Wpływ składu podłoża i temperatury na wzrost *Beauveria bassiana* – ocena efektywności biologicznej i kosztowej

Wojciech Białas[1], Roman Marecik[1], Agnieszka Wita[1], Sabina Łukaszewicz[2]

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu [1]

SMP Agro sp. z o. o, Komorniki 44, 63-004 Tulce [2]

WPROWADZENIE

Entomopatogenny grzyb *Beauveria bassiana* jest jednym z najważniejszych mikroorganizmów wykorzystywanych w biologicznej ochronie roślin. Skuteczne wdrożenie preparatów opartych na tym gatunku wymaga opracowania wydajnej i ekonomicznie uzasadnionej technologii namnażania, zapewniającej wysoką koncentrację żywych komórek oraz odpowiednią ilość biomasy. O efektywności procesu decydują m.in. skład podłoża i temperatura hodowli, przy czym podłoża bogate w ekstrakt drożdżowy i peptony mogą znacząco zwiększać koszt procesu w skali przemysłowej. Badania nad optymalnymi mediami hodowlanymi tradycyjnie rozpoczynają się od skali laboratoryjnej (kolby), gdzie w kontrolowanych warunkach testuje się liczne warianty składu podłoży. Następnie uzyskane formulacje poddaje się walidacji i skalowaniu w bioreaktorach.

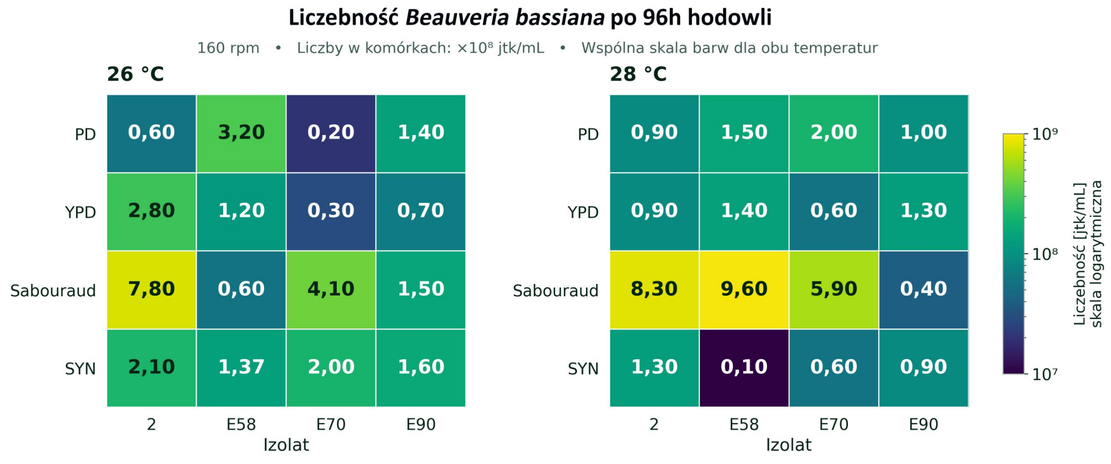
CEL PRACY

W celu obniżenia kosztów operacyjnych kluczowe jest zaprojektowanie , w miarę możliwości, prostej i taniej pożywki syntetycznej lub półsyntetycznej, zawierającej absolutne minimum wymaganych składników odżywczych (proste źródło węgla, azotu oraz podstawowe sole mineralne). Prezentowane badania miały na celu ocenę wpływu czterech podłoży hodowlanych oraz temperatur hodowli 26 i 28°C na kinetykę wzrostu czterech izolatów *B. bassiana*, ze szczególnym uwzględnieniem produkcji biomasy i końcowej liczebności jednostek tworzących kolonie. Ponadto porównano orientacyjne koszty surowców niezbędnych do przygotowania podłoży w skali 1000 L i odniesiono je do uzyskiwanej wydajności biologicznej.

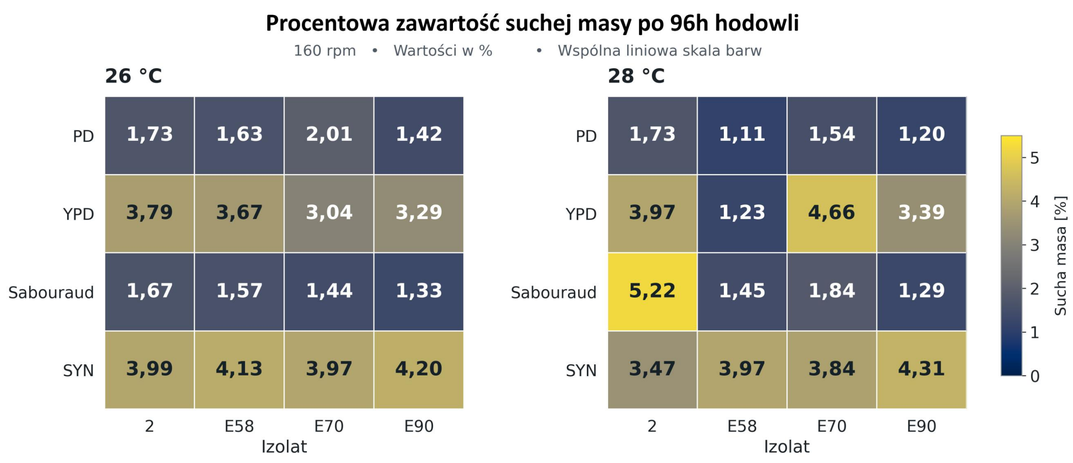
METODYKA

Badano izolaty 2, E58, E70 i E90. Hodowle prowadzono przez 96 h w kolbach wytrząsanych przy 160 rpm, w temperaturze 26 lub 28°C. Badano cztery podłoża: YPD (20 g/L glukozy, 10 g/L ekstraktu drożdżowego i 20 g/L peptonu), Sabouraud (40 g/L glukozy i 10 g/L peptonu), PD (podłoże ziemniaczano-glukozowe) oraz SYN, zawierające 30 g/L glukozy, 15 g/L ekstraktu drożdżowego, 9 g/L peptonu mięsnego, 1,5 g/L KH_2PO_4 i 0,5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. W trakcie procesu monitorowano pH i liczebność żywych komórek, natomiast po 96 h oznaczano zawartość suchej masy. Koszty podłoży oszacowano dla hurtowych cen surowców spożywczych i fermentacyjnych (punktem wyjścia były ceny surowców dostępne na giełdach towarowych w Chinach oraz Indiach) oraz wody procesowej (zmiękczanie oraz odwrócona osmoza); nie uwzględniano kosztów energii, sterylizacji, napowietrzania, chłodzenia, pracy ani amortyzacji.

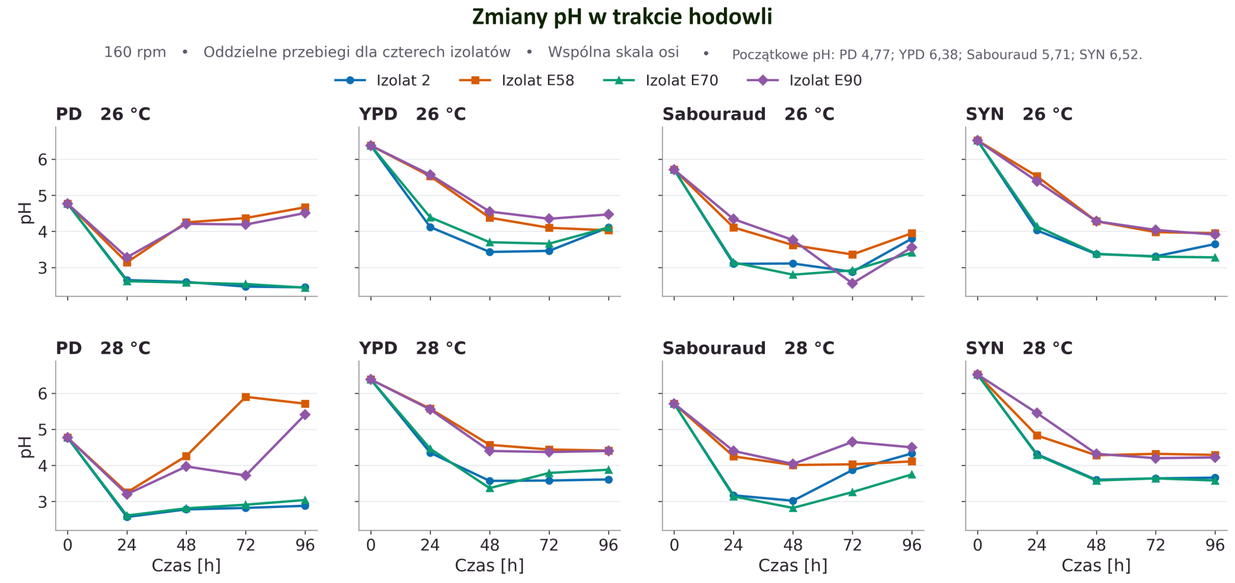
WYNIKI



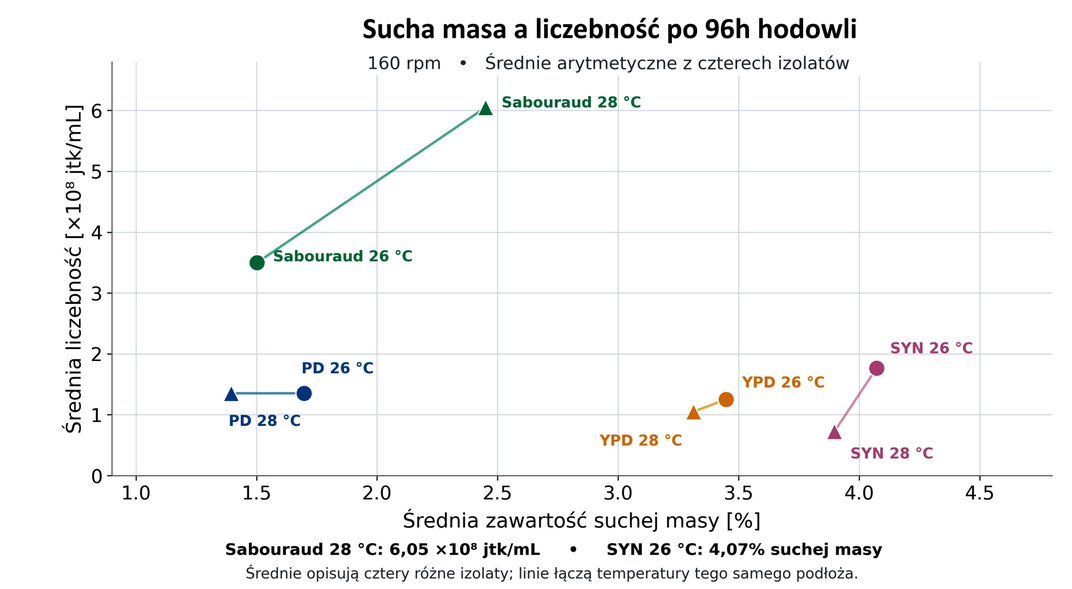
Podłoże Sabouraud w 28°C zapewniało średnio 6,05 × 10^8 jtk/mL po 96 h, a dla pojedynczych izolatów do 9,6 × 10^8 jtk/mL. W 26°C średnia wynosiła 3,50 × 10^8 jtk/mL. Podwyższenie temperatury sprzyjało namnażaniu się komórek na tym podłożu. Na podłożu SYN średnia liczebność jtk spadła z 1,77 × 10^8 do 7,25 × 10^7 jtk/mL po podwyższeniu temperatury.



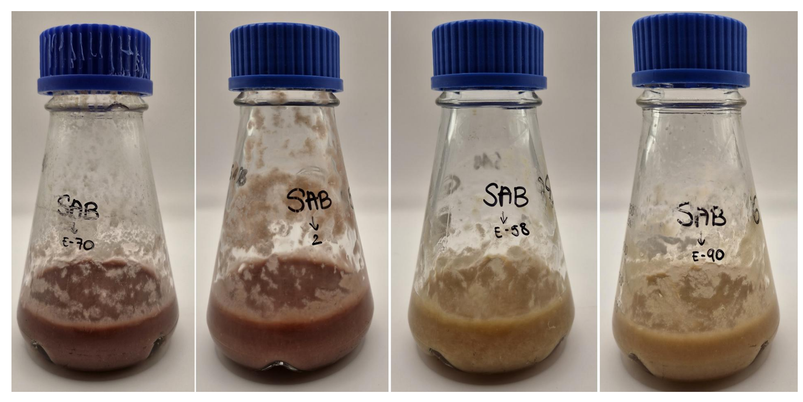
Najwyższą średnią zawartość suchej masy, obliczoną dla wszystkich izolatów, uzyskano na podłożu SYN: 4,07% w 26°C i 3,90% w 28°C. Na YPD średnie wynosiły odpowiednio 3,45% i 3,31%, przy większym zróżnicowaniu między izolatami w 28°C. Najwyższą wartość pojedynczą (5,22%) odnotowano dla izolatu 2 na podłożu Sabourauda w 28°C, podczas gdy pozostałe izolaty osiągały tam wartości od 1,29% do 1,84%.

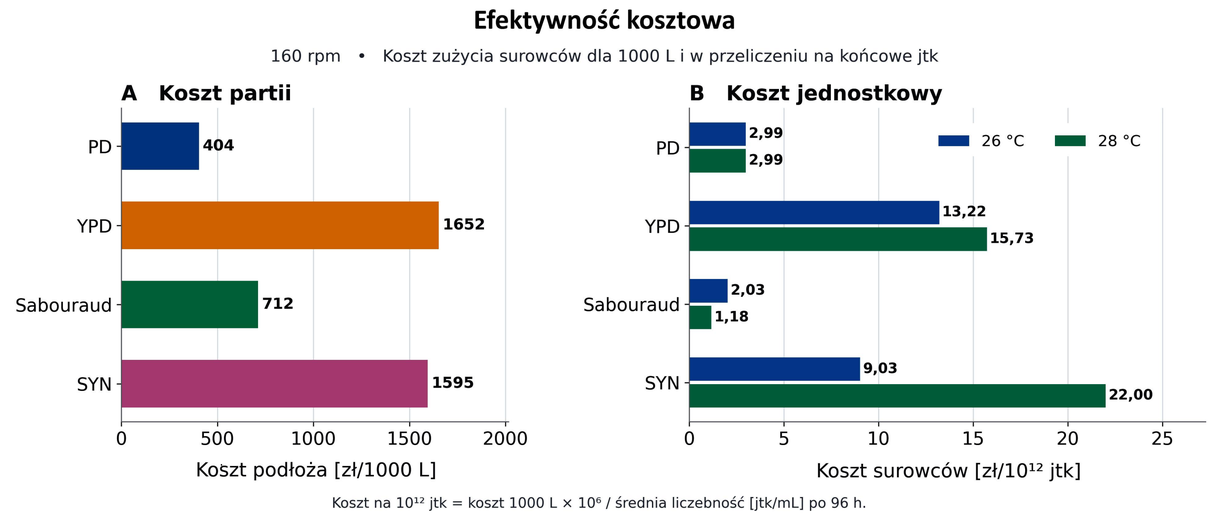


We wszystkich wariantach hodowli pH obniżało się w pierwszych 24 h, a dalszy przebieg zmian zależał od podłoża, izolatu i temperatury. Największe zróżnicowanie między izolatami obserwowano na PD: dla izolatów 2 i E70 pH pozostawało niskie do końca hodowli (około 2,5–3,1), natomiast dla E58 i E90 następował ponowny wzrost, szczególnie w 28°C. Na podłożu Sabourauda wartości minimalne osiągano po 48–72 h, po czym pH wzrastało, osiągając na końcu hodowli wyższe wartości w 28°C niż w 26°C dla wszystkich izolatów.



Podwyższeniu temperatury z 26 do 28°C towarzyszył wzrost obu parametrów na podłożu Sabourauda, natomiast na YPD i SYN obserwowano ich spadek.





Koszt na 10^{12} jtk = koszt 1000 L × 10^6 / średnia liczebność [jtk/mL] po 96 h.

Koszt surowców wymaganych do przygotowania 1000 L pożywki wyniósł: PD 404 zł, Sabouraud 712 zł, SYN 1595 zł i YPD 1652 zł. Największy udział w kosztach SYN i YPD miały ekstrakt drożdżowy i pepton. Sama cena 1000 L podłoża jednak nie odzwierciedla jego efektywności produkcyjnej. Po odniesieniu kosztu do końcowej liczebności komórek szczególnie korzystnie wypadało podłoże Sabouraud w 28°C: orientacyjny koszt pożywki wynosił około 1,18 zł na 10^{12} uzyskanych jtk

DYSKUSJA I WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują na wyraźny kompromis pomiędzy maksymalizacją ilości biomasy a maksymalizacją liczby żywych komórek *B. bassiana*. Podłoże SYN było najbardziej korzystne dla akumulacji biomasy, natomiast Sabouraud w temperaturze 28°C zapewniało najwyższą liczebność jednostek tworzących kolonie oraz korzystną relację kosztu podłoża do wydajności hodowli. W dalszej optymalizacji procesu, szczególnie z perspektywy jego skalowania, zasadne jest więc uwzględnianie nie tylko maksymalnej biomasy, lecz także kosztu jednostkowego wytworzenia żywych i technologicznie przydatnych komórek, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości blastospor.

Badania realizowane w ramach projektu „Opracowanie i wdrożenie bezpiecznych preparatów mikrobiologicznych dla zrównoważonego rolnictwa ograniczających zużycie pestycydów i nawozów sztucznych” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Funduszy Europejskich dla Nowoczesnej Gospodarki. Projekt realizowany w ramach działania 1.1. Ścieżka SMART, nr umowy: **FENG.01.01-IP.02-0903/24**. Beneficjent: SMP Agro sp. z o.o z siedzibą w Komornikach, Komorniki 44, 63-004 Tulce

Fundusze Europejskie dla Nowoczesnej Gospodarki

Rzeczpospolita Polska

Dofinansowane przez Unię Europejską

SCIENCE FOR AGRICULTURE

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU