

А. Д. НАЛБАНДЯН, В. А. АВЕТИСЯН, Р. Г. МЕЛИКСЕТАН

ЛЮФИЛЬНАЯ СУШКА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ГОРОХА

В последнее время в микробиологии широкое применение получил метод люфилльной сушки. Этот метод открывает перспективы для высушивания микробов с меньшими потерями и сохранением их основных свойств. Многими работами [1, 2, 4, 5] показана возможность применения метода лиофилизации для хранения клубеньковых бактерий в сухом виде. Известно также, что клубеньковые бактерии достаточно хорошо сохраняют биохимические свойства при низких температурах [6].

Высушивание клубеньковых бактерий является наилучшим способом хранения коллекционных культур, поскольку лиофилизированные культуры клубеньковых бактерий сохраняют вирулентность и активность [7].

Эти показатели открывают возможности для получения земледельческого бактериального препарата—нитрагина в сухом виде.

Сухой нитрагин имеет преимущества (транспортабелен, имеет большой титр клеток клубеньковых бактерий, гектарные порции маленькие и др.) по сравнению с почвенным нитрагином.

В целях получения сухого нитрагина люфилльный метод высушивания клубеньковых бактерий начал разрабатываться в Московском отделении ВНИИ с/х микробиологии [4].

Разработка метода лиофилизации и хранение сухого препарата нитрагина с высоким титром клеток клубеньковых бактерий на сегодня является актуальной.

В последнее время в лаборатории биологической фиксации атмосферного азота Института микробиологии АН АрмССР проводились исследования по разработке наиболее эффективных режимов замораживания, сушки и хранения клубеньковых бактерий с целью получения сухого нитрагина.

Культуру клубеньковых бактерий гороха (штамм 144) выращивали в колбах на среде следующего состава (в %): меласса—1 (содержание сахарозы не менее 45%), кукурузный экстракт—0,3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,05, K_2HPO_4 —0,05, NaCl —0,02, MgSO_4 —0,02, при pH 7—7,2.

Культивирование проводили на качалке с 200—240 об/мин в течение 48 час. После 24 час. ферментации в среду дополнительно вносились следующие компоненты (в %): меласса—1, кукурузный экстракт—0,3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,05 и K_2HPO_4 —0,05.

Через 48 час. в среде накапливается 15—18 г биомассы (на литр культуральной жидкости), отделенной от культуральной жидкости путем центрифугирования при 10 тыс. об/мин, в течение 10—15 мин.

Перед замораживанием паста смешивалась со следующими защитными средами (в %): меласса—20; меласса—20 и молоко—1 объем; меласса—20 и бентонит—30; меласса—20, молоко—1 объем и бентонит—30; бентонит—1 объем и меласса—20 на объем биомассы клубеньковых бактерий гороха. При смешивании различных сред с биомассой, имеющей 75—80% влажности, изменяется относительная влажность высушиваемого материала.

Таблица 1

Влажность биомассы клубеньковых бактерий гороха, суспензированных в разных защитных средах, %

Защитные среды, %	Предварительная влажность биомассы	Влажность биомассы в защитной среде
Меласса — 20	75—80	68,0
Меласса — 20 и молоко — 1 объем	75—80	70,0—73,0
Меласса — 20, молоко — 1 объем и бентонит — 30	75—80	66,0—70,0
Меласса — 20 и бентонит — 30	75—80	55,0—56,0
Бентонит — 30	75—80	65,0—68,0
Бентонит — 1:1 и меласса — 20	75—80	35,0—40,0

Так, при смешивании с пастой только мелассы (20%) влажность биомассы составляет 68%, а при смешивании мелассы с бентонитом (20%+30%) соответственно влажность биомассы—55,0—56,0%. Снижение относительной влажности в пасте позволяет осуществить ллиофилизацию клубеньковых бактерий гороха за более короткие сроки.

Пасту (клубеньковые бактерии в защитной среде) замораживали способом предварительного быстрого замораживания в смеси сухого льда с изопропиловым спиртом при температуре—75°—80°C.

После часового замораживания при этой температуре материал в дальнейшем (24 часа) оставался на льду с температурой—40°—50°C. При таком способе замораживания гибель клеток клубеньковых бактерий незначительна.

Сушка клубеньковых бактерий проводилась на ллиофильном аппарате. Остаточное давление в сублиматоре измерялось вакуумметром ВИТ-1а. Вакуум в камере создавался насосом ВН-2м, температура конденсатора измерялась лагометром ЛПр-53, температура камеры измерялась спиртовым термометром. Для охлаждения сублиматора было смонтировано приспособление вокруг камеры.

При ллиофильной сушке клубеньковых бактерий очень важна правильная организация эвакуации воды из клеток микроорганизмов. Неправильное удаление воды приводит к денатурации белка. Исходя из этого, испытывалось влияние некоторых защитных сред на обезвоживание и сохранение жизнеспособности клубеньковых бактерий в зависимости от температуры.

Для этого в течение высушивания на каждый час, при определенной температуре и вакууме, в образцах определяли остаточную влажность и титр клеток.

В табл. 2 представлены результаты лиофильной сушки клубеньковых бактерий гороха в защитной среде бентонита (30% к объему биомассы).

Таблица 2

Изменение титра клеток клубеньковых бактерий и остаточной влаги в процессе сушки (первоначальная температура сублиматора — 30°)

Время, час	Температурный режим сушки, °C	Титр клеток клубеньковых бактерий, млрд	Остаточная влажность, %	Давление остаточных газов, мм рт. ст.
Защитная среда—бентонит — 30%				
1	—20	3000,0	68,2—66,3	—
2	—12	2500,0	60,4	$8 \cdot 10^{-2}$
3	— 5	2000,0	55,2	$5 \cdot 10^{-2}$
4	1	1800,0	48,9	—
5	5	1000,0	23,2	$1 \cdot 10^{-2}$
6	8	300,0	7,4	$1 \cdot 10^{-2}$
7	12	15,0	2,3	$1 \cdot 10^{-2}$
8	16	5,0	1,0	$1 \cdot 10^{-2}$
Защитная среда—меласса — 20%, бентонит — 30%				
1	—20	3000,0	56,4—54,2	—
2	—12	2900,0	48,5	$8 \cdot 10^{-2}$
3	— 5	2800,0	40,2	$5 \cdot 10^{-2}$
4	1	2500,0	—	—
5	5	2300,0	25,1	$1 \cdot 10^{-2}$
6	8	2000,0	20,2	$1 \cdot 10^{-2}$
7	12	1500,0	3,80	$1 \cdot 10^{-2}$
8	16	800,0	2,03	$1 \cdot 10^{-2}$

Как видно из таблицы, первоначальная температура в сублиматоре была—30°C. В течение первого часа температура в сублиматоре поднялась всего на 10° (—30—20°C), при этом наблюдалась незначительная гибель клеток. Количество удаленной воды составляло 2%.

В последующие 2, 3, 4 часа, когда температура с —20 поднималась до 1°C, наблюдалась некоторая гибель клеток. За это время количество удаленной воды составило 17,4% (66,3—48,9).

Согласно данным, наибольшая часть воды удаляется через 4—5—6 час. сушки, когда температура соответственно составляет 1—5—8°C. Спустя 4—5 часов количество удаленной воды составляет 25,7% (48,9—23,2), а за период между 5—6 час.—15,8% (23,2—7,4).

В этот период наблюдается первая значительная гибель клеток клубеньковых бактерий.

В течение 6—7 и 7—8 час., когда температура в сублиматоре 8—12°C, удаление воды уменьшается, особенно в период 7—8 час. (температура 12—16°C). В этот период происходит вторая, более значительная гибель клеток клубеньковых бактерий.

Результаты, полученные при сушке клубеньковых бактерий гороха, суспендированных в защитной среде меласса + бентонит (20% + 30% на объем биомассы), представлены в табл. 2.

Существенное различие при лифофильной сушке клубеньковых бактерий гороха в защитной среде бентонита и бентонита с мелассой заключается в следующем: если в бентонитной среде первое значительное уменьшение титра клеток наблюдалось между 4—6 час., то в среде меласса + бентонит этого не наблюдается (температура 1—8°C). Удаление воды в течение 5—6 час. составляет всего 2,5% (в первом случае это составило 15,8%). В защитной среде мелассы и бентонита значительное снижение титра клеток наблюдается в период между 6—7 и 7—8 час. при температуре 8—12—16°C, что совпадает с сильным удалением воды—16,4% (20,2—3,8%).

Таблица 3

Выживаемость клубеньковых бактерий гороха в сухом препарате (штамм 144) при хранении без вакуума (температура хранения 4—5°C)

Защитная среда, ‰	Сроки хранения (день) после сушки						Остаточная влажность сухого препарата, ‰
	30	60	150	180	270	365	
	Количество клубеньковых бактерий в 1 г сухого препарата, млрд.						
Молоко+меласса	500,0	450,0	30,0	30,0	20,0	12,0	3,7
Меласса—20+бентонит—10 . .	470,0	480,0	37,0	35,5	18,0	18,3	2,9
Меласса—20+бентонит—30 . .	520,0	500,0	37,0	38,0	22,0	19,2	2,03

Из приведенных данных можно заключить, что для получения высокой выживаемости клеток сублимационную сушку лучше всего проводить при низких температурах, но более продолжительное время. При сушке со значительным колебанием температуры (—30 до 16°C и т. д.) в защитной среде наличие углеводов обязательно. Вероятно, углеводы регулируют эвакуацию воды из клеток, что положительно влияет на их выживаемость. При сушке клубеньковых бактерий немаловажное значение имеет также и толщина слоя высушиваемого материала. В наших опытах она колебалась в пределах до одного сантиметра.

В течение 1969 г. проводились опыты по определению выживаемости клубеньковых бактерий гороха в сухом препарате при их хранении в холодильнике (температура 4—5°C). Результаты этих опытов обобщены в табл. 3. Опыты показали, что в условиях вакуума выживаемость клубеньковых бактерий гороха в сухом препарате выше (защитная среда—меласса + молоко), при этом титр изменяется незначительно, и препарат можно хранить 6—7 месяцев.

При хранении без вакуума титр клубеньковых бактерий гороха в сухом препарате (защитная среда—меласса + бентонит, температура хранения—4—5°C), изменяется незначительно в течение первых 4—5 месяцев, в следующие 6—9 месяцев титр значительно снижается от 500 млрд/г до 30—50 млрд/г. За 9—12 месяцев хранения титр клеток снизился с 30—50 млрд/г до 19—12 млрд/г сухого препарата.

Следовательно, наиболее благоприятной защитной средой как для сушки, так и для хранения клубеньковых бактерий гороха в сухом препарате является смесь мелассы—20% и бентонита—30%.

Институт микробиологии

АН АрмССР

Поступило 14.IV 1970 г.

Ա. Զ. ՆԱԼԲԱՆԴՅԱՆ, Վ. Ա. ԱՎԵՏԻՍՅԱՆ, Բ. Գ. ՄԵԼԻՔՍԵՏՅԱՆ

ՈՒՈՌԻ ՊԱԼԱՐԱԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԼԻՈՖԻԼ ՉՈՐԱՑՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո Վ

Հայկ. ՍՍՀ միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտի միկնոլորտային ազոտի բիոլոգիական ֆիրմացիայի լաբորատորիայում 1968 թվականից ուսումնասիրություններ են կատարվում պալարաբակտերիաների սառեցման, չորացման և պահպանման առավել արդյունավետ ռեժիմներ մշակելու ուղղությամբ՝ հողը պարարտացնող բակտերիալ պրեպարատ՝ չոր (փոշենման) նիտրագին ստանալու նպատակով:

Չոր նիտրագինը հողային նիտրագինի համեմատությամբ ունի մի շարք առավելություններ՝ պարունակում է մեծ քանակով պալարաբակտերիաների բջիջներ, հեշտ փոխադրելի է, հեկտարային բաժինները փոքր են և այլն:

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ պալարաբակտերիաների աճեցման համար լավագույնը հանքային աղերի, շաքարատականքի և եգիպտացորենի քաշվածքի հեղուկ միջավայրն է: Պալարաբակտերիաները այդ միջավայրում 48 ժամ աճեցնելուց հետո կենսազանգվածը կուտուրալ հեղուկից անջատվում է կենտրոնախույսի միջոցով:

Պալարաբակտերիաների կենսազանգվածը խառնվում է պաշտպանիչ միջավայրերի հետ (շաքարատականք—բենտոնիտ), սառեցվում է —70—80%-ի պայմաններում, ապա ենթարկվում լիոֆիլ չորացման: Չորացման տեղողությունը 8—9 ժամ է:

Պալարաբակտերիաների չոր պրեպարատը կարելի է պահպանել մինչև մեկ տարի 4—5 ջերմաստիճանի պայմաններում, 19 մլրդ./գ. բջիջների թվով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бородулина Ю. С. Тр. Института микробиологии АН СССР, вып. 11, 1961.
2. Бородулина Ю. С., Самсонова С. П., Анискина З. Н. и др. Биологический азот и его роль в земледелии. Изд. «Наука», М., 1967.

3. Горячев М. И. Вестник АН Каз.ССР, 1, 1962.
4. Израильский В. П., Бородин Ю. С., Панова С. П. Тр. совещания по вопросам бактериальных удобрений. Киев, 1956.
5. Комерова Э. П. ДАН БССР, 11, ст. 1021—1023, 1967.
6. Мелкина З. М. Сб. бюлл. научно-студенческой конференции, ч. 2, 1955.
7. Appleman M. D., Sears O. N. 52, 209—211; 1946.