



Mērogošanas pētījums mikrobioloģisko mēslošanas un augu aizsardzības līdzekļu ieguvei dziļuma un virsmas kultivācijas procesos, nr. 1.1.1.1/19/A/150

Progresa pārskats par 8. ceturkšņa periodu 01.01.-31.03.2022.

Trichoderma spp. ieguve šķidrums virsmas kultivācijas procesā

Pārskata periodā realizētas 2 kultivācijas eksperimentu sērijas (barotnē, kurā iepriekš sasniegti labākie rādītāji) 3 statistiski novietotos nelielos traukos ar dažādiem sterilizācijas nosacījumiem, 2 pildījuma līmeņiem un 2 aerācijas līmeņiem. Pirmajā eksperimentu sērijā tika konstatēta nesterilitāte.

Trichoderma spp. ieguve dziļuma kultivācijas procesā

Pētītas pēcapstrādes pielietošanas metodes, lai uzlabotu bioreaktorā kultivētās *Trichoderma asperellum* biomasas dzīvotspēju un antifungālo aktivitāti:

- *T. asperellum* MSCL 309 tika kultivēta maisītā bioreaktorā. Iegūtā biomasu tika filtrēta, lai iegūtu biezu biomasu. *T. asperellum* biomasas paraugu dzīvotspēja un antifungālā aktivitāte noteikta vienlaikus, pētot iesala ekstrakta agara barotnes virsmas kolonizāciju un tās konkurētspēju ar augu patogēno sēni *Fusarium graminearum* in vitro eksperimentos. Apstrādāšana ar cieti atsevišķi vai kombinācijā ar vara (II) sulfātu un/vai sālsskābi būtiski neietekmēja sēņu dzīvotspēju, salīdzinot ar kontroli. Svarīgs faktors dzīvotspējas saglabāšanā bija sālsskābes pievienošana, kas būtiski pagarināja biomasas glabāšanas laiku. *T. asperellum* fermentācijas laikā izveidojās micēlijs un hlamidosporas, bet konīdijnesēji un konīdijas veidojās pirmajās divās pēcapstrādes perioda nedēļās. Visos pēcapstrādes variantos *F. graminearum* apauga ar *T. asperellum* septiņu dienu laikā, un attiecīgi, jo lielāks bija *T. asperellum* augšanas laukums, jo mazāks bija *F. graminearum* kolonizētais laukums. *T. asperellum* dzīvotspēja un antifungālā aktivitāte saglabājās visā eksperimenta laikā vismaz astoņas nedēļas. Visas pētītās pēcapstrādes metodes uzlaboja *T. asperellum* dzīvotspēju un antifungālo aktivitāti, vismaz kolonizētās virsmas laukuma ziņā. Ilgstoši dzīvotspējīgu un aktīvu *T. asperellum* preparātu izstrādei iesakām izmantot *T. asperellum* biomasas paskābināšanu, kas iegūta dziļuma fermentācijas ceļā.
- Lai noteiktu vai kartupeļu ciete pozitīvi ietekmē *T. asperellum* biomasu ne tikai pēc fermentācijas bet arī fermentācijas laikā, tika sagatavotas vairākas sastāvā atšķirīgas barotnes ar kartupeļu novārījumu vai sulu un cukuru vai glikozi. Esošās barotnes veicināja izteikti lielu biomasas iznākumu salīdzinot ar iepriekš testētajām barotnēm, tomēr antifungālās īpašības vai konīdijas netika novērotas. Vislielāko biomasas iznākumu varēja iegūt ar kartupeļu novārījuma barotni. Turpmāk plānots testēt kartupeļu novārījuma barotni mainot tā sastāvu. Kā arī tiks



I E G U L D Ī J U M S T A V Ā N Ā K O T N Ē

meklētas un pielietotas jaunas idejas eksperimentiem, kā fermentācijas laikā radīt vides stresu veicinot antifungālo īpašību veidošanos.

- Tika turpināti eksperimenti ar Tween 80, 0,2% koncentrācijā 4 dažādās barotnēs, lai noteiktu tā ietekmi uz biomasu un antifungālo aktivitāti to kultivējot 15 L reaktorā. Antifungālās īpašības netika novērotas, tomēr biomasas ražība bija lielāka, nekā kontroles variantos. Iegūtā biomasa bija sporulēt spējīga un uzglabājot plānā slānī veidoja konidijas. Pēc iestrādes kūdrā kvv skaita atšķirības starp kontroli un Tween paraugiem netika būtiski novērotas. Paraugi tika turpināti pārbaudīt katru mēnesi, lai noteiktu *Trichoderma spp.* dzīvotspēju kūdras vidē. Pēc 3 mēnešu ilgas uzglabāšanas kvv skaits būtiski nemainījās un joprojām ir saglabājis dzīvotspēju. Uzglabāšanas pētījums tiks veikts arī nākamos 9 un vairāk mēnešus, līdz tiks novērots kvv skaita būtisks samazinājums, tādējādi nosakot ilgtermiņā *Trichoderma spp.* dzīvotspēju pēc iestrādes kūdrā.
- Publikācija par tēmu “Application of a posttreatment to improve the viability and antifungal activity of *Trichoderma asperellum* biomass obtained in a bioreactor during submerged cultivation sagatavošana” tika sagatavota un iesniegta *Annals of Microbiology* žurnālā.

Trichoderma spp. ieguve virsmas (cietfāzes) kultivācijas procesā

Veikti eksperimenti periodiski rotējošā cietfāzes fermentācijas (SSF) procesā ar zirņu klijām pie dažādiem mitrināšanas līmeņiem ($W_{\text{tabs}}=1\text{g/g}$ un $W_{\text{tabs}}=0.73\text{g/g}$) ar 5.5kg zirņu pārstrādes masu abiem procesiem, kā arī fermentācijas process ar 5kg kviešu klijām ($W_{\text{tabs}}=0.8\text{g/g}$) un konstanta aerācijas ātrumu visos procesos caur substrātu 2 g/l min^{-1} . Process veikts ar gaisa mitrināšanu kolonnā pie termostatētiem 25°C ar piesātinātu ūdens tvaiku. SSF fermentācijās izmantotais rotācijas periods testēts ar aiztures laiku pirms sākuma 450 minūtes un periodisko rotāciju ik pa 30 minūtēm kopš aiztures laika. Turpmāk plānota procesa optimizācija un sterilitātes problēmu novēršana, procesa pilnveidošana veiksmīgas fermentācijas realizācijai un infekcijas iespējas samazināšanai fermentācijas laikā.

Bacillus spp. ieguve dziļumkultivācijas procesā

Tiek veiktas eksperimentu iterācijas ar izveidoto pamatbarotni un tās bagātinātajām variācijām ar mērķi noteikt barotnes receptūru ar augstāko sporu iznākumu, kā arī noteikt to ekonomisko potenciālu, aprēķinot iekļaujot to izmaksas. Salīdzinājuma veikšanai tiek izmantoti uzkrātie dati par optiskā blīvuma izmaiņām laikā, koloniju veidojošo vienību skaitu, t.sk. veģetatīvajām šūnām un sporām. Tiek turpināts darbs pie datu apstrādes un zinātniskā raksta manuskripta par iegūtajiem rezultātiem.

Realizēta 4 eksperimentu sērija 100 L pilota mēroga bioreaktorā, izmantojot industriālai ražošanai piemērota sastāva barotnes kandidātu, lai noskaidrotu šīs konkrētās barotnes potenciālu pielietošanai ražošanā. Trīs eksperimenti tika organizēti kā *fed-batch* (ar papildus substrāta piebarošanu) kultivācijas, lai novērtētu un savstarpēji salīdzinātu eksponenciāla un periodiska substrāta piebarošanas laika profila ietekmi uz šūnu un sporu biomasas iznākumu. Kultivāciju gaitā analizēta *B. subtilis* šūnu biomasas un sporu uzkrāšanās dinamika. Pēc 48 stundu kultivācijas, tika iegūts vidēji



I E G U L D Ī J U M S T A V Ā N Ā K O T N Ē

6.1-26.8*10⁸ KVV/ml un 0.6-1.6*10⁸ sporu/ml. Konkrētajos eksperimentos tieši eksponenciālais piebarošanas laika profils nodrošināja visaugstāko sporu iznākumu. Patreiz ir uzsākts darbs pie nākošās eksperimentu sērijas realizācijas, kurā tiks pārbaudīta iepriekšējos kolbu eksperimentos identificētā sastāva barotnes potenciāls pielietošanai ražošanas mērogā.

Veiktas 400 litru *Bacillus spp.* fermentācijas produkta dinamiskā šķērsplūsmas filtrācija ar 2mkm. Keramiskajām membrānām izmantojot *Novoflow NDF 2m²* filtru. Filtrācija tika veikta recirkulācijas un šķērsplūsmas variantā rezultātā iegūstot divas frakcijas, šķidro daļu ar fermentācijas galaprodukta šķīdumu un iekonzentrētu biomasu. Tālākie pētījumi būs noteikt sadalīto frakciju antifungālās īpašības un noteikt patogēnu apkarojošās īpašības abām šķīduma frakcijām.