

Ж. С. МЕЛКОНЯН, А. В. КИРАКОСЯН, М. М. КАРАПЕТЯН

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ АЗОТОБАКТЕРА ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Видовой характеристикой азотобактера занимались многие отечественные и зарубежные ученые. Вначале эти исследования относились только к культурально-морфологическим и физиологическим изучением. В дальнейшем, выделение новых культур требовало применения более глубоких и убедительных методов для изучения организмов. Для более точной классификации видов азотобактера исследователи предлагали разные методы.

Каллао и Монтоя [4] испытывали влияние некоторых красок на рост нескольких культур *Az. chroococcum*, *Az. agile*, *Az. vinelandii* и *Az. beijerinckii*. В результате этих работ авторы разграничили четыре вида азотобактера. Моррис [8] при изучении антигенной структуры азотобактера заметил родство между *Az. agile*, *Az. insigne* и *Az. macrocytogenes*.

Джонстон [5, 6], Джонстон и Фишбейн [7] в качестве одного из методов распознавания видов азотобактера предложили флуорометрический метод. Иногда, судя только по внешнему зеленому пигменту, *Az. vinelandii* принимали за *Az. agile*. Культуры *Az. vinelandii* и *Az. agile* образуют водорастворимый зеленый пигмент, который у *Az. agile* при ультрафиолетовом облучении флуоресцирует белым цветом, а у *Az. vinelandii* — зеленым. Даже штамм *Az. agile*, образующий видимый темно-коричневый пигмент, флуоресцировал подобно зеленым штаммам белым цветом. Белую флуоресценцию Джонстон [6] наблюдал и у *Az. macrocytogenes*, хотя сам автор и другие исследователи рассматривают эту культуру как отдельный от *Az. agile* вид.

В качестве питательной среды для культур азотобактера Джонстон и Фишбейн [7] использовали среду Бэрк с 2% глюкозой. Для выяснения влияния железа и молибдена на накопление флуоресцирующих веществ, авторы испытали их различные концентрации и варианты. Оказалось, что молибден способствовал увеличению интенсивности флуоресценции, а железо в больших концентрациях подавляло. Культивирование азотобактера проводилось в условиях аэрирования. Испытанием серии буферных растворов с различными рН установлено, что наибольшая интенсивность флуоресценции культурального фильтрата наблюдается при рН 7,0—7,3.

Имея большую коллекцию культур *Az. agile* и *Az. nigricans*, сходных по водорастворимому пигменту, выделенных из почв АрмССР, мы решили воспользоваться методом, предложенным Джонстоном. Помимо

местных культур в нашем распоряжении находились коллекционные культуры *Az. agile* и *Az. vinelandii*, полученные из разных мест.

Культуры азотобактера выращивали в жидкой среде Бэрк [3] с 2% глюкозой, куда добавляли  $\text{CaCO}_3$  (0,33%) и молибден (0,1% из 0,5% раствора молибденовокислого аммония). Большинство испытуемых культур параллельно культивировались и на жидкой среде Виноградского. Результаты на обеих средах были аналогичны. Ввиду того, что многие местные культуры росли медленнее и пигментировали не одновременно, то и сроки культивирования в наших опытах были разные. Для получения оптимального свечения флуоресцирующих веществ, нами использован фосфатный буфер, установленный на pH 7,3 (предложенный Джонстоном [6]). Буфер по 10 мл разливали в опытные пробирки из нефлуоресцирующего стекла, добавляли 0,5 мл культурального фильтрата, кипятили в водяной бане 2 мин., охлаждали до комнатной температуры и непосредственно наблюдали флуоресценцию с помощью аппарата для флуоресцентного анализа витаминов в растворах — модель 833.

На культурах *Az. agile jakutiae* и *Az. vinelandii* испытано влияние некоторых факторов на образование флуоресцирующих веществ (табл. 1). Испытаны различные источники кальция, разные концентрации железа, условия и сроки культивирования. В среду Бэрк в качестве источника кальция в одном случае внесли  $\text{CaCl}_2$ —0,1%, в другом —  $\text{CaCO}_3$ —0,33%. Как видно из данных таблицы, культура *Az. vinelandii* не выросла на среде с  $\text{CaCl}_2$ , поэтому в последующих опытах мы использовали только  $\text{CaCO}_3$ . Железо, внесенное в среду в количестве 0,1% и 0,01% (из 0,5% раствора  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), соответствовало концентрациям, использованным Джонстоном. Анализы показали (табл. 1), что интенсивность флуоресценции у культур азотобактера при концентрации железа 0,01% выше, чем при концентрации 0,1%. В дальнейшем в среду Бэрк вносили железо 0,01%. Сравнивая условия глубинного выращивания культур азотобактера с поверхностным, видим, что для накопления флуоресцирующих веществ аэрация в наших опытах особой роли не играет, поэтому последующие испытания проводили в условиях покоя. Испытание различных сроков культивирования выяснило, что интенсивность свечения на 15 сутки больше, чем на 7.

После установления влияния некоторых факторов на интенсивность образования флуоресцирующих веществ, мы решили испытать некоторые коллекционные культуры *Az. agile* и *Az. vinelandii*.

Из данных табл. 2 видно, что все приведенные культуры *Az. agile*, в том числе и *Az. macrocytogenes*, флуоресцировали белым цветом различной интенсивности. Нашими предыдущими исследованиями [1] выяснено, что *Az. macrocytogenes* по своим культурно-морфологическим и физиологическим свойствам полностью идентичен с *Az. agile jakutiae*. А. И. Рубенчик [2] *Az. macrocytogenes* относит к роду *Belferinkia* Derx. Флуоресцентный анализ доказал правильность нашего вывода, что *Az. macrocytogenes* относится к виду *Az. agile*. Результаты исследований Джонстона [6] и Норриса [8] подтверждают наши дан-

Таблица 1

Влияние различных факторов на образование флуоресцирующих веществ у культур азотобактера

Вид азотобактера	Различные источники Са в %	Количество FeSO <sub>4</sub> в %	Количество культуральной жидкости в мл	Глубинное культивирование		Поверхностное культивирование	
				7 суток	7 суток	7 суток	15 суток
Белое свечение							
Az. agile Jakubiae ИИММ	CaCl <sub>2</sub> -0,1	0,1	0,5	+++	+++	+++	
	CaCl <sub>2</sub> -0,1	0,01	0,2 0,5 1,0	+++ +++ +++++	+++ +++ +++	+++	+++
	CaCO <sub>3</sub> -0,33	0,1	0,5	+++	+++	+++	+++
	CaCO <sub>3</sub> -0,33	0,01	0,2 0,5 1,0	+++ +++ +++++	+++ +++ +++		+++
Зеленое свечение							
Az. vinelandii ИИММ	CaCl <sub>2</sub> -0,1	0,1	0,5	роста нет	роста нет	роста нет	
	CaCl <sub>2</sub> -0,1	0,01	0,5	роста нет	роста нет	роста нет	
	CaCO <sub>3</sub> -0,33	0,1	0,5	+++	+++	+++	
	CaCO <sub>3</sub> -0,33	0,01	0,2 0,5 1,0	+++ +++ +++++	+++ +++ +++		+++
Контроль-среда			0,5	свечения нет	свечения нет	свечения нет	

Примечание: в данной и последующих таблицах интенсивность свечения обозначена по пятибалльной системе.

ные о видовой принадлежности этой культуры, несмотря на сомнения ввтором в этом вопросе.

Три культуры: Az. vinelandii И-1, Az. vinelandii ЗМ и Az. vinelandii 1 (Ленинград), полученные нами в качестве вида Az. agile культурально и морфологически [1] представляют собой типичные Az. vinelandii. Данные табл. 2 подтвердили это мнение зеленым свечением флуоресцирующих веществ вышеуказанных культур.

Наши исследования [1] с Az. agile 22-Д показали, что эта культура сходна с Az. vinelandii. Однако флуоресцентный анализ показал, что

Таблица 2

Образование флуоресцирующих веществ у коллекционных культур *Az. agilis* и *Az. vinelandii*

Культуры	Пигментация культуральной жидкости в колбах	Срок культивирования	Белое свечение	Культуры	Пигментация культуральной жидкости в колбах	Срок культивирования	Зеленое свечение
<i>Az. agilis</i> дельфтский (из Польши)	зеленая	7	++++	<i>Az. vinelandii</i> ИИМИ	зеленая	7	++++
	грязно-зеленая	17	++++			17	++++
<i>Az. agilis</i> jakutae ИИМИ	буровато-кремовая	7	+++	<i>Az. vinelandii</i> (Ин-т Пастера, Париж)	зеленая	7	+++
		17	++++	<i>Az. vinelandii</i> П-1 (Минск)	зеленая	7	++
<i>Az. macrocytogenes</i> Jensen (оригинал)	буровато-кремовая	7	+++	<i>Az. vinelandii</i> З М (Минск)	зеленая	7	+++
		17	++++	<i>Az. vinelandii</i> 1 (Ленинград)	кремовая	7	+++
<i>Az. agilis</i> 22-Д МГУ	кремовая	7	++	<i>Az. vinelandii</i> 1 сух. (из Грузии)	зеленая	7	++++
		15	+++	<i>Az. vinelandii</i> 2 сух. (из Грузии)	зеленая	7	++++

Контроль-среда

Свечения нет

культуральный фильтрат *Az. agile* 22-Д светил белым цветом. Этот вопрос требует дальнейшей проверки.

Из табл. 2 видно также, что все культуры *Az. agile* флуоресцируют белым цветом, а *Az. vinelandii* — зеленым цветом. Цвет флуоресценции абсолютно не зависит от видимого пигмента. Так например, *Az. agile* зельфтский образует растворимый зеленый пигмент, а флуоресцирует ярко белым цветом.

Местные штаммы *Az. agile*, имея сходные свойства с описанной Бейерингом культурой, отличаются от нее тем, что образуют цисты и не пигментируют зеленым цветом. Для флуоресцентного анализа из местных культур было отобрано по 32 штамма *Az. agile* и *Az. nigricans* (табл. 3). Оказалось, что все культуры азотобактера флуоресцирующих веществ почти не образуют, светят очень слабо белым цветом, а некоторые из них совсем не светят, подобно контрольной среде. Только одна культура *Az. nigricans* 83 флуоресцировала белым цветом, что требует дальнейшей проверки. Испытанные нами одновременно несколько культур *Az. chroococcini* светили почти так же, как и культуры *Az. agile* и *Az. nigricans*.

Джонстон и Фишбеин [7] в своей работе описали две культуры *Az. agile*, которые не вырабатывали флуоресцирующих веществ. Авторы считают это явление вполне нормальным, т. к. не обязательно, чтобы штаммы одного и того же вида образовали одинаковые продукты метаболизма.

### В ы в о ы

1. Флуоресцентный анализ является дополнительным методом для разграничения видов *Az. agile* и *Az. vinelandii*.

2. Флуоресцентным методом было подтверждено, что три культуры, полученные из Минска и Ленинграда, под названием *Az. agile* относятся к виду *Az. vinelandii*.

3. *Az. macrocytogenes* Jensen своими свойствами идентичен с *Az. agile jakutiae*, что подтверждено применением флуоресцентного метода.

4. Местные штаммы *Az. agile* и *Az. nigricans*, которые одинаково пигментируют, выделяя в среду фиолетово-бурый пигмент, флуоресцирующих веществ почти не синтезируют. Под ультрафиолетовыми лучами они светят очень слабо белым цветом.

Очень слабое свечение у местных штаммов *Az. agile*, вероятно, следует отнести к особенностям их экологических свойств и не противоречит литературным данным об отсутствии свечения или слабого свечения у некоторых штаммов данного вида азотобактера.

Таблица 3  
Образование флуоресцирующих веществ у местных культур *Az. agilis* и *Az. nigricans*

<i>Az. agilis</i>						<i>Az. nigricans</i>					
№ штамма	срок куль- тивирова- ния	интенсив- ность све- чения	№ штамма	срок куль- тивирова- ния	интенсив- ность све- чения	№ штамма	срок куль- тивирова- ния	интенсив- ность све- чения	№ штамма	срок куль- тивирова- ния	интенсив- ность све- чения
1	7	свечения нет	79	15	-	2	23	-	66	17	+
2	7		82	21	свечения нет	6	21	свечения нет	67 сух	21	+
13 <sub>a</sub>	7		91	21		7	16	+	70	25	+
16	7		110	21		15	16	++	73	15	+
23	17		141	21		24	25	+++	74	12	+
26	7		148	21		29	15	+++	78	28	+
28	12	+	149	12	+	32	14	+++	80	23	+
41	12		155	15	+	37	15	+++	82	15	+
47	21		157	23	+	38	15	+	83	15	++++
49	21		163	12	+	40	23	+++	84	23	+
50	21		165	15	+	41	21	+++	85	23	+
56	12		167	12	+	42	15	+	86	15	+
61	21	+	172	15	+	50	25	+	87	23	+
63	15	+	177	14	+	51	21	+	88 сух	17	-
69	15		180	14	+	57	28	+	95	15	свечения нет
70	15	+	181	11	+	65	23	+	103	15	свечения нет

Контроль-среда — свечения нет.

Լ. Ս. ՄԻՔՈՆՅԱՆ, Ա. Վ. ԿՐԵՆՈՍՏԱՆ, Մ. Մ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ԱՂՈՒՐՈՐԴԱԿՆԵՐՆԵՐԻ ՏԵՍԱԿԱՅԻՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԶԼՈՒՈՐՈՐԴՆԵՐԻԿ ԵՂԱՆԱԿԻՎ

Ա մ փ ո փ ու մ

Միկրորոգանիդների, ինչպես և ազոտորակաերների տեսակային որոշումը կատարվում է տարբեր եղանակներով: Սակայն այն դժվարությունները, որոնք կապված են միկրոբների տեսակային որոշման հետ, ստիպում են հետազոտողներին գտնել և առաջարկել նոր ու լրացուցիչ մեթոդներ:

Վերջին տարիներին Ջոնսոնի [5, 6, 7] և ուրիշների կողմից առաջարկված է նոր մեթոդ ազոտորակաերների տեսակային որոշման համար: Համաձայն այդ մեթոդի, ազոտորակաերների որոշ տեսակներ, որոնք առաջացնում են ջրում լուծվող ֆլուորեսցենտ նյութեր, ենթարկվում են ուլտրամանուշակագույն ճառագայթման. քսա որում *Az. agile* տեսակին պատկանող կուլտուրաները լուսազդրվում են սպիտակ գույնով, իսկ *Az. vinelandii*-ին պատկանողները՝ կանաչ գույնով:

Կատարված աշխատանքի նպատակն է եղել ֆլուորոմետրիկ եղանակով հշտել *Az. agile* և *Az. vinelandii* կոդիցիտն մի քանի շտամների տեսակային պատկանելությունը: Այնուհետև այս մեթոդով ստուգվել են Հայաստանի հողերի մեկուսացված *Az. agile* և *Az. nigricans* կուլտուրաների կողմից ֆլուորեսցենտ նյութեր սինթեզելու տնակալվյունը:

Աշխատանքի վերաբերյալ կարելի է հանդել հետևյալ եզրակացությունները.

1. Նյութորմետրիկ անալիզը լրացուցիչ եղանակ է *Az. agile* և *Az. vinelandii* տեսակները միմյանցից տարբերելու համար:

2. Ֆլուորոմետրիկ եղանակի կիրառումը հնարավորություն տվեց վերջնականապես գոյ այն եզրակացության, որ *Az. agile*-ի անվան տակ տարբեր տեղերից ստացված երեք շտամները պատկանում են *Az. vinelandii* տեսակին:

3. Համաձայն կատարված ուսումնասիրությունների [1], *Az. macrocytopenes* Jensen պատկանում է *Az. agile* տեսակին, որը հաստատվում է ֆլուորեսցենտ մեթոդի կիրառմամբ:

4. *Az. agile* և *Az. nigricans* կուլտուրաների տեղական շտամները, որոնք անդամիչավայրը գտնաւորում են միանման գորշ-մանուշակագույնով, համարյա չեն սինթեզում ֆլուորեսցենտ նյութեր: Սուրբամանուշակագույն ճառագայթների ազդեցության տակ նրանք լուսավորվում են շատ թույլ սպիտակ գույնով, որը, հավանորեն, կարելի է վերագրել նրանց էկոլոգիական առանձնահատկություններին: Այս չի հակասում եղած այն գրական տվյալներին, որտեղ նշվում է, որ *Az. agile*-ին պատկանող որոշ շտամներ կամ չեն լուսավորվում, կամ լուսավորվում են շատ թույլ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кривкоєв А. В. и Мельникова Ж. С. Изв. АН АрмССР (биолог. науки), т. XVII, 4, 1964.  
 2. Р. Ե. Միսիսիկ Ն. Ս. Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве, Киев, 1960.  
 3. Burt D. and Llewellyn C. K. J. Bact., 19, 389, 1930.

4. Callao V. a. Montoya E. J. *General Microbiology*, v. 22, 3, 657, 1960.
5. Johnstone D. B. J. *Bacter.*, 69, 481, 1955.
6. Johnstone D. B. *Applied. Microbiology*, v. 5, 2, 103, 1957.
7. Johnstone D. B. a. Fishbein J. R. J. *General Microbiology*, v. 11, 2, 300, 1956.
8. Norris J. R. *Natur*, v. 185, 4713, 634, 1960.