

ПОВЫШЕНИЕ БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММА *BACILLUS THURINGIENSIS* ПУТЕМ УЛУЧШЕНИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Калмыкова Г.В., Чешкова А.Ф., Акулова Н.И.

Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук
р.п. Краснообск, Россия

Для цитирования: Калмыкова Г.В., Чешкова А.Ф., Акулова Н.И. Повышение бактериоциноподобной активности штамма *Bacillus thuringiensis* путем улучшения состава питательной среды // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2020. Т. 50. № 2. С. 47–56. DOI: 10.26898/0370-8799-2020-2-6.

For citation: Kalmykova G.V., Cheshkova A.F., Akulova N.I. Povyshenie bakteriotsinopodobnoi aktivnosti shtamma *Bacillus Thuringiensis* putem uluchsheniya sostava pitatel'noi sredy [Increase of bacteriocin-like activity of *Bacillus Thuringiensis* strain by improving nutriceulture medium composition] *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki* [Siberian Herald of Agricultural Science], 2020, vol. 50, no. 2, pp. 47–56. DOI: 10.26898/0370-8799-2020-2-6.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Представлена разработка состава питательной среды и оптимальные концентрации входящих в ее состав компонентов для повышения бактериоциноподобной активности штамма *Bacillus thuringiensis* ssp. *dakota*. Для оптимизации базовой питательной среды с целью максимального повышения активности целевого продукта проведены исследования при помощи многофакторного эксперимента с дальнейшей статистической обработкой данных. В качестве факторов оптимизации использовали источники азота (пептон и дрожжевой экстракт) и углерода (глицерин и глюкоза). Контрольной средой выращивания была среда «А», традиционно используемая для культивирования бактерий рода *Bacillus*. Степень влияния изучаемых факторов на резульативный признак определяли с помощью модели множественной линейной регрессии первого порядка, оптимальные соотношения компонентов рассчитывали на основе квадратичной модели. Выявлена способность штамма *Bacillus thuringiensis* ssp. *dakota* продуцировать бактериоциноподобное вещество (BLIS). Установлена зависимость синтеза BLIS от среды культивирования: на безуглеродной среде антимикробная активность BLIS в 1,5 раза ниже активности на среде, содержащей глюкозу и глицерин. Для получения максимальной активности BLIS среду с углеводами оптимизировали с помощью многофакторного эксперимента, выполненного методом ортогональных латинских прямоугольников. Построены математические мо-

INCREASE OF BACTERIOCIN- LIKE ACTIVITY OF *BACILLUS* *THURINGIENSIS* STRAIN BY IMPROVING NUTRICULTURE MEDIUM COMPOSITION

Kalmykova G.V., Cheshkova A.F.,
Akulova N.I.

Siberian Federal Scientific Centre of Agro-
BioTechnologies of the Russian Academy of
Sciences
Krasnoobsk, Russia

The development of the nutriceulture medium composition and the optimal concentrations of its constituent components to increase the bacteriocin-like activity of the strain *Bacillus thuringiensis* ssp. *Dakota* are presented. The study was carried out using a multifactor experiment with further processing of statistical data in order to optimize the basic nutriceulture medium and maximize the activity of the target product. Sources of nitrogen (peptone and yeast extract) and carbon (glycerin and glucose) were used as optimization factors. The control growth medium was medium "A", traditionally used for the cultivation of bacteria of the genus *Bacillus*. The degree of impact of the studied factors on the effective feature was determined using the model of multiple linear regression of the first order, whereby the optimal ratio of the components was calculated on the basis of the quadratic model. The ability of the *Bacillus thuringiensis* ssp. *dakota* strain to produce a bacteriocin-like substance (BLIS) was revealed. The dependence of BLIS synthesis on the cultivation medium was established: on the carbohydrate-free medium, the antimicrobial activity of BLIS was 1.5 times lower than that on the medium containing glucose and glycerin. To obtain maximum BLIS activity, the carbohydrate medium was optimized using a multifactor experiment performed by the method of orthogonal Latin rectangles. Mathematical models of linear regression of the first and second order were constructed depending on the concentration of nutrient medium com-

дели линейной регрессии первого и второго порядка в зависимости от концентрации компонентов питательных сред. Оптимальную концентрацию компонентов определяли на основе регрессионной модели второго порядка, учитывающей эффекты взаимодействия факторов и нелинейность процесса. В результате оптимизации питательной среды определен количественный состав компонентов среды культивирования: пептон – 9 г/л; дрожжевой экстракт – 2,6; глицерин – 5,6 г/л, на которой антимикробная активность BLIS повысилась на 60% по сравнению с активностью на исходной среде. Показано, что синтез BLIS, в отличие от синтеза дельта-эндотоксина, не регулируется катаболитной регрессией углерода.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, бактериоцины, BLIS, среда культивирования, оптимизация

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во всем мире расширяется применение ростостимулирующих ризобактерий (PGPR), оказывающих благотворное влияние на рост и развитие растений и снижающих использование химических удобрений и пестицидов [1]. Среди наиболее часто упоминаемых PGPR преобладают штаммы рода *Bacillus* [2].

Энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*), часто встречающиеся в почве, повсеместно применяют для контроля численности насекомых благодаря синтезу параспоровых дельта-эндотоксинов [3]. Некоторые штаммы *B. thuringiensis* продуцируют такие метаболиты, как фитогормоны, фосфатсолибилизирующие ферменты, которые способствуют росту растений в условиях абиотического стресса [4].

В 2009 г. Lee с соавт. впервые показали, что бактериоцин, продуцируемый *B. thuringiensis*, напрямую увеличивал рост растений [5]. Было сделано предположение о создании коммерческого препарата на основе штаммов *B. thuringiensis* для стимуляции роста различных растений [6].

The optimal concentration of the components was determined on the basis of a second-order regression model that takes into account the effects of the interaction of factors and the nonlinearity of the process. As a result of optimization of the nutrient medium, the quantitative composition of the components of the culture medium was determined: peptone – 9 g/l; yeast extract – 2.6; glycerol – 5.6 g/l, on which the antimicrobial activity of BLIS increased by 60% compared with the activity on the initial medium. It was shown that the synthesis of BLIS, unlike the synthesis of delta-endotoxin, is not regulated by catabolite repression of carbon.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, bacteriocins, BLIS, nutriculture medium, optimization

При скрининге свыше 70 штаммов *B. thuringiensis* мы определили, что штамм *B. thuringiensis* ssp. *dakota* продуцировал бактериоциноподобные вещества (BLIS). Частично очищенный BLIS этого штамма проявлял антимикробную активность в отношении широкого спектра близкородственных культур, был термоустойчив и стабилен в широком диапазоне pH¹. Инокуляция семян сои и ярового рапса культуральной жидкостью этого штамма привела к повышению биологической урожайности сои на 38%, ярового рапса – на 85%².

Принимая во внимание растущий интерес к промышленному производству бактериоцинов и бактериоциноподобным веществам, наше исследование было сфокусировано на разработке оптимальных условий культивирования штамма *B. thuringiensis* ssp. *dakota*, при которых наиболее полно реализуется их генетически обусловленная способность синтезировать практически ценные вещества. Однако если вопросу оптимизации условий культивирования для повышения продукции дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* уделяется большое внимание [7, 8], то ис-

¹Калмыкова Г.В., Чекрыга Г.П., Бурцева Л.И. Новые функции *Bacillus thuringiensis* // Инновации в агропромышленном комплексе: материалы междунар. науч.-практ. форума (Новосибирск, 3–4 июня 2009 г.). Новосибирск, 2009. С. 207–211.

²Калмыкова Г.В., Акулова Н.И., Данилов В.П. Полевая оценка штаммов *Bacillus* для улучшения роста и повышения урожайности кормовых культур // Современное состояние, традиции и инновационные технологии в развитии АПК: материалы междунар. науч.-практ. конф. (Уфа, 12–14 марта 2019 г.). Уфа, 2019. С. 106–111.

следований по синтезу бактериоцинов значительно меньше. В основном они касаются изучению влияния источников углерода и C/N соотношения в питательной среде, а также физических параметров (рН, температура, аэрация) на продукцию бактериоцинов *B. thuringiensis* [9, 10].

Подбор оптимальных условий биотехнологических процессов традиционно основывается на проведении большого количества экспериментов. Оценить влияние многочисленных факторов, от которых зависит выход целевого продукта, и определить их оптимальный уровень помогают математические методы планирования экспериментов, которые значительно снижают количество проводимых опытов. Их применение позволяет оптимизировать питательные среды для повышения синтеза различных метаболитов во многих ферментационных процессах [9].

Цель работы – разработать состав питательной среды и определить оптимальные концентрации входящих в ее состав компонентов для повышения бактериоциноподобной активности штамма *B. thuringiensis* ssp. *dakota* с помощью статистических методов планирования эксперимента и анализа данных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Штамм *B. thuringiensis* ssp. *dakota* В-947 получен из коллекции культур микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирск). Антимикробную активность образцов BLIS оценивали по их действию на грамположительную культуру *Micrococcus lysodeikticus* VKM В-1314 [11].

Бактериальную культуру *B. thuringiensis* ssp. *dakota* В-947 поддерживали на агаризованной среде «А» (пептон 7 г/л, NaCl 5 г/л, агар 12 г/л) при температуре 4 °С. Инокулят готовили в виде суспензии посевом нескольких отдельных колоний с агаризованной среды в 3 мл среды «А» и выращивали в течение 18 ч при 28 °С. Для отработки состава питательных сред 0,5 мл инокулята засеивали в качалочные колбы Эрленмейера объемом 250 мл, содержащие 50 мл питательной

среды, и культивировали при температуре 28 °С в течение 24 ч на орбитальном шейкере «BioSan» ES-20/60 при 200 об./мин. Исходный состав базовой среды включал пептон 12 г/л, дрожжевой экстракт 12, глицерин 4 г/л. Фосфаты и микроэлементы в базовую среду вносили отдельно. Контрольной средой выращивания была среда «А», традиционно используемая для культивирования бактерий рода *Bacillus* [12].

Критерием оптимизации служила антибактериальная активность BLIS, определяемая методом лунок. Препараты частично очищенного BLIS получали согласно Paik с соавт. [13], 100 мкл приготовленного образца вносили в лунки на свежеприготовленный газон тест-культуры *M. lysodeikticus* VKM В-1314. Чашки Петри оставляли при комнатной температуре для диффузии образцов частично очищенного BLIS в агар, а затем инкубировали при 37 ± 1 °С в течение 24 ч. Антибактериальную активность учитывали по образованию зоны ингибирования роста вокруг лунки. За одну единицу активности (*U*) принимали 1 мм² зоны ингибирования роста индикаторного штамма. Активность BLIS рассчитывали по формуле $U = \pi d^2/4$ и выражали в условных единицах (у. ед.) [14].

Для оптимизации базовой питательной среды с целью максимального повышения активности целевого продукта проведены исследования при помощи многофакторного эксперимента с дальнейшей статистической обработкой данных. В качестве факторов оптимизации использовали источники азота (пептон и дрожжевой экстракт) и углерода (глицерин и глюкоза). Планирование эксперимента проводили согласно схеме ортогональных латинских прямоугольников. Степень влияния изучаемых факторов на результативный признак определяли с помощью модели множественной линейной регрессии первого порядка, оптимальные соотношения компонентов рассчитывали на основе квадратичной модели [15].

Статистические расчеты выполняли в программной среде R 3.4.1³ [16].

³R Development Core Team. R. A language and environment for statistical computing. / R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2014. Адрес доступа: <http://www.R-project.org/>

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что наиболее важные компоненты питательных сред – источники азота и углерода, но потребности микроорганизмов в питательных веществах определяются особенностями их метаболизма. Для споруляции и синтеза дельта-эндотоксина штаммами *B. thuringiensis* стандартно применяют среду «А», в состав которой входит пептон и хлорид натрия, без добавления источников углерода [7], так как имеется ряд сообщений, что глюкоза ингибирует рост бактерий, подавляя споруляцию и кристаллообразование катаболитной репрессией [16, 17]. Однако синтез бактериоцинов не регулируется глюкозной катаболитной репрессией [9], поэтому источники углерода являются важными компонентами питательных сред для накопления бактериоцинов или BLIS.

На начальном этапе поиска оптимальной рецептуры питательной среды для повышения активности BLIS выбран исходный фон базовой среды, который предположительно благоприятен для накопления данного целевого продукта, синтезируемого штаммом *B. thuringiensis* ssp. *dakota* B-947. В состав исходного фона в качестве источника углерода входил глицерин, азота – пептон и дрожжевой экстракт. Последний рассматривается как подходящий источник не только органического азота, но аминокислот и витаминов. Сравнение образцов BLIS, полученных при культивировании на среде «А» и базовой среде, подтвердило данные о необходимости источников углерода для их синтеза. Антимикробная активность образца BLIS на среде «А» была приблизительно в 1,5 раза ниже активности образца, полу-

ченного на базовой среде (201 *U* и 314 *U* соответственно).

Для оптимизации состава базовой питательной среды проводили многофакторный эксперимент по схеме ортогональных латинских прямоугольников 4×3 . Данная схема опыта позволила сократить общее количество вариантов опыта, необходимых для построения регрессионных моделей, и получить оценки эффектов компонентов среды первого и второго порядка. Пептон, дрожжевой экстракт, глицерин и глюкозу изучали при трех уровнях концентрации (см. табл. 1).

В результате разработано 18 вариантов сред, для каждой среды опыты проведены в трехкратной повторности (см. табл. 2).

Эффект влияния различных уровней факторов на значение оптимизируемого показателя определяли по формуле

$$E_{ij} = \bar{U}_{ij} - \bar{U}, \quad (1)$$

где E_{ij} – эффект j -го уровня для i -го фактора, $\bar{U}_{ij}$ – среднее значение результирующей величины по тем вариантам опыта, в которых i -й фактор был на j -м уровне, $\bar{U}$ – общее среднее результирующей величины по всем вариантам.

Расчеты показали, что максимальные эффекты по влиянию пептона, дрожжевого экстракта, глицерина и глюкозы соответствовали максимальным значениям их концентраций (см. табл. 3). В таких случаях обычно проводят следующий этап оптимизации со смещением шага концентраций в сторону увеличения. Ранее мы проверили среду, в которых концентрация пептона составляла 12 г/л, дрожжевого экстракта – 7,5 и глицерина – 8 г/л, что соответствовало

Табл. 1. Компоненты среды и их концентрации (г/л) на трех уровнях

Table 1. Medium components and their respective concentration (g/l) at three levels

Компонент среды	Фактор	Уровень, г/л			Единица варьирования
		–1	0	+1	
Пептон	X_1	3,0	6,0	9,0	3,0
Дрожжевой экстракт	X_2	0	2,5	5,0	2,5
Глицерин	X_3	2,0	4,0	6,0	2,0
Глюкоза	X_4	0	1,0	2,0	1,0

Табл. 2. Схема планирования эксперимента и результаты исследования антибактериальной активности образцов BLIS

Table 2. Experiment planning matrix and antibacterial activity of BLIS samples

Номер		Значение факторов				Антибактериальная активность образцов BLIS, U		
опыта	блока	X_1	X_2	X_3	X_4	Фактическая, $U \pm$ статистическая ошибка	Расчетная, $\check{U}_1$	Расчетная, $\check{U}_2$
1	1	6,0	2,5	2,0	0	380 ± 10	364	368
2	1	6,0	0	2,0	1,0	380 ± 20	369	368
3	1	6,0	0	6,0	1,0	380 ± 0	458	446
4	1	9,0	2,5	6,0	2,0	491 ± 11	466	463
5	1	9,0	5,0	4,0	2,0	491 ± 0	448	449
6	1	9,0	0	4,0	0	415 ± 21	417	438
7	1	3,0	2,5	2,0	0	346 ± 0	339	340
8	1	3,0	5,0	6,0	1,0	452 ± 11	433	417
9	1	3,0	0	4,0	2,0	415 ± 10	378	381
10	2	6,0	5,0	6,0	0	471 ± 11	453	446
11	2	6,0	0	6,0	2,0	415 ± 0	441	435
12	2	6,0	2,5	4,0	1,0	491 ± 0	408	476
13	2	9,0	5,0	4,0	0	415 ± 0	438	449
14	2	9,0	0	2,0	2,0	346 ± 0	387	331
15	2	9,0	2,5	2,0	1,0	380 ± 0	393	397
16	2	3,0	5,0	6,0	0	415 ± 10	428	417
17	2	3,0	0	4,0	1,0	346 ± 10	373	381
18	2	3,0	2,5	2,0	2,0	314 ± 9	349	340

Табл. 3. Эффект влияния компонентов питательной среды на антибактериальную активность

Table 3. Effects of different medium components on antibacterial activity

Компонент среды	Концентрация, г/л	Антибактериальная активность*, U	Эффект
Пептон	3,0	382	-26
	6,0	419	11
	9,0	423	15
Дрожжевой экстракт	0	405	-3
	2,5	382	-26
	5,0	437	29
Глицерин	2,0	358	-50
	4,0	429	21
	6,0	437	29
Глюкоза	0	407	0
	1,0	405	-3
	2,0	412	4
Среднее по всем опытам		408	

* Среднее значение трех повторностей.

смещению шага концентраций вверх, и не обнаружили повышения активности (неопубликованные данные). Вероятно, оптимальные значения концентраций этих компонентов находятся в пределах определенных нами границ.

Для оценки значимости влияния изучаемых факторов на результативный признак построена модель множественной линейной регрессии вида

$$U_1 = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4, \quad (2)$$

где U_1 – расчетное значение результативного признака, b_0 – константа, b_i – коэффициенты регрессии, X_i – факторы.

По результатам регрессионного анализа (см. табл. 4) получена следующая линейная функция зависимости антибактериальной активности образцов BLIS от компонентов среды:

$$\check{U}_1 = 265,13 + 8,16 \cdot X_1 + 4,18 \cdot X_2 + 19,64 \cdot X_3 + 4,76 \cdot X_4. \quad (3)$$

Табл. 4. Результаты регрессионного анализа для линейной модели первого порядка оценки влияния компонентов среды на антибактериальную активность образцов BLIS**Table 4.** Regression analysis for the first-order linear model of assessing the influence of medium components on the antibacterial activity of BLIS samples

Компонент	Переменные	Коэффициент	Статистическая ошибка	<i>t</i> – значение	<i>p</i>
Константа	b_0	265,13	22,69	11,68	< 0,001***
Пептон	b_1	8,16	2,27	3,60	< 0,01***
Дрожжевой экстракт	b_2	4,18	3,09	1,35	0,18
Глицерин	b_3	19,64	3,52	5,59	< 0,001***
Глюкоза	b_4	4,76	7,49	0,64	0,53

Примечание. Коэффициент детерминации $R^2 = 0,50$.

*** Значимо на уровне 99%.

Регрессионный анализ показал, что влияние пептона и глицерина на антибактериальную активность образцов BLIS значимо на уровне 99%, в то время как влияние дрожжевого экстракта и глюкозы несущественно. Поскольку для глюкозы также получен несущественный средний эффект, то этот фактор исключен из дальнейшего рассмотрения. Коэффициент детерминации ($R^2 = 0,50$), измеряющий долю общей дисперсии результативного признака, объясненную регрессионной моделью, указывает на низкое качество линейной модели, в которой не учитываются эффекты взаимодействия факторов и нелинейность процесса.

Для более точного описания зависимости антибактериальной активности от ком-

понентов среды построена полиномиальная модель регрессии второго порядка вида:

$$U_2 = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3, \quad (4)$$

где U_2 – расчетное значение результативного признака, b_0 – константа, b_i , b_{ij} – коэффициенты регрессии, X_i – факторы.

Данную модель оптимизировали методами шагового регрессионного анализа по критерию Акайке для исключения избыточных предикторов [19]. По результатам регрессионного анализа получена следующая квадратичная функция зависимости антибактериальной активности от компонентов питательной среды (см. табл. 5):

Табл. 5. Результаты регрессионного анализа для оптимизированной квадратичной модели оценки влияния компонентов среды на антибактериальную активность образцов BLIS**Table 5.** Regression analysis for the second-order optimized model of assessing the influence of medium components on the antibacterial activity of BLIS samples

Переменные	Коэффициент	Статистическая ошибка	<i>t</i> – значение	<i>p</i>
b_0	56,33	49,00	1,15	0,26
b_1	9,44	1,98	4,76	< 0,01***
b_2	50,70	12,60	4,02	< 0,01***
b_3	115,23	22,53	5,12	< 0,01***
b_{22}	-9,70	2,59	-3,75	< 0,01***
b_{33}	-10,27	2,63	-3,90	< 0,01***

Примечание. Коэффициент детерминации $R^2 = 0,66$.

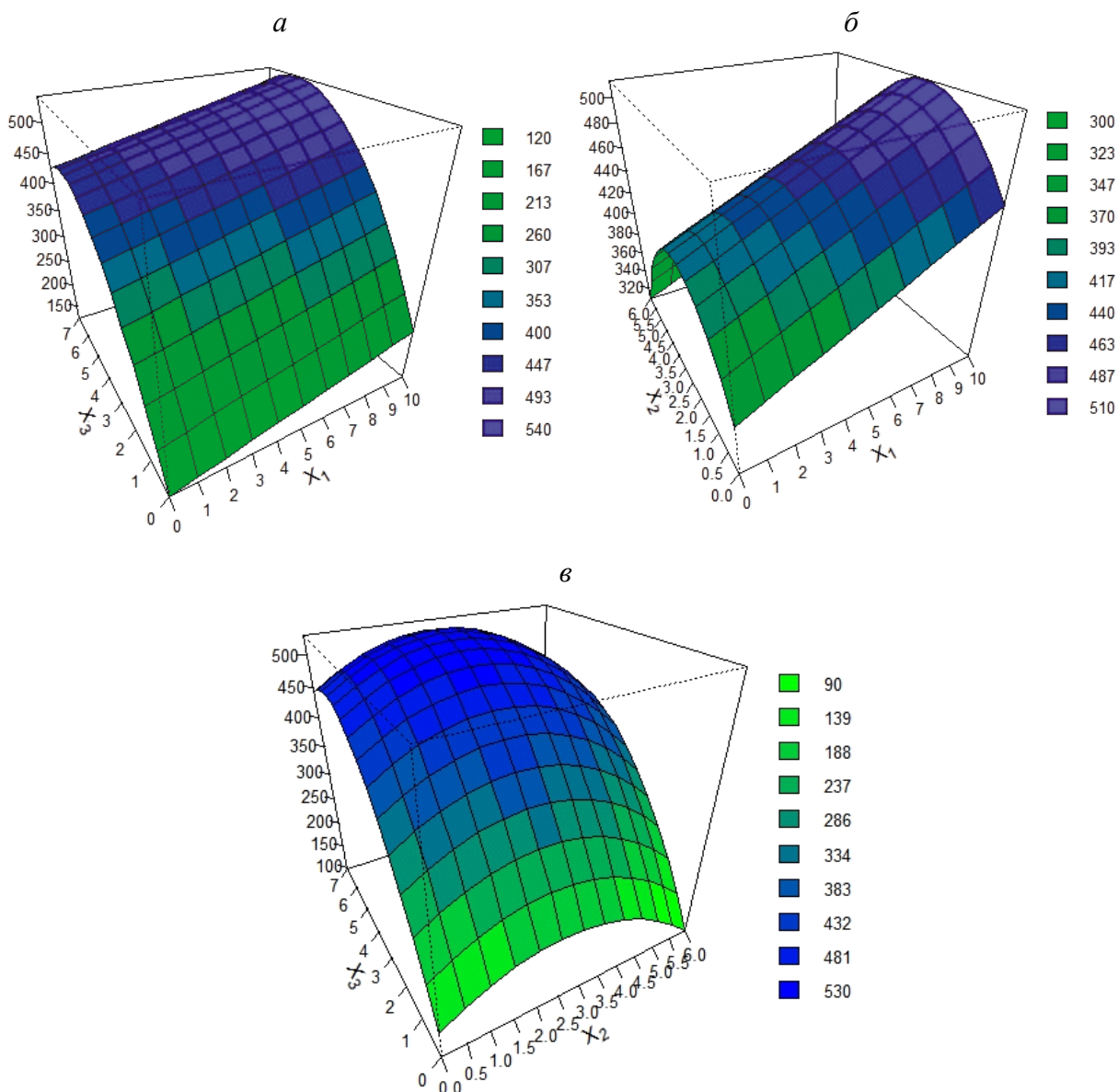
*** Значимо на уровне 99%.

$$\tilde{U}_2 = 56,33 + 9,44 \cdot X_1 + 50,7 \cdot X_2 + 115,23 \cdot X_3 - 9,7 \cdot X_2^2 - 10,27 \cdot X_3^2, \quad (5)$$

где $\tilde{U}_2$ – расчетное значение антибактериальной активности, X_1 – концентрация пептона, X_2 – концентрация дрожжевого экстракта, X_3 – концентрация глицерина.

Коэффициент детерминации данной квадратичной модели ($R^2 = 0,66$) выше, чем у модели первого порядка. Все коэффициенты регрессии значимы на уровне 99%.

Для поиска локального оптимума построены поверхности отклика модели (см. рису-



Поверхности отклика продукции антибактериального вещества, выраженного в условных единицах U , как функции от концентрации (г/л) компонентов:

a – пептона – X_1 и дрожжевого экстракта – X_2 при концентрации глицерина 4 г/л; $б$ – пептона – X_1 и глицерина – X_3 при концентрации дрожжевого экстракта 2,5 г/л; $в$ – дрожжевого экстракта – X_2 и глицерина – X_3 при концентрации пептона 9 г/л

Response surface showing the expected antibacterial activity U as a function of the concentration (g/L) of the components:

a – peptone – X_1 and yeast extract – X_2 where glycerol concentration is 4 g/L; $б$ – peptone – X_1 and glycerol – X_3 where yeast extract concentration is 2.5 g/L; $в$ – yeast extract – X_2 and glycerol – X_3 where peptone concentration is 9 g/L.

нок), графически отображающие эффекты изучаемых факторов.

Анализ поверхностей отклика показал, что оптимальная концентрация пептона выше максимальной (9 г/л), рассмотренной в опыте. Оптимальная концентрация дрожжевого экстракта находится от 2,5 до 4,5 г/л, глицерина – от 4,0 до 6,0 г/л.

На основании уравнения регрессии зависимости бактерициноподобной активности штамма *B. thuringiensis* ssp. *dakota* B-947 от концентрации компонентов питательной среды (5), принимая во внимание собственные данные и данные литературы об оптимальном соотношении углерода и азота, с учетом всех данных по уровню концентраций, полученных при оптимизации процесса культивирования, определен следующий состав оптимизированной среды: пептон – 9 г/л, дрожжевой экстракт – 2,6, глицерин – 5,6 г/л.

Сравнительные результаты антибактериальной активности образцов BLIS на среде «А», предназначенной для культивирования штаммов *B. thuringiensis* ssp. *dakota* B-947 с целью получения спор и белковых параспоральных включений, базовой среде, подходящей для синтеза вторичных метаболитов во время вегетативного роста, и среде, оптимизированной для повышения антибактериальной активности BLIS, приведены в табл. 6.

Оптимизированная среда для культивирования штамма *B. thuringiensis* ssp. *dakota* B-947 дает возможность повысить антибактериальную активность бактерициноподобного вещества в 1,6 раза по отношению

к активности этого вещества на многокомпонентной базовой среде, и в 2,5 раза по сравнению с его активностью на исходной среде «А».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования показали, что для синтеза бактерициноподобного вещества штаммом *B. thuringiensis* в среде культивирования должны присутствовать источники как азота, так и углерода. Оптимизация состава базовой питательной среды, проведенная с помощью многофакторного эксперимента, позволила определить количественный состав компонентов среды культивирования: пептон – 9 г/л, дрожжевой экстракт – 2,6, глицерин – 5,6 г/л. При выращивании штамма *B. thuringiensis* ssp. *dakota* B-947 на этой среде антибактериальная активность бактерициноподобного вещества увеличилась на 60%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmad M., Pataczek L., Hilger T., Zahir Z., Hussain A., Rasche F., Schafleitner R., Solberg S. Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 2992. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02992.
2. Cherif-Silini H., Silini A., Yahiaoui B., Ouzari I., Boudabous A. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere // *Annals of Microbiology*. 2016. Vol. 66. P. 1087–1097. DOI: 10.1007/s13213-016-1194-6.
3. Fiuza L.M., Polanczyk R.A., Crickmore N. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol // Springer International Publishing AG. 2017. 289 p. DOI 10.1007/978-3-319-56678-8.
4. Armada E., Probanza A., Roldan A., Azcon R. Native plant growth promotion bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in lavender plants // *Journal of Plant Physiology*. 2015. Vol. 192. P. 1–12. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.11.007/

Табл. 6. Сравнительная характеристика активности штамма *B.thuringiensis* ssp. *dakota* B-947 на разных средах

Table 6. Evaluation of BLIS production by *B.thuringiensis* ssp. *dakota* B-947 on different mediums

Вариант питательной среды	Антибактериальная активность образцов BLIS, U
Среда А	201
Базовая	314
Оптимизированная среда	498

5. Lee K., Gray E., Mabood F., Jung W., Charles T., Clark S., Ly A., Souleimanov A., Zhou X., Smith D. The class IId bacteriocin thuricin-17 increases plant growth // *Planta*. 2009. Vol. 229. P. 747–755. DOI: 10.1007/s00425-008-0870-6.
6. Jouzani G. et al. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017. Vol. 101. P. 2691–2711. DOI: 10.1007/s00253-017-8175-y.
7. Ben Khedher S., Jaoua S., Zouari N. Application of statistical experimental design for optimisation of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013. Vol. 44. P. 927–933.
8. Ennouri K., Ben Ayed R., Triki M.F., Ottaviani E., Mazzarello F., Zouari N. Multiple linear regression and artificial neural networks for delta-endotoxin and protease yields modeling of *Bacillus thuringiensis* // *3 Biotech*. 2017. Vol. 7. P. 187. DOI: 10.1007/s13205-017-0799-1.
9. Kamoun F., Zouari N., Saadaoui I., Jaoua S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bacteriocin production through culture conditions optimization // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009. Vol. 39. P. 400–412.
10. Martinez-Cardenas J.A., de la Fuente-Salcido N.M., Salcedo-Hernandez R., Bideshi D.K., Barboza-Corona J.E. Effects of physical culture parameters on bacteriocin production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* after cellular induction // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 39. P. 183–189. DOI: 10.1007/s10295-011-1014-8.
11. Юдина Т., Милько Е., Егоров Н.С. Чувствительность диссоциантов *Micrococcus luteus* к действию эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* // *Микробиология*. 1996. Т. 65. № 3. С. 365–369.
12. Бациллы. Генетика и биотехнология: пер. с англ. / под ред. К. Харвуда. М.: Мир, 1992. 531 с.
13. Paik H.D., Bae S.S., Park S.H., Pan J.G. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* ssp. *tochigiensis* // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1997. Vol. 19. P. 294–298.
14. De la Fuente-Salcido N., Alanís-Guzmán Ma.G., Bideshi D.K., Salcedo-Hernández R., Bautista-Justo M., Barboza-Corona J.E. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* // *Archives of Microbiology*. 2008. Vol. 190. P. 633–640.
15. Montgomery D.C. *Design and analysis of experiments*, 8th edition. / New York: Wiley. 2012. 752 p.
16. Ben Khedher S., Jaoua S., Zouari N. Overcome of carbon catabolite repression of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* through adequate fermentation technology // *Biotechnology research international*. 2014. Vol. Article ID 698587. DOI: 10.1155/2014/698587.
17. Ghribi D., Zouari N., Trabelsi H., Jaoua S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration // *Enzyme and Microbial Technology*. 2007. Vol. 40. N 4. P. 614–622.
18. Akaike H. A new look at the statistical model identification. // *IEEE Transactions on Automatic Control*. 1974. Vol. 19. P. 716–723. DOI: 10.1109/TAC.1974.1100705.

REFERENCES

1. Ahmad M., Pataczek L., Hilger T., Zahir Z., Husain A., Rasche F., Schaffleitner R., Solberg S. Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. *Frontiers in Microbiology*, 2018, vol. 9, pp. 2992. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02992.
2. Cherif-Silini H., Silini A., Yahiaoui B., Ouzari I., Boudabous A. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of Microbiology*, 2016, vol. 66, pp. 1087–1097. DOI: 10.1007/s13213-016-1194-6.
3. Fiuza L.M., Polanczyk R.A., Crickmore N. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol. *Springer International Publishing AG*. 2017. 289 p. DOI: 10.1007/978-3-319-56678-8.
4. Armada E., Probanza A., Roldan A., Azcon R. Native plant growth promotion bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in lavender dentate plants. *Journal of Plant Physiology*, 2015, vol. 192, pp. 1–12. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.11.007/

5. Lee K., Gray E., Mabood F., Jung W., Charles T., Clark S., Ly A., Souleimanov A., Zhou X., Smith D. The class IId bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. *Planta*, 2009, vol. 229, pp. 747–755. DOI: 10.1007/s00425-008-0870-6.
6. Jouzani G. et al. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, vol. 101, pp. 2691–2711. DOI: 10.1007/s00253-017-8175-y.
7. Ben Khedher S., Jaoua S., Zouari N. Application of statistical experimental design for optimisation of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, vol. 44, pp. 927–933.
8. Ennouri K., Ben Ayed R., Triki M.F., Ottaviani E., Mazzarello F., Zouari N. Multiple linear regression and artificial neural networks for delta-endotoxin and protease yields modeling of *Bacillus thuringiensis*. *3 biotech*, 2017, vol. 7, pp. 187. DOI: 10.1007/s13205-017-0799-1.
9. Kamoun F., Zouari N., Saadaoui I., Jaoua S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bacteriocin production through culture conditions optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, vol. 39, pp. 400–412.
10. Martinez-Cardenas J.A., de la Fuente-Salcido N.M., Salcedo-Hernandez R., Bideshi D.K., Barboza-Corona J.E. Effects of physical culture parameters on bacteriocin production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* after cellular induction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2012, vol. 39, pp. 183–189. DOI: 10.1007/s10295-011-1014-8.
11. Yudina T., Mil'ko E., Egorov N.S. Chuvstvitel'nost' dissotsiantov *Micrococcus luteus* k deistviyu endotoksinov *Bacillus thuringiensis* [Sensitivity of *Micrococcus luteus* dissociants to the action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins]. *Mikrobiologiya* [Microbiology], 1996, vol. 65, no. 3, pp. 365–369. (In Russian).
12. Batsilly. *Genetika i biotekhnologiya: per. s angl. / pod red. K. Kharvuda*. [Genetics and biotechnology]. M.: Mir Publ., 1992, 531 p. (In Russian).
13. Paik H.D., Bae S.S., Park S.H., Pan J.G. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* ssp. *tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, vol. 19, pp. 294–298.
14. De la Fuente-Salcido N., Alanís-Guzmán Ma.G., Bideshi D.K., Salcedo-Hernández R., Bautista-Justo M., Barboza-Corona J.E. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*, 2008, vol. 190, pp. 633–640.
15. Montgomery D.C. Design and analysis of experiments, 8th edition. New York: Wiley, 2012, 752 p.
16. Ben Khedher S., Jaoua S., Zouari N. Overcome of carbon catabolite repression of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* through adequate fermentation technology. *Biotechnology research international*, 2014, vol. Article ID 698587. DOI: 10.1155/2014/698587.
17. Ghribi D., Zouari N., Trabelsi H., Jaoua S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, vol. 40, no 4, pp. 614–622.
18. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 1974, vol. 19, pp. 716–723. DOI: 10.1109/TAC.1974.1100705.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

✉ **Калмыкова Г.В.**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; **адрес для переписки:** Россия, 630501, Новосибирская область, р.п. Краснообск, СФНЦА РАН; а/я 463; e-mail: gvkalmyk@mail.ru

Чешкова А.Ф., кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник; e-mail: cheshanna@yandex.ru

Акулова Н.И., старший научный сотрудник; e-mail: akulova_ni@ngs.ru

AUTHOR INFORMATION

✉ **Kalmykova G.V.**, Candidate of Science in Biology, Lead Researcher; **address:** PO Box 463, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russia; e-mail: gvkalmyk@mail.ru

Cheshkova A.F., Candidate of Science in Physics and Mathematics, Senior Researcher; e-mail: cheshanna@yandex.ru

Akulova N.I., Senior Researcher; e-mail: akulova_ni@ngs.ru

Дата поступления статьи 18.12.2019
Received by the editors 18.12.2019