

ВЛИЯНИЕ ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *BACILLUS* *THURINGIENSIS*

Е. Н. АРЗУМАНОВ

Исследовано влияние pO_2 на экспоненциальный рост и спорообразование *Bacillus thuringiensis*.

Установлено, что снижение уровня pO_2 до 15 мм рт. ст. практически не изменяет среднюю удельную скорость потребления кислорода и максимальный титр вегетативных клеток в фазе экспоненциального роста, в то время как при дальнейшем снижении его резко увеличивается выделение уксусной кислоты в среду, снижается средняя удельная скорость потребления кислорода и, как следствие, уменьшается максимальный титр вегетативных клеток.

В фазе замедления роста и спорообразования уменьшение pO_2 до 15 мм рт. ст. не влияет на спорообразование и образование кристаллоподобных токсинов.

Определен критический уровень pO_2 для всего процесса культивирования *Bac. thuringiensis*, составляющий не более 15 мм рт. ст.

Ключевые слова: *Bac. thuringiensis*, инсектицидная активность.

Снабжение микроорганизмов кислородом в аэробных процессах является важнейшей задачей при разработке управляемого биосинтеза, так как уровень парциального давления растворенного кислорода (pO_2) в среде влияет как на скорость роста, так и на метаболизм микроорганизмов [5]. Кислород мало растворим в водных средах и естественно, что при высоких скоростях потребления его микроорганизмами может стать лимитирующим субстратом, вызывая тем самым изменения в биосинтетических процессах [4].

Шеррер с сотр. обнаружил изменение размеров и удельной активности инсектицидных кристаллов в зависимости от степени аэрации при культивировании *Bac. thuringiensis* [7]. Однако данный вывод сделан качественно, так как в работе не содержится сведений об уровнях растворенного в культуральной жидкости (кж) кислорода.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния парциального давления растворенного кислорода на титр спор и значения инсектицидной активности кж в процессах культивирования *Bac. thuringiensis*.

Материал и методика. Использован штамм 69—6 *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*, который культивировали на питательной среде, содержащей кукурузный экстракт и техническую глюкозу. В качестве посевного материала использовали 72-часовой илюклят спор, выращенный на агаризованной среде.

Работа проводилась на лабораторных установках типа АК—10—1, оснащенных дополнительно датчиками и централизованным щитом контроля и регулирования следующих физических и физико-химических параметров процесса культивирования: давление в аппарате, скорость вращения мешалки, расход воздуха на аэрацию, температура, pO_2 , pH, а также концентрации O_2 и CO_2 в отходящих газах [1].

pO_2 в кж контролировали с помощью полярографического датчика кислорода собственной конструкции [2].

Методы определения углеводов, аминного азота, концентрации уксусной кислоты, титра микроорганизмов и состояния культуры описаны ранее [3].

Летальную концентрацию кж /ЛК₅₀/ определяли в конце процесса на личинках восковой моли *Galleria mellonella* L., выращенных на искусственном корме с применением системы пробитов согласно ТУ 59—61—74.

За инсектицидную активность (ИА) принимали 1/ЛК₅₀ (1%).

Питательные среды готовились с постоянными концентрациями общих углеводов, 1200 мг%, и аминного азота, 15 мг%, температура ферментации поддерживалась 30±0,2°, объем кж составлял 5 л.

В данной серии экспериментов в фазе экспоненциального роста, а также замедления роста и спорообразования, pO_2 стабилизировали на планируемых уровнях автоматически путем изменения расхода воздуха /2—20 л/мин/ и скорости вращения мешалки /200—800 об/мин/.

В связи с тем, что в лаг-фазе создание уровня pO_2 ниже 155 мм рт. ст. затруднено из-за отсутствия потребления кислорода микроорганизмами, стабилизировали минимальные значения расхода воздуха /2 л/мин/ и скорости вращения мешалки /200 об/мин/.

Были рассмотрены следующие параметры процесса культивирования: Y_1 —инсектицидная активность кж (1%), Y_2 —титр спор, млрд. ед./мл; Y_3 —максимальный титр вегетативных клеток, млрд. ед./мл; Y_4 —экономический коэффициент по глюкозе, потребленной до образования максимального титра вегетативных клеток, $\frac{\text{млрд. ед.}}{\text{мл мг \%}}$;

Y_5 —средняя удельная скорость потребления кислорода в фазе экспоненциального роста, $\frac{\text{л мл}}{\text{час млрд. ед.}}$; Y_6 —максимальная концентрация уксусной кислоты в кж в фазе экспоненциального роста, мг%;

Y_7 —процент лизиса клеток в фазе спорообразования, %; Y_8 —удельная инсектицидная активность кж, $\frac{\text{мл}}{\% \text{ млрд. ед.}}$.

Результаты и обсуждение. Как видно из таблицы, уменьшение pO_2 до 15 мм рт. ст. в фазе экспоненциального роста практически не влияло на среднюю удельную скорость потребления кислорода и максимальный титр вегетативных клеток. Изменялся лишь экономический коэффициент по глюкозе, потребленной до максимального титра вегетативных клеток за счет увеличения скорости потребления углеводов. В резуль-

Т а б л и ц а
Динамика параметров процесса культивирования при различных значениях pO_2 в среде

Фаза экспоненциального роста					Фаза замедления роста и спорообразования				
pO_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	pO_2	Y_7	Y_8	Y_1	Y_2
120	2,4	0,055	1,62	52	<15	33,4	0,125	0,2	1,6
75	2,3	0,0046	1,58	61	15	4,4	0,59	1,3	2,2
15	2,3	0,0027	1,53	68	75	0	0,63	1,45	2,3
<15	1,4	0,0015	0,43	135	120	0	0,23	0,32	1,4
15	2,2	0,0029	1,51	60	15	0	0,61	1,35	2,2

тате, если при pO_2 , равном 120 мм рт. ст. в конце процесса, в кж оставалось около 700 мг% углеводов, которые можно использовать повторно при приготовлении питательной среды, то при pO_2 , менее 15 мм рт. ст., остаток углеводов в кж сводился к нулю. Таким образом, снижение уровня pO_2 приводило к экономически менее выгодному использованию углеводов микроорганизмами.

При значении pO_2 ниже 15 мм рт. ст. в фазе экспоненциального роста снижалась средняя удельная скорость потребления кислорода и увеличивалось выделение микроорганизмами уксусной кислоты в среду. Это указывает на преобладание в условиях недостатка кислорода анаэробного метаболизма, который не в состоянии обеспечить энергией делящиеся клетки, следствием чего является падение максимального титра вегетативных клеток. При глубокой лимитации по растворенному кислороду, в результате увеличения выделения уксусной кислоты в среду и, соответственно, понижения рН до значений ниже 5, прекращается рост микроорганизмов, или, как говорят, процесс «закисает».

Значение pO_2 , равное 15 мм рт. ст., является наименьшим, при котором сохраняются средняя удельная скорость потребления кислорода и максимальный титр вегетативных клеток. Следовательно, это значение pO_2 в фазе экспоненциального роста является критическим.

Уменьшение экономического коэффициента по глюкозе при понижении pO_2 до критического уровня, вероятно, является специфическим свойством *Bac. thuringiensis*, для объяснения которого необходимы дополнительные исследования.

Фаза замедления роста и спорообразования характеризуется при культивировании *Bac. thuringiensis* продолжением активного функционирования цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), через глиоксилатный шунт которого утилизируется уксусная кислота [6]. В этих фазах в результате вторичного метаболизма в клетках синтезируется кристаллоподобный токсин. При pO_2 ниже 15 мм рт. ст. уксусная кислота слабо потребляется микроорганизмами, вследствие чего рН практически не повышается. При этом затягивается спорообразование, что приводит к понижению титра спор по отношению к максимальному титру вегетативных клеток. Ухудшаются также и условия синтеза кристаллоподобных токсинов, о чем свидетельствует понижение удельной инсектицидной активности кж. Повышение уровня pO_2 выше 15 мм рт. ст. в фазе замедления роста и спорообразования не сказывается на значении инсектицидной активности.

Из изложенного следует, что значение pO_2 , равное 15 мм рт. ст. и более, в фазе замедления роста и спорообразования обеспечивает благоприятные условия для протекания процессов спорообразования и синтеза кристаллоподобных токсинов.

Значение pO_2 , ниже критического, в фазе экспоненциального роста приводит к снижению максимального титра вегетативных клеток и в дальнейшем титра спор, что отрицательно сказывается на величине инсектицидной активности кж. В этом случае, несмотря на нормальные

условия по pO_2 в период вторичного метаболизма, удельная инсектицидная активность кж уменьшается. Вероятно, ослабленные из-за недостатка кислорода в этой фазе, клетки частично теряют способность синтезировать кристаллоподобные токсины в последующих фазах.

Таким образом, критическое значение парциального давления растворенного кислорода для всего процесса культивирования составляет не более 15 мм рт. ст. Данный критический уровень pO_2 обеспечивает нормальное протекание первичного и вторичного метаболизма и, как следствие, наибольшие в исследуемой области значения титра спор и инсектицидной активности кж. Контрольный опыт подтвердил достоверность данного вывода.

Институт микробиологии АН Армянской ССР.
Всесоюзный научно-исследовательский и проектный институт «Промавтоматика»

Поступило 11.XI 1980 г.

ԼՈՒՄՎԱՄ ԹԹՎԱՆՆԻ ՊԱՐՑԻԱԿ ՆՆՇՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
BACILLUS THURINGIENSIS-Ի ԿՈՒՆՏԻԿԱՑՄԱՆ ՎՐԱ

Ե. Ն. ԱՐԶՈՒՄԱՆՈՎ

Ուսումնասիրվել է pO_2 ազդեցությունը *Bac. thuringiensis*-ի աճի, սպոր և բյուսեղառաջացման վրա: Որոշված է, որ pO_2 -ի կրիտիկական մակարդակը *Bac. thuringiensis*-ի կուլտիվացման ողջ պրոցեսի համար պետք է լինի pO_2 սնդիկի սյան 15 մմ-ից ոչ ավելին:

INFLUENCE OF PARTIAL PRESSURE OF DISSOLVED
OXYGEN ON THE CULTIVATION
OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

E. N. ARZUMANOV

The influence of pO_2 on the growth, spore and crystal formation of *Bac. thuringiensis* has been investigated. The critical level of pO_2 for all processes of cultivation has been determined to be no more than 15 mm of mercury.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арзуманов Е. Н., Насиров М. К., Бабамян А. В., Опришко А. А., Кантере В. М. В сб. Биотехнология и биоинженерия, 3, 10, Рига 1978.
2. Арзуманов Е. Н., Педобержан В. Е., Опришко А. А., Бабамян А. В., Кантере В. М. Авт. свид. СССР № 640199, Бюлл. изобретений, 48, 1978.
3. Арзуманов Е. Н. Микробиология, 1, 65, 1979.
4. Перт С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. 105, М., 1978.
5. Brooks R. Process Biochemistry, 4, 27, 1969.
6. Hanson R. S., Srinivason V. R., a. Halvorson H. O. J. Bacteriol., 86, 45, 1963.
7. Scherrer P., Lüthy P., Trumpl B. Appl. microbiology, 27, 614, 1973.