

УДК 631.847.2

А. Д. Налбандян, В. А. Аветисян, Т. У. Саркисян

Разработка сред для посевного материала и ферментации клубеньковых бактерий

Эффективность лиофилизации клубеньковых бактерий, как и других микроорганизмов, зависит не только от защитной среды, температуры, вакуума и т. д., но и от правильной подготовки посевной и ферментационной среды. Целью настоящей работы было подобрать соответствующие компоненты для приготовления сред посевного материала и ферментации клубеньковых бактерий гороха, люцерны и эспарцета.

Исследовалась среда следующего состава (в %): меласса—1—2, кукурузный экстракт—0,3—0,6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,05, K_2HPO_4 —0,05, NaCl —0,02, MgSO_4 —0,02. Среда стерилизовалась при 0,5 атм. 30 минут, pH—7,0. Культивирование клубеньковых бактерий проводили на качалке с 200—240 об/мин, при температуре 26—28°C.

Как видно из данных табл. 1, при внесении в среду 100 млн./мл клеток титр клубеньковых бактерий гороха, люцерны и эспарцета в основном высокий. Из данных видно также, что наибольший титр клубеньковых бактерий достигается при 48-часовом культивировании.

Исходя из результатов этих исследований, для подготовки посевного материала клубеньковых бактерий гороха, люцерны и эспарцета целесообразно вносить в среду 100—120 млн./мл клеток бактерий.

В табл. 2 показан титр клубеньковых бактерий гороха, люцерны и эспарцета в зависимости от состава среды.

Приведенный в таблице термин «обогащенная среда» означает, что в среде меласса составляет 2%, а кукурузный экстракт—0,6%. Термин «обычная среда»—меласса—1%, кукурузный экстракт—0,3%. Остальные компоненты сред (в %): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,05, K_2HPO_4 —0,05, NaCl —0,02, MgSO_4 —0,02.

Результаты исследования показывают, что для хорошего роста клубеньковых бактерий гороха, люцерны и эспарцета особое значение имеют компоненты посевной и ферментацион-

ной среды. Так например, для выращивания клубеньковых бактерий люцерны (шт. 21) и гороха (шт. 23 и 227) в состав посевного материала и ферментационной среды целесообразно вносить: мелассы—1% и кукурузного экстракта—0,3%. Однако в этом случае после 24-часового культивирования необходимо обогащение ферментационной среды дополнительной подкормкой: меласса—1% и кукурузный экстракт—0,3%.

Исследования показали также, что при культивировании клубеньковых бактерий эспарцета в ферментационную среду можно внести: мелассы—2% и кукурузного экстракта—0,6% без дополнительной подкормки.

Таблица 1

Количество клубеньковых бактерий в культуральной жидкости в зависимости от титра посевного материала*

Испытуемые виды и штаммы	Титр посевного материала в млн./мл	Титр культуральной жидкости, млрд./мл	
		через 24 часа культивирования	через 48 часов культивирования
Клубеньковые бактерии гороха, штамм 23	50.0	4.9	15.1
	100.0	4.4	15.4
	120.0	5.4	18.6
Штамм 23	50.0	5.0	13.0
	100.0	7.6	16.0
Штамм 23	50.0	4.0	7.6
	100.0	13.0	19.0
Клубеньковые бактерии эспарцета, штамм 51	50.0	7.4	17.0
	50.0	11.2	56.0
	100.0	32.0	68.4
Штамм 51	50.0	10.6	15.6
	100.0	3.2	18.2
Клубеньковые бактерии люцерны, штамм 21	50.0	1.4	7.4
	100.0	2.2	6.5
	50.0	1.5	4.1
Штамм 21	100.0	1.4	19.8

* В таблице приведены данные трех опытов с клубеньковыми бактериями гороха (шт. 23) и двух опытов с клубеньковыми бактериями эспарцета (шт. 51) и люцерны (шт. 21)

В ходе исследования стало необходимым выяснить влияние изменения компонентов среды на выживаемость клубеньковых бактерий при их лиофилизации. Были испытаны клубеньковые бактерии эспарцета (шт. 51) и люцерны (шт. 21). Эти штаммы культивировались 48 час. на качалке, затем центрифугировались (центрифуга Т-24) при 10 тыс. об/мин в течение 15—20 мин.

В полученной биомассе определялись титр и влажность. В качестве защитной среды для суспендирования биомассы использовалась смесь: меласса—20% и бентонит—30% (на объем биомассы).

Таблица 2

Титр клубеньковых бактерий в зависимости от состава среды*

Испытуемые виды и штаммы	Титр посевного материала, млн./мл	Титр спустя 24 час., млрд./мл		Титр спустя 48 час., млрд./мл		
		обогащенная среда	обычная среда	обогащенная среда	среда, обогащенная через 24 часа	обычная среда
Клубеньковые бактерии гороха, штамм 23	50,0	рост не выявлен	5,0	Рост не выявлен	13,0	5,8
	100,0	—	7,6	—	16,0	6,8
	50,0	1,0	4,0	—	7,6	—
	100,0	1,4	13,0	—	19,0	—
Клубеньковые бактерии эспарцета, штамм 51	50,0	—	7,4	—	17,0	8,6
	100,0	—	—	—	—	—
	50,0	15,6	11,2	64,0	56,0	—
	100,0	35,6	32,0	70,0	68,4	—
	50,0	15,8	10,6	23,0	15,6	6,6
	100,0	18,4	3,2	36,2	18,2	20,8
Клубеньковые бактерии люцерны, штамм 21	50,0	4,9	1,4	4,92	7,4	6,6
	100,0	9,4	2,2	8,78	6,5	8,8
	50,0	1,6	1,54	нет роста	4,1	3,9
	100,0	1,14	1,38	13,4	19,8	—

* В таблице приведены данные двух опытов с клубеньковыми бактериями гороха (шт. 23), люцерны (шт. 21) и трех опытов с клубеньковыми бактериями эспарцета (шт. 51).

Пасту (биомасса в защитной среде) замораживали при температуре —60—80°C (в смеси сухого льда с изопропило-

вым спиртом) в течение 60—90 мин и выдерживали 18—20 час. при температуре 50—60°C.

Сушка клубеньковых бактерий проводилась на лиофильном аппарате. Остаточное давление в сублиматоре измерялось вакуумметром ВИТ-1А. Вакуум в камере создавался насосом ВН-2 м, температура конденсатора измерялась лагометром ЛПр—53, температура камеры (сублиматора) измерялась спиртовым термометром.

Таблица 3
Лиофилизация клубеньковых бактерий эспарцета и люцерны

Испытуемые виды и штаммы	Титр биомассы, млрд./г	Титр биомассы в смеси с бентонитом, млрд./г	Титр сухого препарата, млрд./г	Влажность биомассы в %	Влажность сухого препарата в %	День лиофилизации
Клубеньковые бактерии эспарцета, штамм 51	2,4 трил. 840,0	1,8 трил. 240,0	206,0 60,0	85,2 —	2,4 —	15.X 1970г. 28.IX 1970г.
Клубеньковые бактерии люцерны, штамм 21	126,0 —	94,0 44,0	69,8 32,0	72,4 82,5	1,8 5,7	28.X 1970г. 13.XI 1970г.

До начала лиофилизации сублиматор охлаждался до —25—30°C и затем высушиваемый материал переносился в камеру. Продолжительность лиофилизации 8—9 час. при конечной температуре 18—19°C. Каждый час записывалось остаточное давление, температура в сублиматоре и конденсаторе.

Как видно из данных табл. 3, титр биомассы клубеньковых бактерий эспарцета был наивысшим—2,4 трил./г и в этом случае в 1 г сухого препарата содержалось до 206 млрд./г клеток бактерий. Остаточная влажность сухого препарата составляла 2,4%.

В одном грамме биомассы клубеньковых бактерий люцерны содержалось 94—126 млрд. клеток, а в сухом препарате—69,8 млрд., что составляет соответственно 55,4—74,2% от первоначального титра биомассы.

Исходя из результатов исследования можно прийти к заключению, что выживаемость клубеньковых бактерий люцерны (шт. 21) при лиофилизации выше, чем у эспарцета (шт. 51).

Выводы

1. Наиболее эффективной средой для подготовки посевного материала и ферментации клубеньковых бактерий гороха и люцерны является среда следующего состава (в %): меласса-1, кукурузный экстракт—0,3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,05, K_2HPO_4 —0,05, NaCl —0,02 и MgSO_4 —0,02. Однако при 48-часовом выращивании через 24 часа необходимо ферментационную среду дополнительно обогащать средой этого же состава.

2. Для выращивания (подготовка посевного материала и ферментация) клубеньковых бактерий эспарцета целесообразно иметь среду следующего состава (в %): меласса—2, кукурузный экстракт—0,3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,05, K_2HPO_4 —0,05, NaCl —0,02 и MgSO_4 —0,02. В этом случае при ферментации дополнительного обогащения не требуется.

3. Установлено также, что для подготовки посевного материала клубеньковых бактерий гороха, люцерны и эспарцета целесообразно вносить в среду 100—120 млн/мл клеток бактерий.

Ա. Չ. ՆԱԻԲԱՆԴՅԱՆ, Վ. Ա. ԱՎԵՏԻՍՅԱՆ, Թ. Հ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

ՊԱՆԱՐԱԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՑԱՆՎՈՂ ՄԱՏԵՐԻԱԼԻ ԵՎ
ՖԵՐՄԵՆՏԱՑԻՈՆ ՄԵՆԴԱՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ԿԱԶՄԻ ՄՇԱԿՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Սույն աշխատության նպատակն է ընտրել համապատասխան սննդամիջավայր առվույտի, կորնզանի և ոլոռի պալարաբակտերիաների ցանվող մատերիալի և ֆերմենտացիոն միջավայրի պատրաստման համար:

Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ պալարաբակտերիաների ցանվող մատերիալի տիտրը պետք է լինի 100—120 մլն/մլ սահմաններում: Ցանվող մատերիալը պատրաստվում է թափահարիչի վրա 24-ժամյա աճեցմամբ 26—28° ջերմության պայմաններում:

Առվույտի և ոլոռի պալարաբակտերիաների ամենամեծ քանակը ստացվում է այն դեպքում, երբ ֆերմենտացիոն սննդամիջավայր է մտցվում 1% մեկառայի և 0,3% եգիպտացորենի էքստրակտի խառնուրդ՝ հանքային նյութերի հետ մեկտեղ: Այս դեպքում,

պալարաբաղադրիչների 24-ժամյա աճից հետո առհրաժեշտ է միջավայրը նորից հարստացնել մեկ տոկոս մեկասայով և 0,03% եզիպտացորենի էքստրակտով:

Կորնզանի պալարաբաղադրիչների աճեցողության համար առհրաժեշտ է ֆերմենտացիոն սննդամիջավայր մտցնել 2% մեկասայի, 0,6% եզիպտացորենի էքստրակտի և հանքային աղերի խառնուրդ: 24-ժամյա աճից հետո սննդամիջավայրը լրացուցիչ սնուցում չի պահանջում:

Ոլոռի, առվույտի և կորնզանի պալարաբաղադրիչների աճեցման տևողությունը 48 ժամ է: