

А. Д. Налбандян, И. О. Карапетян,
Э. М. Григорян

ПОЛУЧЕНИЕ СУХОГО НИТРАГИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕНТОНИТОВ И ДИАТОМИТОВ

В настоящее время в сельскохозяйственной практике для инокуляции бобовых растений применяют почвенный, торфяной и сухой нитрагин. Изготовление почвенного нитрагина имеет ряд недостатков: требует в больших количествах стеклянную тару, трудно длительно сохранять высокий титр клубеньковых бактерий, процесс механизированной обработки семян бобовых растений, сложный, препарат нетранспортабелен и др. (Доросинский, 1970; Бородулина и др., 1974).

В последние годы широкое применение в микробиологии получил метод лиофилизации клубеньковых бактерий. Работами многих исследователей показана возможность изготовления сухого нитрагина, лишенного недостатков, присущих почвенному нитрагину (Голдовский, 1963; Гаматова-Главичкова, 1964; Бородулина и др., 1967, 1971; Налбандян и др. 1971; Аветисян, Налбандян, 1973). Однако с экономической точки зрения сухой нитрагин обходится дорого. С целью удешевления его себестоимости нами в качестве носителя биомассы клубеньковых бактерий использовались бентониты и диатомиты, прямое смешивание которых с биомассой исключает необходимость лиофильной сушки.

Материал и методика исследований

Объектом исследований служили местные активные штаммы клубеньковых бактерий гороха (NN 23, 144), люцерны (NN 21, 132).

Усвоение клубеньковыми бактериями различных форм углерода и минерального азота определялось ауксонографически, а титр клеток — методом последовательных разведений.

Клетки клубеньковых бактерий из культуральной жидкости осаждались 3% бентонитом в 1,44 н. растворе NaCl и без него, а также 0,03% диатомитом в 3% растворе CaCl₂. Обработка хлористым натрием способствует расширению перегородок частиц бентонита, чем и увеличивает его адсорбционную поверхность (Гриссбах, 1963). Осажденная биомасса клубеньковых бактерий смешивалась с бентонитом или диатомитом. Состав среды для культивирования изученных штаммов опубликован нами ранее (Налбандян и др., 1973).

Характеристика бентонитов и диатомитов Армянской ССР. Бентониты — коллоидные глины, состоящие в основном из минералов группы монтмориллонита $Al_2[(SiO_4, O_{10})](OH)_2 \cdot nH_2O$. Бентонитовые глины отличаются микроскопически малыми размерами элементарных частиц, высоким содержанием воды, резко выраженными адсорбционными свойствами и высокой пластичностью.

Диатомит — горная инфузорная земля, рыхлая или слабо сцементированная, светло-серого или желтоватого цвета. Обладает способностью к адсорбции, кислотоустойчив, содержит 60–78% кремнезема, 9,5–15,5% глинозема. Химический состав (в %): SiO₂ — 74–78, Al₂O₃ — 10–13, Fe₂O₃ — 3–5, MgO — 1–1,5.

Результаты исследований

С целью разработки оптимальной среды для культивирования клубеньковых бактерий испытывали различные источники углерода (моно- и дисахариды, мелассу, полисахариды, спирты) и азота (аммонийные, нитратные). Из указанных источников углерода клубеньковые бактерии люцерны и гороха хорошо усваивали углеводы, за исключением сорбозы, хуже — полисахариды и спирты. Наилучшими источниками углерода оказались сахароза и меласса. Из источников азота аммонийные формы азота (NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃) усваивали лучше, чем нитратные.

Дробное внесение мелассы и кукурузного экстракта способствует улучшению питания и повышению титра клеток клубеньковых бактерий гороха в 3 раза и люцерны — в 2 раза (табл 1).

Для быстрого осаждения клубеньковых бактерий из культуральной жидкости были использованы бентонит и диатомит.

Клетки осажденные бентонитом в растворе NaCl и в присутствии 3–5% CaCl_2 , дают более плотный осадок, чем клетки, осажденные только бентонитом. Наличие CaCl_2 ускоряет осаждение и при этом увеличивает количество осажденных клеток до 50–60% (табл. 2).

Хорошим осадителем клеток клубеньковых бактерий является также диатомит.

Если к культуральной жидкости добавить 0,03% диатомита и 3% CaCl_2 , то клетки осаждаются в течение 5–20 мин, в то время как без CaCl_2 – в течение 120 мин (табл. 3). Скорость осаждения клеток клубеньковых бактерий из культуральной жидкости, обработанной бентонитом и диатомитом, зависит от ее вязкости.

На основании приведенных в табл. 2 и 3 данных можно отметить, что диатомит является лучшим осадителем клеток клубеньковых бактерий, чем бентонит.

Для получения сухих препаратов клубеньковых бактерий их биомассу смешивали с бентонитом или диатомитом в соотношении 1 : 10. С целью создания благоприятных условий в препарат вносили 1% мелассы.

Из данных табл. 4 видно, что влажность препарата зависит от вида использованного носителя, вида и штамма клубеньковых бактерий. Исследования показали, что первоначальный титр клеток в препарате зависит от титра биомассы клубеньковых бактерий. Готовый препарат переносили в стеклянную тару и полиэтиленовые мешки и хранили при 3–5° и 18–20°.

Как показывают данные табл. 5, титр клеток клубеньковых бактерий, хранившихся в течение 5 месяцев в стеклянной таре, значительно выше, чем при хранении в полиэтиленовых мешках. Низкие температуры (3–5°) более благоприятны для сохранения клеток, чем высокие (18–20°). Лучше сохраняются клетки при использовании диатомита с мелассой. Степень выживаемости клеток бактерий в процессе хранения зависит также от штамма. Титр клеток клубеньковых бактерий люцерны, штамм №21 в бентонитовом препарате при 18–20° в 1,5–2 раза выше, чем у штамма №132. В тех же условиях штамм клубеньковых бактерий гороха №23 сохранился лучше, штамм №144.

Через 3 месяца количество выживших клеток клубеньковых

Таблица 1

Количество клеток клубеньковых бактерий
при культивировании на различных средах
(количество клеток, млрд./мл)

Среды	Клубеньковые бактерии							
	гороха				люцерны			
	штамм 23	штамм 144	штамм 21	штамм 132	штамм 23	штамм 144	штамм 21	штамм 132
	Время культивирования (час)							
	24	48	24	48	24	48	24	48
Минеральные соли + 1% мелассы + 0,3% кукурузного экстракта	5,6	4,3	3,6	2,1	10,0	8,5	9,7	8,2
Минеральные соли + 2% мелассы + 0,3% кукурузного экстракта	4,1	4,8	4,1	2,7	8,2	10,1	12,0	8,7
Минеральные соли + 1% мелассы + 0,3% кукурузного экстракта + (через 24 часа) 1% мелассы + 0,3% кукурузного экстракта	6,2	14,8	3,1	13,7	9,3	15,1	10,3	18,0

Таблица 2
Осаждение клеток клубеньковых бактерий с помощью бентонита

Виды и штаммы клубеньковых бактерий	Варианты опыта	Скорость осаждения	Кол-во надоса- дочной жидкос- ти, мл	Вес осадка, г	Кол-во клеток в надоса- дочной жид- кости, млрд/мл	Кол-во клеток в осадке, млрд/г
гороха 23	бентонит	24 часа	12	13,7	2,6	9,0
	бентонит + CaCl_2	90 мин	35	22,2	0,77	13,0
	бентонит + NaCl	95 -"	48,	11,8	0,66	11,0
144	бентонит + CaCl_2	24 часа	27	8,8	2,2	9,6
	бентонит + CaCl_2	190 мин	40	15,6	1,0	11,0
	бентонит + NaCl	180 -"	48	7,45	0,11	9,2
люпер-ны 21	бентонит + CaCl_2	24 часа	16	8,0	6,9	8,0
	бентонит + CaCl_2	55 мин	26	34,4	0,45	11,0
	бентонит + NaCl	15 -"	40	19,7	0,23	11,0
132	бентонит + CaCl_2	24 часа	24	10,0	6,7	8,2
	бентонит + CaCl_2	85 мин	48	28,1	0,35	12,0
	бентонит + NaCl	90 -"	64	12,2	0,28	12,1

Таблица 3
Осаждение клеток клубеньковых бактерий с помощью диатомита

Виды, штаммы клубеньковых бактерий	Варианты опыта	Скорость осаждения, мин	Кол-во напоса- дочной жидкос- ти, мл	Вес осадка, г	Кол-во клеток в напоса- дочной жид- кости млрд/мл	Кол-во клеток в осадке, млрд/г
гороха 23	Диатомит	120	48	1,81	1,4	39,0
	Диатомит + CaCl_2	20	48	1,45	0,12	43,0
144	Диатомит	120	42	1,18	1,2	47,0
	Диатомит + CaCl_2	20	48	1,0	0,75	45,0
люцер- 21	Диатомит	120	47	1,39	0,08	75,5
ны	Диатомит + CaCl_2	5	48	1,64	0,2	73,0
132	Диатомит	120-	45	1,61	0,12	55,0
	Диатомит + CaCl_2	10	46	1,58	0,12	28,0

Титр клеток и влажность препарата при смешивании клубеньковых бактерий с бентонитом и диатомитом (количество клеток, млрд/г, влажность, %)

Варианты опыта	Клубеньковые бактерии							
	гороха				люцерны			
	штамм 23	штамм 144)	штамм 21	штамм 132	штамм 23	штамм 144)	штамм 21	штамм 132
	влажность	титр	влажность	титр	влажность	титр	влажность	титр
Биомасса + бентонит	9,8	20,1	9,4	20,3	11,5	10,9	13,1	20,1
Биомасса + бентонит + + меласса	11,9	17,8	11,8	21,7	11,3	12,5	10,2	21,5
Биомасса + диатомит	7,6	18,4	14,8	16,9	13,9	19,3	15,5	21,0
Биомасса + диатомит + + меласса	11,0	17,9	12,9	16,8	13,5	20,2	13,8	19,1

Таблица 5

Влияние различных условий хранения на выживаемость
клубеньковых бактерий (количество клеток, млрд/г,
влажность, %)

Виды, штам- мы клу- бенько- вых бак- терий	Вариан- ты опы- та	3 - 5°				18 - 20°			
		В стеклян- ной таре		В полимер- ных мешках		В стек- ляной таре		В полимер- ных мешках	
		влаж- ность	титр	влаж- ность	титр	влаж- ность	титр	влаж- ность	титр
гороха №23	Биомасса	8,5	7,7	8,0	6,9	8,8	7,2	8,8	5,4
	+ бентонит	10,5	8,7	10,1	8,3	10,0	3,5	10,7	3,4
	Биомасса+ бентонит + меласса	7,9	2,1	7,0	1,8	7,2	1,8	4,8	4,4
	+ диатомит	7,2	8,2	10,0	2,3	11,8	5,3	4,6	2,2
	Биомасса+ диатомит+ меласса	9,0	8,8	-	-	8,8	4,5	-	-
№144	Биомасса+ бентонит	8,2	5,1	-	-	7,8	7,1	-	-
	+ бентонит+ меласса	5,0	2,2	9,5	1,3	4,0	6,0	5,1	5,0
	Биомасса+ диатомит	11,8	1,3	8,8	2,0	7,3	8,7	6,9	1,8
	Биомасса+ диатомит+ меласса	9,9	7,9	9,2	5,7	10,9	7,1	9,3	4,2
	Биомасса+ бентонит	12,4	9,9	10,2	7,7	10,1	8,7	9,3	6,2
люцер- ны №21	Биомасса+ бентонит+ меласса	6,0	1,4	6,5	1,0	3,3	1,9	2,8	0,43
	Биомасса+ диатомит	5,3	2,8	5,4	3,0	3,3	6,1	-	4,4
	Биомасса+ диатомит+ меласса	13,1	15,0	-	-	12,1	3,1	-	-
	Биомасса+ бентонит	11,1	9,1	-	-	10,1	8,7	-	-
	Биомасса+ бентонит+ меласса	6,7	6,8	6,4	6,8	7,5	7,5	4,9	6,3
№132	Биомасса+ диатомит	8,7	3,5	-	6,3	4,8	4,6	5,8	8,2
	Биомасса+ диатомит+ меласса								

Примечание: (-) - отсутствие данных.

бактерий гороха и люцерны составляло 25–50% от исходного. Несмотря на то, что количество клеток за указанный срок значительно уменьшилось, оно удовлетворяет норму клубеньковых бактерий в препарате для инокуляции бобовых растений.

Полученными сухими препаратами клубеньковых бактерий можно произвести механизированную обработку семян бобовых растений, при этом диатомитовый препарат лучше обволакивает семена, чем бентонитовый.

Выводы

1. Разработана оптимальная среда для культивирования клубеньковых бактерий гороха и люцерны. Дробное внесение мелассы и кукурузного экстракта в питательную среду значительно повышает титр клеток.

2. Для быстрого осаждения клеток клубеньковых бактерий гороха и люцерны предлагается использовать 3% бентонита в растворе NaCl и 0,03% диатомита в растворе CaCl_2 .

3. С целью получения сухого нитрагина рекомендуется смешивать биомассу клубеньковых бактерий гороха и люцерны с бентонитом или диатомитом в соотношении 1 : 10, с внесением 1% мелассы.

Ա. Ձ. Նալբանդյան, Ի. Հ. Կարապետյան, Է. Մ. Գրիգորյան

ԶՈՐ ՆԻՏՐԱԳԻՆԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԲԵՆՏՈՆԻՏՆԵՐԻ ԵՎ
ԴԻԱՏՈՄԻՏՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Ուսումնասիրված է տեղական բենտոնիտների և դիատոմիտների օգտագործման հնարավորությունը որպես լցանյութ (լցուկ) նիտրագինի ստացման համար: Ոլոռի և առվույտի պալարաբակտերիաների աճեցման համար մշակված է օպտիմալ սննդամիջավայր: Պարզվել է, որ մեկասի և եգիպտացորենի էքստրակտի աստիճանական ավելացումը սննդամիջավայրին նկատելիորեն մեծացնում է պալարաբակտերիաների տիտրը: Առաջարկվում է չոր նիտրագինի ստացման համար օգտագործել պալարաբակտերիաների կենսազանգվածի և բենտոնիտի կամ դիատոմիտի խառնուրդը 1 : 10 հարաբերությամբ, ավելացնելով 1% մեկաս:

Հոդվածում նաև բերված են տվյալներ պալարաբակտերիաների բջիջների նստեցման համար բենտոնիտների և դիատոմիտների կիրառման հնարավորության վերաբերյալ:

ЛИТЕРАТУРА

- Аветисян В. А., Налбандян А. Д. 1973. Биол. журнал Армении, 26, 1.
- Бородулина Ю. С., Кронгауз Е. А., Голод Б. И. 1974. Успехи микробиологии, в. 9.
- Бородулина Ю. С., Самсонова С. П., Анискина З. Н., Кронгауз Е. А., Гандман М. Г., Скорикова З. А., Федоров Н. К., Веренко В. Д., Довгань Т. П. 1967. В сб.: "Биологический" азот и его роль в земледелии. М., "Наука".
- Бородулина Ю. С., Самсонова С. П., Кронгауз Е. А., Анискина З. Н., Шмырева Т. В. 1971. В сб.: Новое в изучении биологической фиксации атмосферного азота. М., "Наука".
- Гаматова-Главачкова Е. 1964. В сб.: Бактериальные удобрения. М., "Колос".
- Гекакина Е. В., Кронгауз Е. А., Петрушенко О. П., Присягина М. Г., Шмырева Т. В., Краснополянская В. С., Пласкина Т. Б., Желнова Г. С., Белова Р. Н., Яровенко М. Л. 1975. Тезисы докл. Уезда ВМО (секц. с.-х. микробиологии). Ереван.
- Годдовский А. М. 1963. Общая биология, 24, 2.
- Гриссбах Р. 1963. Теория и практика ионного обмена. М.
- Доросинский Л. М. 1965. Бактериальные удобрения - дополнительное средство повышения урожая. М., Россельхозиздат.
- Доросинский Л. М. 1970. Клубеньковые бактерии и нитрагин. М., "Колос".
- Зак Г. А., Марковская М. П. 1967. В сб.: Всесоюз. НИИ с.-х. микробиологии.
- Колесов С. Г. 1959. Анабиоз патогенных микроорганизмов. М.
- Кронгауз Е. А., Присягина М. Г., Монакова Н. И. 1967. В сб.: Всесоюз. НИИ с.-х. микробиологии.
- Мишустин Е. Н., Шильникова В. К. 1968. Биологическая фиксация атмосферного азота. М., "Наука".
- Налбандян А. Д., Аветисян В. А., Меликсетян Р. Г. 1971. Биол. журнал Армении, 24, 3.
- Налбандян А. Д., Аветисян В. А., Саркисян Т. У. 1973. В сб.: Вопр. микробиол. (биологическая фиксация атмосферного азота), в. 6 (16). Изд. АН Арм. ССР.