

В. А. АВЕТИСЯН, А. Д. НАЛБАНДЯН

## ЛИОФИЛЬНАЯ СУШКА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ И ЭСПАРЦЕТА

Разработан эффективный режим лиофилизации активных штаммов клубеньковых бактерий люцерны и эспарцета.

На основании проведенных исследований делается заключение о существующем штаммовом различии, о котором следует помнить при сушке. Клубеньковые бактерии люцерны по сравнению с клубеньковыми бактериями эспарцета более жизнестойки. Наилучшей защитной средой является смесь мелассы—20% + бентонит—30%.

Среди микроорганизмов-фиксаторов атмосферного азота особую роль играют микробы-симбионты и в первую очередь клубеньковые бактерии. Для устойчивого накопления азота и получения высоких урожаев необходима искусственная инокуляция бобовых растений активными расами клубеньковых бактерий.

В практике сельскохозяйственного производства широкое применение нашел препарат почвенный нитрагин, содержащий активные и вирулентные расы клубеньковых бактерий, но производство этого препарата имеет ряд существенных недостатков, ограничивающих его изготовление и применение.

Получение сухих культур клубеньковых бактерий открывает перспективы для выпуска в стране сухого нитрагина, который не имеет недостатков почвенного препарата.

Ряд авторов [1, 2, 4, 5] показал возможность применения лиофильной сушки для хранения клубеньковых бактерий. Известно также, что при хранении высушенных культур клубеньковых бактерий в запаянных ампулах под вакуумом их вирулентность и активность не снижаются [7, 9, 11].

Для сохранения всех жизненно важных функций микроорганизмов при их замораживании, высушивании и хранении, наряду с правильным определением режима высушивания, температуры, остаточной влажности, большое значение имеет также подбор оптимальных защитных сред [6, 8, 10].

Цель настоящего исследования заключалась в разработке наиболее эффективного режима лиофилизации активных штаммов клубеньковых бактерий люцерны (штаммы №№ 21, 422) и эспарцета (штаммы №№ 51, 811).

*Материал и методика.* Культуры клубеньковых бактерий выращивались в колбах Эрленмейера (250 мл) на качалках (200—240 об/мин) при температуре 26—27°.

Для выращивания клубеньковых бактерий люцерны использовалась среда следующего состава (в %): меласса—1, кукурузный экстракт—0,3,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,05,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ —0,05,  $\text{MgSO}_4$ —0,02,  $\text{NaCl}$ —0,02 при pH—7—7,2. Через 24 часа в среду дополнительно вносились 1% мелассы и 0,3% кукурузного экстракта для получения высокого выхода биомассы.

Клубеньковые бактерии эспарцета выращивались на оптимальной среде следующего состава (в %): меласса—2, кукурузный экстракт—0,6,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,05,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ —0,05,  $\text{MgSO}_4$ —0,02 и  $\text{NaCl}$ —0,02, pH—7—7,2, без дополнительной подкормки. Биомассу отделяли центрифугированием при 10—12 тыс. об/мин в течение 15—20 мин.

В качестве защитных сред при лиофилизации клубеньковых бактерий люцерны и эспарцета были взяты три среды (в %): меласса—20, смесь мелассы с бентонитом 20 и 30, бентонит—30 на 1 объем биомассы (бентонит из Саригюхского месторождения, Иджеванский р-он АрмССР). Биомасса с защитными средами тщательно перемешивалась и помещалась в стерильные пробирки (15×1,5 см). Высота слоя около 1 см. Паста (клубеньковые бактерии в защитной среде) замораживалась в смеси сухого льда с изопропиловым спиртом при температуре—70—80° в течение 60—90 мин и затем выдерживалась в сосудах Дюара на льду при температуре—50—60° (20—24 часа). При этом способе замораживания гибель клеток клубеньковых бактерий незначительна.

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

До начала лиофилизации сублиматор охлаждался до—30° и затем высушиваемый материал переносился из дюаров в камеру. Температура в конденсаторе—60°. В процессе высушивания через каждый час при определенной температуре и вакууме [6] в образцах определялись титр клеток (методом разведения) и остаточная влажность по общепринятой методике [3].

Как видно из результатов исследования (табл. 1), процент гибели клеток клубеньковых бактерий эспарцета (штамм 51) за первые четыре часа сушки при температуре—28——6° во всех трех защитных средах незначителен. При этом эвакуация воды из препарата достаточно медленная. В момент перехода от минусовых температур к плюсовым (0°) клетки в защитных средах с мелассой гибнут в пять раз больше, а с бентонитом—приблизительно в четыре раза больше, чем в среде меласса+бентонит. Эвакуация воды почти одинакова во всех защитных средах.

В готовом препарате окончательный титр в защитной среде меласса+бентонит в шесть раз выше, чем в среде только с мелассой и в четыре раза—чем в среде с бентонитом.

Та же картина наблюдается в отношении штамма 811 (табл. 2). Однако, как показывают данные, по сравнению со штаммом 51 он слабо переносит лиофилизацию.

Гибель клеток клубеньковых бактерий люцерны, штамма 21, при минусовых температурах в защитных средах с мелассой, мелассой+бентонит и с бентонитом незначительна (табл. 3), эвакуация воды происходит без резких перепадов. При переходе от 0° к 4° в защитных средах только с мелассой и бентонитом происходит резкое снижение титра соответственно в два и двадцать раз.

В среде меласса+бентонит титр падает медленно, хотя эвакуация воды происходит почти одинаково во всех трех средах.

Таблица 1

Изменение титра клеток и остаточной влаги в процессе сушки у штамма эспарцета № 51 (первоначальная температура сублиматора — 30°C)

Время, час	Температурный режим сушки, °С	Титр клеток клубеньковых бактерий, млрд/г	Остаточная влажность, %	Давление остаточных газов, мм рт. ст.
------------	-------------------------------	---	-------------------------	---------------------------------------

Защитная среда—меласса—20%

1	-28	310,0	62,8	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	300,0	58,8	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	262,0	55,4	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	248,0	39,0	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	24,0	5,8	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	14,0	4,4	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	14,0	3,4	$1 \cdot 10^{-2}$
8	+12	10,0	2,7	$1 \cdot 10^{-2}$

Защитная среда—меласса—20% + бентонит—30%

1	-28	324,0	49,9	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	314,0	49,0	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	256,0	48,9	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	256,0	20,3	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	134,0	3,0	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	100,0	2,3	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	60,0	1,3	$1 \cdot 10^{-2}$

Защитная среда—бентонит—30%

1	-28	314,0	56,9	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	312,0	55,4	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	292,0	55,4	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	286,0	18,0	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	40,0	7,3	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	24,0	1,8	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	14,0	0,5	$1 \cdot 10^{-2}$

Таблица 2

Изменение титра клеток и остаточной влаги в процессе сушки у штамма эспарцета № 811 (первоначальная температура сублиматора — 30°C)

Время, час	Температурный режим сушки, °С	Титр клеток клубеньковых бактерий, млрд/г	Остаточная влажность, %	Давление остаточных газов, мм рт. ст.
1	2	3	4	5

Защитная среда—меласса—20%

1	-28	460,0	72,9	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	400,0	57,5	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	380,0	37,9	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	114,0	32,4	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	44,0	5,1	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	22,0	3,9	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	10,0	2,3	$1 \cdot 10^{-2}$
8	+12	8,0	1,5	$1 \cdot 10^{-2}$

1	2	3	4	5
Защитная среда—меласса—20% + бентонит—30%				
1	-28	472,0	53,2	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	400,0	44,2	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	340,0	28,4	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	100,0	14,3	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	68,0	3,5	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	60,0	2,4	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	20,0	1,4	$1 \cdot 10^{-2}$
Защитная среда—бентонит—30%				
1	-28	462,0	57,5	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	400,0	49,1	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	390,0	19,0	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	80,0	12,2	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	50,0	5,2	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	40,0	2,1	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	0	0,5	$1 \cdot 10^{-2}$

Таблица 3

Изменение титра клеток и остаточной влаги в процессе сушки у штамма люцерны № 21 (первоначальная температура сублиматора — 30°C)

Время, час	Температурный режим сушки, °C	Титр клеток клубеньковых бактерий, млрд/г	Остаточная влажность, %	Давление остаточных газов, мм рт. ст.
Защитная среда—меласса—20%				
1	-28	382,0	61,6	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	370,0	60,0	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	362,0	44,2	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	352,0	23,7	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	292,0	20,9	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	126,0	5,3	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	104,0	4,4	$1 \cdot 10^{-2}$
8	+12	80,0	2,2	$1 \cdot 10^{-2}$
Защитная среда—меласса—20% + бентонит—30%				
1	-28	384,0	49,0	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	380,0	44,3	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	378,0	35,2	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	324,0	29,4	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	244,0	5,5	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	190,0	5,3	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	180,0	4,2	$1 \cdot 10^{-2}$
8	+12	150,0	1,7	$1 \cdot 10^{-2}$
Защитная среда—бентонит—30%				
1	-28	390,0	55,9	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	386,0	53,2	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	384,0	43,8	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	372,0	27,2	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	264,0	11,6	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	40,0	6,1	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	2,0	4,7	$1 \cdot 10^{-2}$
8	+12	800,0 млн	0,6	$1 \cdot 10^{-2}$

Таблица 4

Изменение титра клеток и остаточной влажности в процессе сушки у штамма люцерны № 422 (первоначальная температура сублиматора—30°C)

Время, час	Температурный режим сушки, °C	Титр клеток клубеньковых бактерий, млрд/г	Остаточная влажность, %	Давление остаточных газов, мм рт. ст.
------------	-------------------------------	---	-------------------------	---------------------------------------

## Защитная среда—меласса—20%

1	-28	98,0	65,6	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	80,0	61,5	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	64,0	56,4	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	62,8	10,8	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	29,8	4,6	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	20,0	4,6	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	18,0	3,9	$1 \cdot 10^{-2}$
8	+12	4,0	1,7	$1 \cdot 10^{-2}$

## Защитная среда—меласса—20% + бентонит—30%

1	-28	68,0	53,0	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	66,4	49,9	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	62,0	43,0	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	59,2	20,6	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	32,8	10,2	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	24,0	3,9	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	22,0	2,4	$1 \cdot 10^{-2}$
8	+12	20,0	1,3	$1 \cdot 10^{-2}$

## Защитная среда—бентонит—30%

1	-28	98,0	51,6	$8 \cdot 10^{-2}$
2	-26	77,4	47,6	$5 \cdot 10^{-2}$
3	-12	73,6	32,6	$2 \cdot 10^{-2}$
4	-6	62,8	11,6	$2 \cdot 10^{-2}$
5	0	2,4	4,2	$2 \cdot 10^{-2}$
6	+4	1,2	3,4	$2 \cdot 10^{-2}$
7	+8	1,0	2,1	$1 \cdot 10^{-2}$
8	+12	600,0 млн	0,5	$1 \cdot 10^{-2}$

Сушка штамма 422 (табл. 4) происходит так же, как и у штамма 21, за исключением случая со средой мелассы, когда падение титра наступает при повышении температуры с  $-6^\circ$  до 0.

Из результатов исследований можно заключить, что существует штаммовое различие, и при сушке клубеньковых бактерий необходимо это иметь в виду.

Клубеньковые бактерии люцерны по сравнению с клубеньковыми бактериями эспарцета более жизнестойки, они лучше переносят лиофилизацию. Для сушки клубеньковых бактерий эспарцета и люцерны наилучшей защитной средой является смесь 20% мелассы и 30% бентонита. Это дает нам основание предложить бентонит в качестве одного из компонентов защитной среды.

Институт микробиологии  
АН АрмССР

Поступило 25.V 1972 г.

## Վ. Ա. ԱՎԵՏԻՅԱՆ, Ա. Գ. ՆԱԼԲԱՆԴՅԱՆ

## ԿՈՐՆԳԱՆԻ ԵՎ ԱՌՎՈՒՅՏԻ ՊԱՂԱՐԱՐԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԼԻՈՓԻԼ ՉՈՐԱՑՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

## Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ կորնգանի և առվույտի պաղարարակտերիաներ աճեցման համար լավագույն սննդամիջավայրը հանքային աղերի, շարարատականքի և եգիպտացորենի քաշվածքի հեղուկ միջավայրն է:

Պաղարարակտերիաների լիոֆիլ շորացման համար, որպես պաշտպանիչ միջավայր նպատակահարմար է օգտագործել մելասայի (20%) և բենտոնիտի (30%) խառնուրդը:

Ինչպես ցույց են տվել ուսումնասիրությունները առվույտի պաղարարակտերիաները ավելի դիմակցուն են լիոֆիլ շորացմանը, քան կորնգանի պաղարարակտերիաները:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бородулина Ю. С. Тр. Ин-та микробиологии АН СССР, 11, 1961.
2. Бородулина Ю. С. и др. Биологический азот и его роль в земледелии. М., 1967.
3. Долинов К. Е. Основы технологии сухих препаратов. М., 1969.
4. Израильский В. П., Бородулина Ю. С. Тр. совещания по вопросам бактериальных удобрений. Киев, 1956.
5. Комерова Э. П. ДАН БССР, 11, 1021—1023, 1967.
6. Налбандян А. Д., Аветисян В. А. Биологический журнал Армении, 25, 3, 1972.
7. Панова С. П. Тр. ВНИИ с/х микробиологии, 15, 1958.
8. Юсупов К. А., Серебряков В. А. и др. Научные основы производства вакцины и сывороток. 79, М., 1965.
9. Appleman M. D., Sears O. N. J. Bact., 52, 209, 1946.
10. Fry R. M., Greaves R. J. N. J. Hyg. Camb., 49, 220, 1951.
11. Radulović Draginia, Krdžalić P., Krstić Vera. „Vet. glas“, 24, 6, 1970.