

УДК 57.082.5

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РИЗОБАКТЕРИЙ, ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ ФЛОКУЛЯНТОМ ГИПАН

¹Хужаназарова М.К., ²Муродова С.С.

¹Ташкентский государственный аграрный университет, Ташкент;

²Джизакский филиал национального университета Узбекистана имени Мирзо Улугбека,
Джизак, e-mail: murodova@-74mail.ru

Биопрепарат «Замин-М» разработан на основе штаммов *Pseudomonas stutzeri* СКБ 308, *Bacillus megaterium* СКБ 310, *Bacillus subtilis* СКБ 309, и в данной статье рассмотрены вопросы его иммобилизации с органическим носителем Гипан. Гипан представляет собой гидролизующий полиакрилонитрил, который хорошо растворяется в воде. Обычно используют раствор 9-12% в воде. Цвет варьируется от светло-желтого до темно-коричневого. Плотность при t -200 °С колебалась от 1,06 до 1,07 г/см³, pH 8-9. Не замерзает до 5-10 °С. Для иммобилизации ризобактерий, входящих в состав биопрепарата «Замин-М», исследованы концентрации полиакрилонитрила Гипана, способствующие снижению биомассы в надосадочной культуральной жидкости 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 и 0,5%. При использовании для ассоциации микроорганизмов «Замин-М» концентрация флокулянта по отношению к культуральной жидкости – 0,1%, а продолжительность периода седиментации составила 90 минут, что привело к осаждению 90% биомассы. Достигнуто соотношение, стабильность и жизнеспособность микроорганизмов в осаждаемой биомассе. Высокомолекулярный реагент Гипан в данном случае имеет 3 положительные функции: первая – эффективный флокулянт, вторая – удобное и недорогое средство защиты от микроорганизмов при хранении, поддерживающее практически неизменный титр и жизнеспособность, а главное – антагонистическая активность в отношении фитопатогенов и роста и развития растений приводит к сохранению ускоряющего свойства.

Ключевые слова: Гипан, надосадочная жидкость, биопрепарат Замин-М, ризобактерии, флокулянт, иммобилизация, носитель, каолин

TECHNOLOGY OF OBTAINING BIOPREPARATIONS ON THE BASIS OF RHIZOBACTERIA, IMMOBILIZED IN GIPAN

¹Khuzhanazarova M.K., ²Murodova S.S.

¹Tashkent State Agrarian University, Tashkent;

²Jizzakh branch of the National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Jizzakh, e-mail: murodova@-74mail.ru

The biopreparation Zamin-M was developed on the basis of *Pseudomonas stutzeri* SKB 308, *Bacillus megaterium* SKB 310, *Bacillus subtilis* SKB 309 strains, and this article discusses the issues of its immobilization with the organic carrier Gipan. Gipan is a hydrolysable polyacrylonitrile that is highly soluble in water. Usually a solution of 9-12% in water is used. The color varies from light yellow to dark brown. Density at t -200C ranged from 1.06 to 1.07 g/cm³, pH 8-9. Does not freeze up to 5-10 C0. For the immobilization of rhizobacteria, which are part of the biopreparation "Zamin-M", the concentrations of polyacrylonitrile Gipan were studied, which contribute to a decrease in biomass in the supernatant culture liquid of 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% and 0.5%. When used for the association of microorganisms "Zamin-M", the concentration of the flocculant in relation to the culture fluid was 0.1%, and the duration of the sedimentation period was 90 minutes, which led to the precipitation of 90% of the biomass. Achieved ratio, stability and viability of microorganisms in the deposited biomass. The high molecular weight reagent Gipan in this case has 3 positive functions: the first is an effective flocculant, the second is a convenient and inexpensive means of protecting against microorganisms during storage, maintaining a practically unchanged titer and viability, and most importantly, antagonistic activity against phytopathogens. and the growth and development of plants leads to the preservation of the accelerating properties.

Keywords: Gipan, supernatant, biopreparation Zamin-M, rhizobacteria, flocculant, immobilization, carrier, kaolin

Одним из наиболее актуальных вопросов при производстве биопрепаратов на основе микроорганизмов является концентрирование биомассы, осаждаемой флокулянтами. Исследования по осаждению с использованием флокулянтов при производстве биопрепаратов в Узбекистане практически не проводились. Поэтому разработка технологических параметров осаждения биомассы флокулянтами при получении сухих препаративных форм, поиск соотношения концентрированного биопрепарата с флокулянтом, изучение влияния новой

препаративной формы фитостимулирующих свойств на всхожесть семян, определение антагонистической активности против грибов-фитопатогенов и урожайности растений является актуальным вопросом.

На практике широко применяют различные препаративные формы при использовании микроорганизмов, в том числе жидкие культуры, гелевые субстратные носители (бактериальные экзополисахариды, силикагель, высокодисперсные материалы) и твердые носители (вермикулит, лигнит, перламутр, торф и др.). Микроорганизмы,

составляющие основу биопрепаратов, должны отвечать ряду требований и обладать определенными характеристиками, такими как вирулентная активность, эффективность, конкурентоспособность, технологичность (способность набирать определенный титр в стандартных и производственных условиях). Основными требованиями к биопрепаратам являются: высокий титр активных клеток, необходимый срок хранения, транспортабельность, технологичность (растворимость, хранение в семенах и др.), колонизация в почве или на поверхности растения, а также их дешевизна [1-4].

Состав биоинокулянта на твердой или жидкой основе включает добавление средств защиты клеток, таких как глицерин, лактоза, крахмал, хороший материал-носитель, надлежащую упаковку и наилучшие способы доставки.

Недавние разработки рецептур основываются на микроинкапсуляции, наноиммобилизации микробных биоинокулянтов и биоудобрений на основе биопленки и других пленкообразующих соединений [5-7].

Для приготовления инокулята используют средства защиты клеток, такие как глицерин, лактоза, крахмал, а также хороший материал-носитель, надлежащая упаковка и наилучшие способы транспортировки. Для жидкофазной ферментации использует сепарацию, осаждение, флотацию, вакуум-конденсацию или мембранные технологии [1-3].

В случае приготовления жидких и сухих биопрепаратов увлажняющий порошок получают различными способами путем сушки концентрата, полученного из культуральной жидкости, постепенно до получения концентрированной формы и стандартизируют пасту до эталона в виде консервированного готового продукта. В случае получения готового продукта используются эмульгирующие пасты, dustы, гранулы, таблетки и микрокапсулы, которые изготавливаются на основе полимеров, широко используемых в медицине и в фармацевтике. В состав всех видов биопрепаратов входят вещества, обеспечивающие определенные физико-химические свойства, такие как вязкость, влагосодержание, устойчивость к начальной активности и УФ-лучам, продолжительность воздействия и др. [4; 5].

А также в последние годы широко применяется иммобилизация штаммов-продуцентов в носителях различного состава. В таких методах гранулированные и порошкообразные биопрепараты получают путем внедрения или иммобилизации на твердых природных сорбентах. Торфяная форма

ряда препаратов, служащих для повышения плодородия почвы, уже несколько лет используется в сельскохозяйственной практике (Экстрасол, Ризоторфин, Агрофил и др.). Технология их получения значительно проще, не требует больших затрат, питательная среда позволяет микроорганизмам активно размножаться длительное время, не теряя жизнеспособности [1-3].

Иммобилизацию ризобактерий проводят инстилляцией альгинатно-крахмального раствора с примесью ризобактерий в раствор кальция, и этот процесс анализируют, исходя из стадии роста бактерий, природы осмопротекторов и раствора кальция. Максимальное восстановление клеток наблюдалось при выращивании *Raoultella* в среде, наполненной глюконатом кальция в качестве агента терригена. Также было отмечено, что высушенный препарат, содержащий *Azospirillum brasilense*, сохранял жизнеспособность для 76% клеток в течение года. Выживаемость ризобактерий при биоинкапсулировании можно улучшить, добавляя к препарату крахмал, изменяя фазу роста клеток и применяя органическое соединение тегалозу в питательной среде [1-4].

Цель исследования: разработать технологию получения биопрепарата на основе ризобактерий, иммобилизованных в органический полимер Гипан.

Материалы и методы исследования

В качестве материала исследования использовали штаммы *Pseudomonas stutzeri* СКБ 308, *Bacillus megaterium* СКБ 310, *Bacillus subtilis* СКБ 309, выделенные в наших предыдущих исследованиях, входящие в состав биопрепарата «Замин-М». На основе ассоциации этих штаммов получен авторский патент Агентства интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (АПИАП 05254. 16.01.2014).

Для флокуляции ризобактерий использовали флокулянт Гипан. Он представляет собой частично гидролизуемый полиакрилонитрил, который хорошо растворяется в воде. Обычно используют раствор 9-12% в воде. Цвет варьируется от светло-желтого до темно-коричневого. Плотность при t -200 °C колебалась от 1,06 до 1,07 г/см³, рН 8-9. Не замерзает при - 5-10 °C [8]. Гидрогель использовали для иммобилизации в составе биопрепарата.

Гидрогель представляет собой синтетический полимер, стойкий к воздействию воды. Он обладает способностью поглощать большое количество воды и при необходимости выделять проглоченную воду во внешнюю среду.

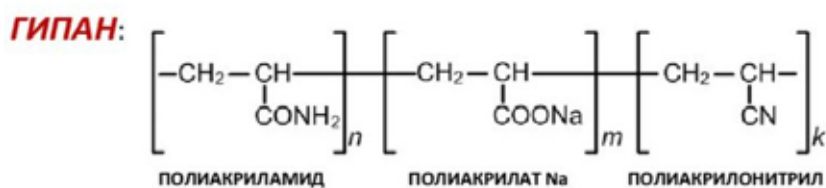


Рис. 1. Гипан

Флокулянт Гипан (рис. 1) любезно предоставлен старшим научным сотрудником Ташкентского научно-исследовательского химико-технологического института Общества с ограниченной ответственностью д.т.н. PhD Шириновым Шавкатом Давлетовичом.

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что процесс концентрирования биомассы микроорганизмов с помощью флокулянтов осуществляют в технологическом процессе ферментации бактерий после стадии роста ферментов в культуральной жидкости.

Существует три основных метода концентрирования биомассы: вакуумное выпаривание, микрофльтрация культуральной жидкости и осаждение биомассы из культуральной жидкости с использованием флокулянтов. В каждом из рассмотренных методов есть специфичная себестоимость препарата, которая делится на капитальные и эксплуатационные затраты, затраты на приобретение сырья, которое рассчитывается для промышленного производственного процесса.

Установлено, что одним из этих способов является отделение биомассы путем

седиментации как один из наименее затратных способов [1]. Поэтому в данном исследовании были проведены исследования по использованию флокулянта Гипан, имитирующего условия засоления, подходящие для условий Узбекистана, для осаждения и концентрирования биомассы при производстве биопрепаратов на основе ризобактерий.

Начальные этапы исследования концентрации биомассы микроорганизмов основывались на использовании полиакрилонитрила – Гипан для флокуляции культур штаммов ризобактерий биопрепарата «Замин-М», растущих при pH-8, в следующих соотношениях: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 и 0,5%.

Преимуществом данного полимера является то, что его полимеризация происходит при pH 7-8, что связано с тем, что штаммы ризобактерий биопрепарата «Замин-М», адаптированные к условиям солевого стресса, соответствуют условиям развития в щелочной среде. Еще одним преимуществом полимера является то, что он не замерзает при температуре -5-10 °С, что позволяет клеткам сохраняться живыми длительное время. На следующем рисунке представлены сведения о влиянии Гипана на седиментацию бактериальных клеток (рис. 2).

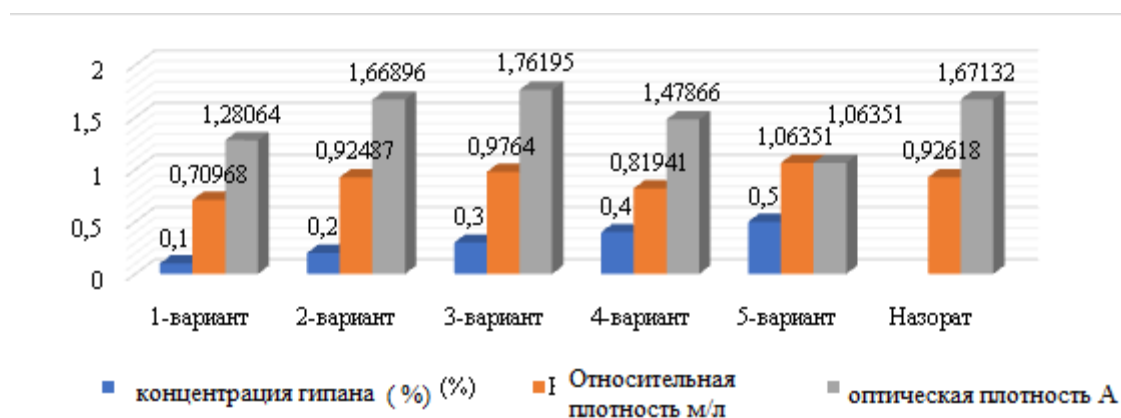


Рис. 2. Влияние Гипана на седиментацию бактериальных клеток

Как видно из рисунка 2, плотность надосадочной жидкости клеток, преципитированных с концентрацией Гипана 0,1%, составила 0,070968 мг/л, с концентрацией Гипана 0,2% 0,092487, 0,3% 0,97640, 0,4% 0,81941, 0,5% до 1,06351 мг/л. Концентрация Гипана 0,1% явилась причиной осветления осадочной жидкости, остальная биомасса осаждалась с трудом, увеличение концентрации Гипана приводило к загущению полимера с биомассой.

Контроль оптической плотности осветленной культуральной жидкости определяли относительно отцентрифугированного надосадочного раствора. Экспериментальные результаты показывают, что седиментация биомассы существенно различается при разных значениях концентрации реагента Гипан. Это связано с увеличением вязкости культуральной жидкости, что не привело к отложению образовавшихся флокулов, или может быть связано с зарядами или морфологическими свойствами клеток микроорганизма, или составом, физико-химическими свойствами культуры, жидкости.

Так, при использовании процесса флокуляции для ассоциации микроорганизмов «Замин-М» оптимальная концентрация флокулянта по отношению к культуральной жидкости составила – 0,1%, а продолжительность периода седиментации 90 минут, которая привела к осаждению 90% биомассы. Оптимальное соотношение

флокулянта привело к стабильности и жизнеспособности микроорганизмов в осаждаемой биомассе.

Кроме того, для иммобилизации осажденной биомассы микроорганизмов биопрепарата «Замин-М» использован гидрогель с концентрацией 0,01, 0,06, 0,1, 0,5% (рис. 3). Исследования по отношению количества клеток, осажденных гипановым полимером, показали, что жизнеспособность клеток была самой высокой при концентрации 0,1%. Флокулянт Гипан разбавляли 2–7 объемами воды для введения в КЖ. Затем смесь КЖ и флокулянта перемешивали в течение 2 минут, чтобы компоненты раствора полностью перемешались и кусочки собрались вместе. Седиментацию проводили при комнатной температуре и рН 9,0 культуральной жидкости (рис. 3).

Контроль оптической плотности осветления культуральной жидкости определяли относительно центрифугированного супернатанта.

Как видно из рисунка 3, оптимальной концентрацией иммобилизанта оказался вносимый гидрогель в количестве 0,06% по отношению к культуральной жидкости до осаждения 90% КЖ.

Время осаждения биомассы составляла 90 минут. В этом опыте титр микроорганизмов в осадке составил 3×10^8 -КОЕ, его содержание в надосадочной жидкости не превышало 0,96592-мг/л (рис. 4).

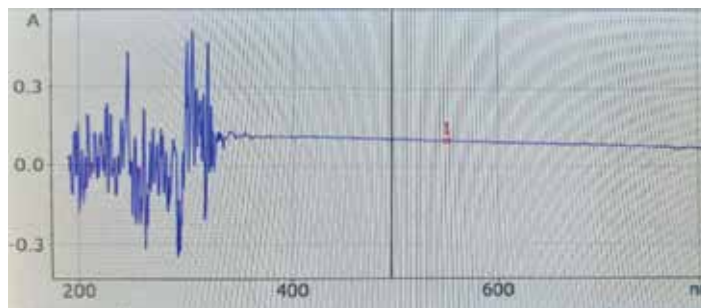


Рис. 3. Результаты спектрофотометрического анализа осадения биомассы микроорганизмов, составляющих биопрепарат «Замин-М», путем иммобилизации в гидрогель

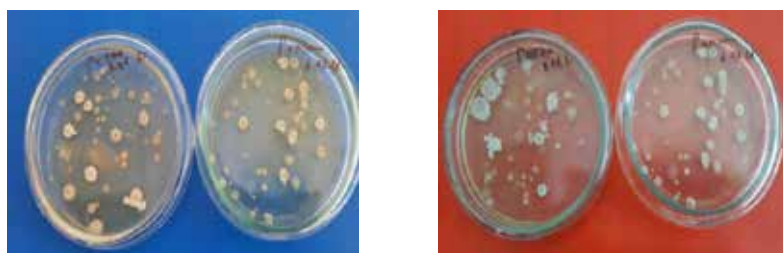


Рис. 4. Колония клеток биопрепарата «Замин-М» осаждается Гипановым флокулянтom. Общий вид колоний, осажденных А-0,1% Гипаном и В-0,2% Гипаном

Срок хранения сухой формы биопрепарата «Замин-М» в каолиновой смеси Гипан

Соотношение каолин:биомасса	Концентрация при длительном хранении			
	Исходная концентрация	3 мес.	6 мес.	1 год
	Концентрация клеток			
Контроль	$2,48 \times 10^5$	$2,08 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
100:1	3×10^5	$2,7 \times 10^6$	2×10^6	2×10^7
100:2	3×10^6	$2,9 \times 10^6$	2×10^6	2×10^8
100:3	$3,33 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$	$2,9 \times 10^8$
100:4	$3,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$
100:5	$3,81 \times 10^6$	$3,6 \times 10^7$	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$

Результаты эксперимента по осаждению биомассы при различных значениях концентрации реагента Гипан значительно различаются. Это связано с увеличением вязкости культуральной жидкости, что не вызвало отложения образовавшихся флокулов, или это могло быть обусловлено зарядом или морфологическими свойствами клеток, или их составом, физико-химическими свойствами культуральной жидкости.

Следующие исследования основывались на изучении процесса иммобилизации ризобактерий в твердый носитель, являющийся основой биопрепарата «Замин-М» (таблица). Массу препарата, состоящую из иммобилизованных клеток в виде сухого порошка, смешивали с каолином в соотношении 100:1; 100:2; 100:3; 100:4 и 100:5, после того сушили в сушилке.

Как видно из таблицы, был выбран каолин в качестве наполнителя в соотношении 100:5, при котором концентрация клеток составила $3,6 \times 10^7$ через 3 месяца, $3,0 \times 10^9$ через 6 месяцев и $3,0 \times 10^9$ через 1 год. Вышеуказанный способ консервации зарекомендовал себя как эффективное средство обеспечения сохранности специфических свойств микроорганизмов благодаря удобству и дешевизне. Поэтому оптимальным вариантом считалось соотношение 100: 5 при производстве сухого биопрепарата «Замин-М».

Выводы

Высокомолекулярный реагент Гипан для флокуляции биомассы имеет 3 положительные функции: первая – эффективный флокулянт, вторая – удобное и недорогое средство защиты от микроорганизмов при хранении, поддерживающее практически неизменный титр и жизнеспособность, а главное, сохраняется антагонистическая активность в отношении фитопатогенов,

а также увеличение роста и развития растений, что приводит к сохранению урожая. По результатам эксперимента подобрано соотношение каолин:биомасса – 100:5.

Увеличение биомассы не оказывает существенного влияния на количество микроорганизмов в сухой форме препарата, но экономически неэффективно. На основе экспериментальных данных был разработан опытный образец сухого биопрепарата «Замин-М».

Список литературы

1. Муродова С.С. Создание новых конкурентоспособных микробных препаратов на основе местных штаммов ризобактерий повышающих устойчивость хлопчатника к стрессовым условиям и оценка их практического значения. дис. ... докт. биол. наук. Ташкент, 2018. 190 с.
2. Riddech N., Phibunwatthanawong T., Sarin P. Suitable formulation of microbial inoculants as a bio-fertilizer for promoting growth of hairy-leafed apitong (*Dipterocarpus alatus*). *Waste Biomass. Valor.* 2021. DOI: 10.1007/s12649-021-01526-7.
3. Войнова О.Н., Калачёва Г.С., Гродницкая И.Д., Волова Т.Г. Микробные полимеры в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45 (№ 4). С.427–431.
4. Kamanina O.A., Saverina E.A., Rybochkin P.V., Arlyapov V.A., Vereshchagin A.N., Ananikov V.P. Preparation of Hybrid Sol-Gel Materials Based on Living Cells of Microorganisms and Their Application in Nanotechnology. *Nanomaterials.* 2022. V. 12. P. 1086. DOI: 10.3390/nano12071086.
5. Campos D.C., Acevedo F., Morales E., Aravena J., Amiard V., Jorquera M.A., Inostroza N.G., Rubilar M. Microencapsulation by spray drying of nitrogen fixing bacteria associated with lupin nodules. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 30. P. 2371–2378. DOI: 10.1007/s11274-014-1662-8.
6. Schoebitz M., López M.D., Roldán A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development.* 2013. V. 33(4). P. 751-765. DOI: 10.1007/s13593-013-0142-0.
7. Schoebitz M., Simonin H., Poncelet D. Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizomes.bacteria in dried alginate beads. *J. Microcapsule.* 2012. V. 29. P. 532-538.
8. Джалилов А.Т., Ширинов Ш.Д., Нурметов Т.Ш., Хамидов А.А., Мавлонов Б.А. Метод получения полимерного гидрогеля // Патент №IAP 04582. 26.09.2012.