект для мелассы был получен при её концентрации 15,0 г/л. Максимальные эффекты по влиянию кукурузного экстракта и фосфорнокислых солей соответствовали минимальным значениям их концентраций. Поэтому матрица планирования по этим компонентам для следующих экспериментов опыта была смещена на 1 шаг в сторону уменьшения их концентрации. Схема постановки и результаты второй серии опыта представлены в табл. 4. Эффекты влияния изученных факторов представлены в табл. 5.

**Таблица 3**

**Эффекты первого этапа многофакторного эксперимента по оптимизации питательной среды для *B. subtilis* ИМВ В-7023**

Факторы оптимизации	Концентрация, г/л	Эффект
Меласса	10,0	0,24
	15,0	0,24
	20,0	-0,12
Кукурузный экстракт	1,0	0,13
	2,0	0,05
	3,0	0,04
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1:1)	0,5	0,24
	0,6	0,13
	0,7	-0,14

Данные табл. 4 свидетельствуют, что максимальные эффекты концентраций фосфорсодержащих солей в среде приходились на среднее значение их концентрации в опыте – 0,4 г/л. Следовательно, именно эта концентрация фосфорсодержащих солей в среде являлась оптимальной для роста *B. subtilis* ИМВ В-7023. Максимум эффектов влияния кукурузного экстракта находился в области его концентрации в среде – 2,0 г/л. Полученные данные можно считать оптимальными для роста культуры.

**Таблица 4**

**Численность *B. subtilis* ИМВ В-7023 в вариантах многофакторного эксперимента по оптимизации питательной среды\***

Варианты эксперимента	Концентрация факторов оптимизации, г/л		Численность клеток, кл/мл
	Кукурузный экстракт	(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	
1	0	0,3	6,5·10 <sup>9</sup>
2	1	0,3	1,0·10 <sup>9</sup>
3	2	0,3	8,2·10 <sup>9</sup>
4	0	0,4	8,0·10 <sup>9</sup>
5	1	0,4	1,8·10 <sup>10</sup>
6	2	0,4	2,8·10 <sup>10</sup>
7	0	0,5	8,6·10 <sup>9</sup>
8	1	0,5	1,03·10 <sup>10</sup>
9	2	0,5	1,3·10 <sup>10</sup>

Примечание: \* – второй этап многофакторного эксперимента по оптимизации питательной среды.\*

**Таблица 5**

**Эффекты второго этапа многофакторного эксперимента по оптимизации питательной среды для *B. subtilis* ИМВ В-7023**

Факторы оптимизации	Концентрация, г/л	Значения
Кукурузный экстракт	0,0	-2,72
	1,0	-0,64
	2,0	5,9
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1:1)	0,5	-5,17
	0,6	7,5
	0,7	0,2

Таким образом, были установлены концентрации исследуемых факторов, отвечающие максимальным эффектам, которые находились в среднем диапазоне таблицы эффектов. Эти концентрации компонентов питательной среды соответствовали наиболее оптимальному ее составу для культивирования *B. subtilis* ИМВ В-7023. После второго этапа оптимизации состав среды для выращивания бациллы несколько отличался от предыдущего.

Состав оптимизированной питательной среды после второго этапа оптимизации (г/л):

меласса – 15,0  
 кукурузный экстракт – 2,0  
 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 0,2  
 $KH_2PO_4$  – 0,2  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,3  
 NaCl – 0,3  
 $CaCO_3$  – 3,0  
 pH – 6,8 – 7,2.

Оптимизированная среда вышеприведенного состава предназначена для выращивания *B. subtilis* ИМВ В-7023 в лабораторных условиях и даёт возможность получить за 24 ч культивирования высокий выход жизнеспособных клеток (табл. 6). При этом нет необходимости в отдельной стерилизации азотсодержащих и углеводсодержащих ее компонентов из-за отсутствия в составе минеральных источников азота. Предложенный состав среды значительно дешевле лабораторных сред, которые широко используются для культивирования микроорганизмов этого вида, и может быть рекомендован для использования как в лабораторных, так и в производственных условиях.

Таблица 6

Рост *B. subtilis* ИМВ В-7023 на питательных средах после оптимизации

Варианты питательной среды	Количество клеток, % после выращивания в течение, ч		Удельная скорость роста после 24 ч культивирования	
	12	24	μ, ч <sup>-1</sup>	% от исходного
Исходная (базовая)	100,0	100,0	0,298	100,0
После первого этапа оптимизации	236,0	252,0	0,34	114,9
Оптимизированная среда	400,6	492,0	0,37	124,0

**І.Ю. Царенко, А.О. Рой, І.К. Курдиш**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ*

## ОПТИМІЗАЦІЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *BACILLUS SUBTILIS* ИМВ В-7023

### Резюме

За допомогою методу ортогональних латинських прямокутників оптимізовано живильне середовище для культивування *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. Визначені оптимальні концентрації в середовищі джерел вуглецю (15,0 г/л меласи), азоту (2,0 г/л кукурудзяного екстракту) та фосфоровмісних неорганічних солей (0,4 г/л). При вирощуванні даного штаму в періодичних умовах при  $t^0=28^{\circ}C$ , значенні масопереносу кисню 0,4-0,6 гO<sub>2</sub>/л·год. та вихідним вмістом  $1 \cdot 10^6$  КОЕ/мл за 24 год культивування кількість життєздатних клітин бацил сягала  $1,3 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл. Оптимізоване середовище можна рекомендувати для культивування *B. subtilis* ИМВ В-7023 у виробничих умовах.

К л ю ч о в і с л о в а : оптимізація, культивування, *Bacillus subtilis*, середовище для культивування.

**OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION  
OF *BACILLUS SUBTILIS* IMV V-7023**

**S u m m a r y**

Nutrient medium for cultivation of *Bacillus subtilis* IMV V-7023 was optimized by the method of the orthogonal Latin rectangles. Optimum concentrations were investigated in the medium of carbon source (15.0 g/l of molasses), nitrogen (2.0 g/l of corn extract) and content of phosphorus-containing inorganic salts (0.4 g/l). When growing this strain in periodic conditions at 28 °C, the value of oxygen mass transport in the liquid (0.4–0.6 gO<sub>2</sub>/l per 1 h) and the initial number of cells of each bacterial species was 1·10<sup>6</sup> cells/ml. The numbers of bacteria reached the maximum after 24 hours of cultivation and corresponded to 1.3·10<sup>10</sup> cells/ml. Nutrient medium that was optimized can be recommended for cultivation of *B.subtilis* IMV V-7023 in production conditions.

The paper is presented in Russian.

**К е y w o r d s:** optimization, cultivation, *Bacillus subtilis*, nutrient medium.

**T h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** *Tsarenko I.Yu.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. – М.: Наука, 1985. – 296 с.
2. Булавенко Л.В., Курдиш И.К. Фосфатазная активность *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. // Микробиол. журн. – 2005. – 67.- № 4. – С. 21–27.
3. Грязнева Т.Н. Разработка глубинного способа культивирования бацилл – компонентов пробиотика Биод-5. // Биотехнология. – 2004. – № 5, С. 67–68.
4. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. – К.; КВЦ. – 2001. – 142 с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1968. – 284 с.
6. Полянская Л.М., Ведена О.Т., Лысак Л.В., Звягнецев Д.Т. Стимуляция роста растений культурами *Bejerinkia* и *Clostridium* // Микробиология – 2002. – 71, №1 – С. 123–129.
7. Рой А.А., Рева О.Н., Смирнов В.В., Курдиш И.К. Биологические свойства фосфатмобилизирующего штамма *Vacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – 40. № 5. – С. 551–557.
8. Рой А.А., Залозло О.В., Чернова Л.С., Курдиш И.К. Антагонистическая активность фосфатмобилизирующих бацилл к фитопатогенным грибам и бактериям //Агрэкологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 50–55.
9. Унифицированные методы анализа вод / Ред. Ю.Ю.Лурье. – М.: Химия, 1971. – 207 с.
10. Церковняк Л.С., Курдиш И.К. *Vacillus subtilis* ИМВ В-7023 – перспективный продуцент БАВ для растениеводства // Міжнародна наукова конференція «Мікробні біотехнології»: Тези доповідей. 11 – 15. 09. 2006 р. Одеса: Астропринт, 2006. – С.104.
11. Berg G., Krechel A., Dirt M. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. – 51, N 2. – P. 215–299.
12. Dubois M., Gilles K., Hamilton J. Colorimetric method for deformation of sugar and related substances // Anal. Chem. – 1956. – 28, N 3. – P. 350–356.
13. Whipps J.M. Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. – 2001. – 52. – P. 487–51.
14. Деклараційний Патент України. 2003. МПК С 05F 11/08 С 12N 1/20 Штам бактерій *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального добрива для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О., Україна. Заявл. 22.05.2002. Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.

Отримано 6.05.2010