



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 6. ceturkšņa periodu 01.10.-31.12.2021.

Trichoderma spp. ieguve šķidrums virsmas kultivācijas procesā

Pārskata periodā realizēti 3 kultivācijas eksperimenti 15-20 L mērogā ar maisīšanos un statiskos apstākļos. Kultivācijas veiktas barotnē ar cukuru, iesala ekstraktu un zirņu novārījumu. Šķidrums paraugiem dinamikā analizēta antifungālā aktivitāte un novērtēta sporu koncentrācija. Abos kultivācijas režīmos iegūtajam šķidrumam novēroja antifungālo ietekmi pret *Cladosporium herbarum* LMKK 276.

Trichoderma spp. ieguve dziļuma kultivācijas procesā

Pārskata periodā veikti 3 eksperimenti biomasas uzglabāšanai un apstrādei, lai iegūtu sauso sporu materiālu. Veikta kvalitātes pārbaude dažādi uzglabājamiem biomasas paraugiem. Pirmie rezultāti liecina, ka kartupeļu cietes pievienošana biomasai tās uzglabāšanas un žāvēšanas laikā veicina augstāku KVV iznākumu. Eksperimentos no uzglabātās un žāvētās biomasas iegūts pulveris ar 10^3 - 10^4 KVV/g. Turpināti pētījumi par Tween ietekmi uz *Trichoderma* morfoloģiju, biomasas iznākumu un antifungālajām īpašībām. Uzsākti pirmie eksperimenti, lai novērtētu 15 L reaktorā kultivētas *Trichoderma* biomasas kvalitāti pēc iestrādes kūdrā. Tika salīdzināta dažādu barotņu ietekme uz hifu spēju sporulēt kūdrā. Pirmajos 2 eksperimentos pierādījies, ka izvēloties cukura, rauga barotni un cukura, iesala, zirņu novārījuma barotni kūdrā esošā *Trichoderma* biomasā pirmajās 2 nedēļās pēc iestrādes kūdrā attīsta 10^3 - 10^5 KVV/g.

Trichoderma asperellum augšanas aktivitāte pie dažādām Tween koncentrācijām:

Tika noteiktas *T.asperellum* LMKK 309 morfoloģisko struktūru un sausās biomasas izmaiņas, audzējot to cukura-rauga ekstrakta barotnē ar dažādām Tween 20, 40 un 80 koncentrācijām, kā arī kultivēšanas šķidrums antifungālās iedarbības aktivitāte pret fitopatogēno sēni *Cladosporium herbarum* LMKK 276.

Eksperimenta gaitā sešās stāvkolbās ar cukura-rauga ekstrakta barotni tika ienesta *T.asperellum* suspensija. *T.asperellum* biomasas daudzuma izmaiņu konstatēšanai katru nākamo dienu kopš kultivēšanas sākuma (3 dienas) no katras kolbas tika noliets kultivēšanas šķidrums ar *T.asperellum* biomasu. Biomasas svara izmaiņas tika fiksētas. Papildus tika veikta *T. asperellum* biomasas mikroskopēšana.



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

Pēc iegūtā eksperimenta datiem varēja secināt, ka 48 stundu laikā sāka veidoties hlamidosporas, bet nevarēja novērot morfoloģiskas atšķirības starp paraugiem ar dažādām Tween 20, 40 un 80 koncentrācijām, kā arī neviens no paraugiem nevedoja inhibīcijas zonas pret fitopatogēno sēni, bet pēc 72 stundu kultivēšanas *T. asperellum* supernatants veidoja augšanas kavēšanas zonas pret fitopatogēnu pie zemām Tween 20 un 80 koncentrācijām. Vislielākais *T. asperellum* sausās biomasas iznākums tika sasniegts pie 1,5% un 2% Tween 20, 40 un 80 koncentrācijas.

Trichoderma spp. ieguve virsmas (cietfāzes) kultivācijas procesā

Veikti pirmie cietfāzes procesi (SSF) prototipa periodiski rotējošajā bioreaktorā ar kviešu klijām pie dažādām samitrināšanas pakāpēm ($Wt\%=64\%$, $Wt_{abs}=1.95\text{g/g}$, $Wt\%=59\%$, $Wt_{abs}=1.81\text{g/g}$ un $Wt\%=30\%$, $Wt_{abs}=0.91\text{g/g}$) ar sausā substrāta daudzumiem 3.3kg un 5.5kg un piespiedu mitrinātā gaisa cirkulāciju caur substrātu 2 g/l min^{-1} . Pārbaudīti dažādi periodiskās rotācijas režīmi cietfāzes fermentācijas laikā ar maisīšanas un apgriestās gaidīšanas periodiem atbilstoši ik pēc 45, 60 un 90 min kā arī apgriestā perioda ilgumu variējot no 1 – 5 min. Turpmāk plānoti tālākie eksperimenti cietfāzes kultivācijā izmantojot maisījumu ar zirņu un kviešu klijām, procesa optimizācija samazinot piesārņojuma iespējas un pilnveidojot protokolu cietfāzes fermentācijas veikšanai. Tiks izskatīti varianti substrāta tālākai apstrādei un žāvēšanai.

Bacillus spp. ieguve dziļumkultivācijas procesā

Tiek veikti eksperimenti ar literatūrā aprakstītām barotnēm ar augstu sporu iznākumu, lai veiktu ekonomiskā izdevīguma validāciju izveidotajām barotnēm, salīdzinot sporu iznākumus ar literatūrā aprakstīto barotņu sporu iznākumiem vienādos kultivācijas apstākļos. Salīdzinājuma veikšanai tiek izmantoti uzkrātie dati par optiskā blīvuma izmaiņām laikā, kolonijas veidojošo vienību skaitu, t.sk. veģetatīvajām šūnām un sporām. Tiek turpināts darbs pie zinātniskā raksta manuskripta par iegūtajiem rezultātiem, un ir iesniegtas tēzes par līdz šim veiktajiem eksperimentiem dalībai konferencē nākamā gada pavasarī.

Realizēta eksperimentu sērija 5 L laboratorijas mēroga bioreaktorā saskaņā ar Posada-Urbe *et al.* (DOI:10.1007/s00449-015-1428-1) un Carvalho *et al.* (DOI: 10.1590/S1516-89132010000300020) piedāvātajiem kultivācijas protokoliem un analizēta *B. subtilis* šūnu biomasas un sporu uzkrāšanās dinamika. Kultivācija Posada-Urbe *et al.* piedāvātajā barotnē tika realizēta ar papildus substrāta piebarošanu un procesa 49,5 stundā tika sasniegts augsts šūnu biomasas rezultāts – $1,50 \cdot 10^{10}$ KVV/ml. Realizējot kultivāciju Carvalho *et al.* piedāvātajā barotnē, tika novērota ļoti ilga (~24h) adaptācijas fāze, kurā šūnu augšana nenotika. Minētajos kultivācijas procesos tika pielietoti arī vides duļķainības un dielektriskās spektroskopijas tiešsaistes sensori, kuri sniedz detalizētāku informāciju par šūnu augšanu un sporu veidošanos, kā arī ģenerē vērtīgus datus dziļākai procesa izpratnei un modelēšanai.

Apkopoti *B. subtilis* kultivācijas mērogošanas parametri.