

о нуклеотидном составе ДНК у различных видов рода *Rhizobium*. Высокий уровень гомологии ДНК обнаруживается у различных штаммов клубеньковых бактерий арахиса (86—100%), причем в генетическом отношении этот вид отдален от клубеньковых бактерий гороха (обнаружено 10—15% общих гомологичных последовательностей в ДНК).

Определенное генетическое родство, не выходящее за рамки вида, прослеживается у 3 штаммов клубеньковых бактерий гороха (70—100%). Интересно отметить, что определение размера генома у 4 штаммов клубеньковых бактерий арахиса выявляет близкие значения молекулярной массы их ДНК: штаммы 6091, 6092, 6093 и 6094 в расчете на один нуклеотид имеют следующие молекулярные массы ДНК (в дальтонах): $1,6 \times 10^9$; $1,8 \times 10^9$; $1,9 \times 10^9$; $1,5 \times 10^9$ соответственно.

Таким образом, на основании изучения геномной характеристики культур выявлено близкое генетическое родство у 4 штаммов клубеньковых бактерий арахиса и 3 штаммов клубеньковых бактерий гороха, не выходящее за рамки одного вида, причем в генетическом отношении вид клубеньковых бактерий арахиса удален от клубеньковых бактерий гороха.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grox V. L., Jarvis B. D. W., Urtenwood R. M. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31, 2, 152—172, 1981.
2. De Ley J., Carroir H., Reynaerts A. *Eur. J. Biochem.*, 12, 133—142, 1970.
3. Gerald H., Etkan, Usanis R. A. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 21, 4, 295—298, 1971.
4. Huber Thomas A., Agarwal Arun K., Keister D. L. *J. Bacteriol.*, 158, 3, 1168—1171, 1981.
5. Jarvis B. D. W., Dick A. G., Greenwood R. M. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 1, 41—52, 1980.
6. Marmur I. *Mol. Biol.*, 3, 208—218, 1961.
7. Owen R. J., Hill L. R., Lapage S. P. *Biopolymers*, 7, 5, 3, 1969.

Поступило 4.VI 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 2, 1988

УДК 579.64.631

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТИВНЫХ ФОРМ НИТРАГИНА

А. Д. НАЛБАНДЯН, В. А. АВЕТИСЯН

Нитрагин—клубеньковые бактерии—бектониг.

Нитрагинизация бобовых растений применяется во многих странах мира.

В СССР чистый доход от применения нитрагина составляет в среднем 30—50 рублей, а для сои в новых районах ее возделывания—до 150—200 рублей на гектар [5].

В настоящее время в мире выпускается около 60 товарных форм препаратов для нитрагинизации бобовых растений, в виде чистых культур клубеньковых бактерий, смеси их с субстратами-носителями (поч-

ва, торф, почва—торф и др.), обезвоженной биомассы клубеньковых бактерий и т. д.

Установлено, что метод приготовления торфяного нитрагина (ризоторфина) непосредственным инокулированием клубеньковыми бактериями стерильного торфа в пакетах позволяет получить препарат более высокого качества, чем при использовании нестерильного торфа [4].

Ряд авторов, разрабатывая вопросы технологии производства сухих препаратов нитрагина, показали большое значение технологических свойств активных штаммов клубеньковых бактерий, а также условий их ферментации. Предложена принципиальная технологическая схема производства торфяного нитрагина (ризоторфина) [6].

Цель настоящего исследования состояла в разработке способов изготовления агарового, торфяного и сухого нитрагина на основе местных штаммов клубеньковых бактерий с использованием местного сырья.

Агаровый нитрагин. Для приготовления агарового нитрагина клубеньковые бактерии гороха, люцерны, эспарцета и фасоли выращивали в пробирках на агаризованной среде из горохового экстракта, содержащей 1% сахарозы, а для клубеньковых бактерий сои—1% маппита. Культуры выращивали при 26—28° в течение 2—4 суток при использовании клубеньковых бактерий гороха, люцерны, эспарцета, фасоли в 5—7 суток при использовании клубеньковых бактерий сои.

Семена бобовых перед посевом обрабатывали водной суспензией, содержащей от 2 до 3 млрд клеток/мл.

Сухой (лиофилизированный) нитрагин. Культуры клубеньковых бактерий гороха, фасоли, люцерны и эспарцета выращивали на жидкой питательной среде следующего состава (%): меласса (содержание сахарозы не менее 45%)—1, кукурузный экстракт—0,3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,05, K_2HPO_4 —0,05, NaCl —0,02, MgSO_4 —0,02, pH—7—7,2. Культивирование проводили на качалке (200—240 об/мин) в течение 48 часов. Спустя 24 ч в среду дополнительно вносили следующие компоненты (%): мелассу—1, кукурузный экстракт—0,3.

Через 48 ч в 1 л среды накапливалось 15—18 г биомассы, осажденной на центрифуге при 10 тыс. об/мин в течение 10—15 мин. Титр клубеньковых бактерий гороха и фасоли в биомассе составлял 13—15 млрд/г, а клубеньковых бактерий люцерны и эспарцета—17—18 млрд/г.

Перед замораживанием биомассу смешивали со следующими защитными средами (%): мелассой—20; мелассой—20 и молоком—1 объем; мелассой—20 и бентонитом—30; мелассой 20, молоком—1 объем и бентонитом—30.

При смешивании биомассы, имеющей влажность 75—80%, с указанными защитными средами относительная влажность полученного материала бывает различной. Так, после смешивания с мелассой она составляет 68%, а при смешивании с мелассой и бентонитом (20% + 30%)—55—56%. Снижение относительной влажности пасты позволяет осуществить лиофилизацию клубеньковых бактерий за более короткое время.

Биомассу после тщательного перемешивания с защитной средой вносили во флаконы с высотой слоя в 1 см. Пасту предварительно замораживали в смеси сухого льда с изопропиловым спиртом при 75—80° в течение 1 часа. При таком способе замораживания процент гибели клеток клубеньковых бактерий бывает незначительным. Высушивание материала в зависимости от защитной среды завершалось в течение 8—12 часов. Полученный порошок, содержащий клетки клубеньковых бактерий, смешивали с бентонитом с таким расчетом, чтобы 100 г бентонита содержали 250—300 млрд клеток этих бактерий. Препарат хорошо сохраняет активность в течение 6—9 месяцев [1, 2, 3].

Торфяной нитрагин. Для получения торфяного нитрагина клубеньковые бактерии выращивали в колбах при 26° в течение 48—72 ч на питательной среде следующего состава (%): меласса—2, дрожжевой экстракт—0,3 (NH₄)₂SO₄—0,05, NaCl—0,02, K₂HPO₄—0,05, MgSO₄—0,02, pH 7,0—7,2. Затем содержимое колб переносили в ферментер, содержащий среду такого же состава. Коэффициент заполнения ферментера—0,6. В ферментер вносили 1,2 л посевного материала. Стерилизацию среды в ферментере осуществляли подачей пара (135°) в рубашку ферментера в течение 1,5 часа. Аэрирование—0,7—1,0 г/л, мешалка—300 об/мин. Продолжительность ферментации—48 ч при 26—28°. Титр клеток клубеньковых бактерий в культуральной жидкости спустя 48 ч составлял 16,2 млрд/мл.

Полиэтиленовые мешочки с измельченным торфом (Варденинское месторождение) по 100 г в каждом герметически закрывались и стерилизовались гамма-лучами (кобальт 60) при дозе 5 Мрад.

Ввод культуральной жидкости (5 мл) в мешочки, наполненные торфом, имеющим 45—50% влажности, осуществляли с помощью шприца. На 1 г торфа введено 800 млн клеток клубеньковых бактерий. Инкубированные мешочки помещали в термостат при 26—28° на 10 дней, после чего титр клубеньковых бактерий в препарате составлял 1,5—2 млрд в грамме торфа.

Торфяной нитрагин изготовлен на основе клубеньковых бактерий эспарцета, сои и гороха.

Препарат сохраняет активность в течение 6 месяцев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисян В. А., Налбандян А. Д. Биолог. ж. Армении, 26, 2, 47—50, 1973.
2. Налбандян А. Д., Аветисян В. А., Меликсетян Р. Г. Биолог. ж. Армении, 24, 3, 24—29, 1971.
3. Налбандян А. Д., Аветисян В. А., Меликсетян Р. Г. Вопросы микробиологии, 6 (16), 99—110, Ереван, 1973.
4. Хотякович А. В., Позднякова А. И., Амстердамская Н. Ю. Тр. ВИИИ с.-х. микробиологии, 17, 111—115, 1978.
5. Хотякович А. В., Позднякова А. И., Амстердамская Н. Ю. Тр. ВИИИ с.-х. микробиологии, 50, 30—39, 1980.
6. Чкалина Е. В., Фаизова Г. К., Чудинова А. И. В сб. Микробиологические средства защиты растений и бактериальные препараты 1, 81—86. М., 1978.

Поступило 20.1 1987 г.