

Վ. Գ. ՆԻՈՂՈՍՅԱՆ, Ն. Մ. ՍԱՅԱԳՅԱՆ, Ս. Բ. ՇԱՀՄՈՒՐԱԳՅԱՆ

ՕԼԻԳՈՆԵՏՐՈՖԻԼ ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ՖԵԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ *Pseudomonas* ցեղին պատկանող օլիգոնիտրոֆիլ բակտերիաների մաքուր կուլտուրաների լազ-ֆազայի տևողությունը հեղուկ էջրի սննդամիջավայրում կազմում է 24—48 ժամ, իսկ լոգարիթմական ֆազայինը 20—30-ից երբեմն հասնում է 45 օրվա: Բջջիչների բազմացման դորժակիցը ցածր է, իսկ ֆիքսած ազոտը 1 գ շաքարի օգտագործման դեպքում, չի անցնում 1,7 մգ-ից:

Պարզվում է, որ օլիգոնիտրոֆիլների աճեցողության համար ամենաբարենպաստ միջավայրը հանդիսանում է հեղուկ էջրին շաքարատափանքի առկայությամբ, որտեղ բջջիչների տիտրը հասնում է տասնյակ միլիարդներին:

Տարբեր սննդամիջավայրերում ու աճեցման պայմաններում օլիգոնիտրոֆիլների զարգացման յուրահատկությունների վերաբերյալ ուսումնասիրություններ մինչ այսօր բիշ են կատարվել:

Սույն աշխատանքում մեր նպատակն է եղել պարզել օլիգոնիտրոֆիլ բակտերիաների մաքուր կուլտուրաների ֆազային զարգացման առանձնահատկությունները առաջիկա* և ազոտային տարբեր սննդամիջավայրերում ու C-ի տարբեր աղբյուրների օգտագործման նրանց ունակությունը:

Նյութ և մեթոդ: Փորձերի համար օգտագործվել են Հայաստանի տարբեր հողատիպերից ու սուբստրատներից մեկուսացված [7] *Pseudomonas* ցեղին պատկանող օլիգոնիտրոֆիլների 21 շտամներ:

Կուլտուրաներն աճեցվել են էջրի-ի և Ֆյոդորով-Կալինինսկայայի [1] սննդամիջավայրերում: Վերջինում դորժակին ավտոլիզատը ներմուծվել է 1 լ սննդամիջավայրին 10—15 մգ ազոտի հաշվով:

Ցանրի նյութի նախնական մաքրման համար կատարվել է բջջիչների կրկնակի լվացում՝ ցենտրիֆուգման միջոցով (5000 պտ/ր, 15 րոպե տևողությամբ):

Որպես C-ի աղբյուրներ օգտագործվել են՝ սախարոզը, գլյուկոզը, արաբինոզը, շաքարատափանքը (մեխասան, որը պարունակել է 2% N), էթիլ սպիրտը, մաննիտը, բուլանոլը, գլիցերինը, սորբիտը, բենզոյաթթուն, սաթաթթուն, լիմոնաթթուն, քացախաթթուն, յուղաթթուն: Այդ նյութերի ներգործությունը որոշվել է ինչպես առանձին (0,3—3%-ի հաշվով), այնպես էլ տարբեր կոմբինացիաներով, որտեղ նրանց բնդհանուր քանակը չի գերազանցել 2%-ից:

Որպես աճման խթանիչներ և C-ի ու N-ի օրգանական աղբյուրներ փորձարկվել են B₁, B₂, B₃, B₁₂ բիոտին, PP, ինոզիտ վիտամինները, համապատասխանաբար 400, 80, 400, 08, 02, 0,1, 400, 120 Վ/լ-ի հաշվով և արգինին, ասպարադինաթթու, գլյուտամինաթթու, հիստիդին, մեթիոնին, լիզին, լեյցին, օրնիթին, սերին, ալանին, վալին, 3-ֆենիլ-ալանին, թրեոնին ամինաթթուները, յուրաքանչյուրը 10—50 մգ/լ-ի հաշվով:

Թվարկված նյութերի ներգործությունը օլիգոնիտրոֆիլների աճեցողության վրա սկզբում որոշվել է աուրսանոգրաֆիկ եղանակով, իսկ հետագայում տարբեր բնույթի հեղուկ սննդամիջավայրերում:

* էջրի սննդամիջավայր, որի կոմպոնենտները մաքրված չեն ազոտի հետքերից:

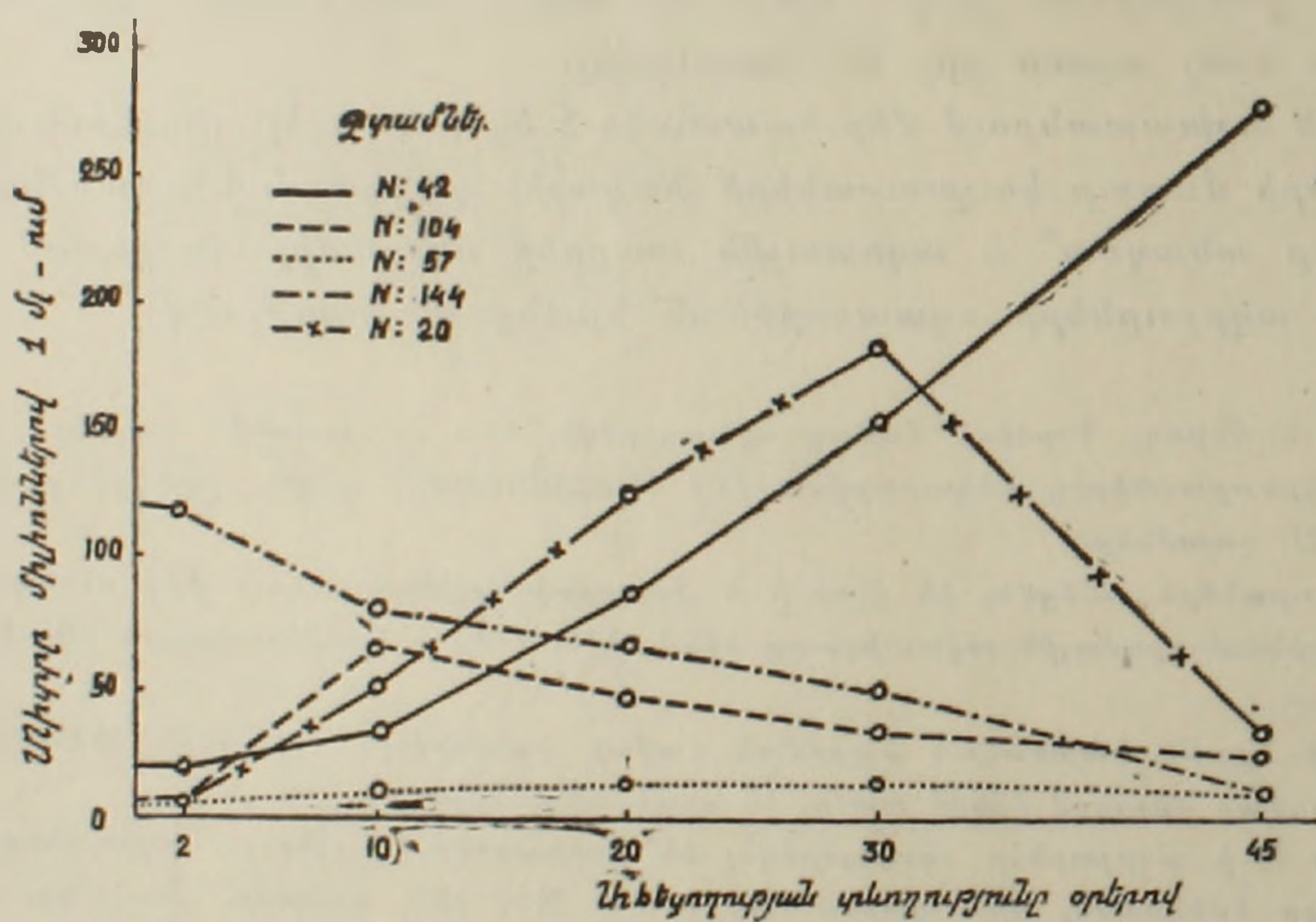
Կուլտուրաներն աճեցվել են 27—28 °C ջերմության պայմաններում: Բջիջների տիտրը որոշվել է հաջորդական նոսրացումներով, ֆիքսված ազոտը Կելդալի*, իսկ մնացորդային շաքարները՝ Բերտրանի եղանակներով:

Աէրացիայի ազդեցությունը օլիգոնիտրոֆիլների աճեցման վրա փորձարկվել է թափահարիչի պայմաններում (200 պտ/ր), 250 մլ տարողության էրլենմեյերի կուլրաներում, որտեղ հեղուկ սննդամիջավայրը կապմել է 50 մլ:

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ՆՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ: Երբ էշբի ագարային սննդամիջավայրում զարգացող բակտերիաներից պատրաստված ցանքի նյութը ենթարկվել է նախնական լվացման և ներմուծվել հեղուկ էշբի միջավայր, ապա, ինչպես երևում է նկ. 1-ից, վերջինում բակտերիաների զարգացումը տարբեր ձևով է ընթացել:

Լազ-ֆազայի տևողությունը, որը միկրոօրգանիզմների մոտ ընդհանուր առմամբ մեծ չափով պայմանավորված է սննդամիջավայրի բնույթով [12], ուսումնասիրած բակտերիաների մոտ հասնում է 24—48 ժամվա, այն դեպքում, երբ *Bact. coli* -ի մոտ այն տևում է ընդամենը 1—2 [8], իսկ *Azotobacter chroococcum* -ի մոտ 24 ժամ [11]:

Հեղուկ էշբի սննդամիջավայր ներմուծված բակտերիալ բջիջների մի մասը, լազ-ֆազայի երկար տևողության ընթացքում, հարմարվում է այդ սննդամիջավայրին և ապա սկսում կիսվել, բազմանալ: Սակայն մի շարք կուլ-



Նկ. 1. Տարբեր բակտերիաների զարգացումը հեղուկ էշբի սննդամիջավայրում:

տուրաներ (շտ. № 144-ի նման) չեն հարմարվում այդ պայմաններին և նրանց տիտրն այնտեղ աստիճանաբար ընկնում է, այն դեպքում, երբ այդ կուլտուրաները թույլ կերպով զարգանում էին էշբի ագարային սննդամիջավայրում:

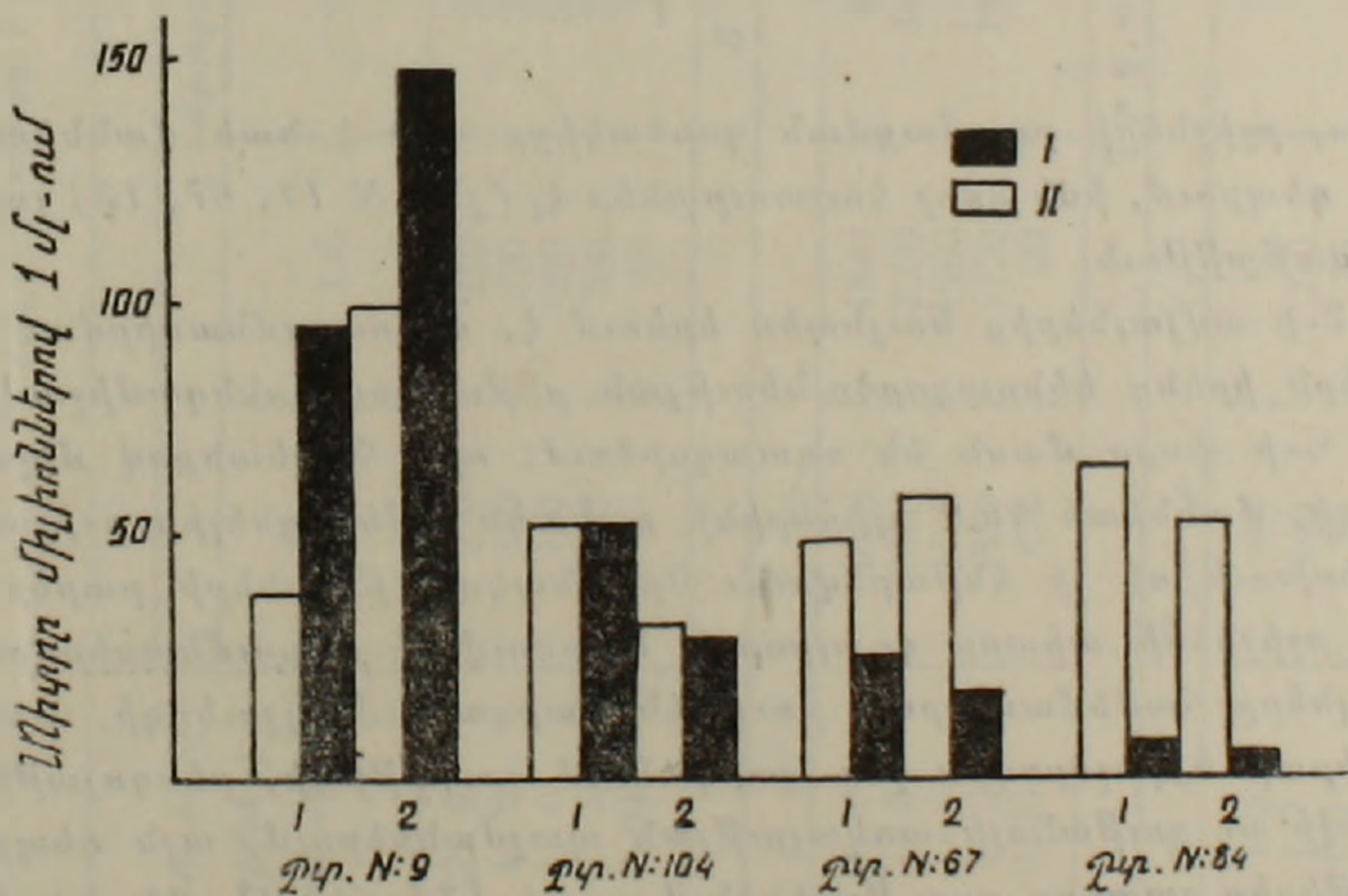
Ներմուծված բջիջների քանակը շտ. № 57-ի մոտ, զարգացման 45 օրվա ընթացքում համարյա նույն չափով է պահպանվել:

* Փորձարկվող կուլտուրալ հեղուկը վերցվել է մեծ ծավալով, 50—100, իսկ երբեմն 500 մլ-ի չափով:

Ուսումնասիրված կուլտուրաների մեծ մասը, սննդամիջավայր ներմուծելուց 1—2 օր հետո անցնում է զարգացման լողարիթմական ֆազին, որը, ինչպես երևում է նկ. 1-ից, տարբեր բակտերիաների մոտ տարբեր տևողությոն ունի: Եթե կուլտուրաների մի մասի մոտ այն տևում է 10 օր (շտ. № 104), ապա մի շարք բակտերիաների մոտ, շտ. № 42-ի նման, այդ ֆազը, երկարելով երբեմն անցնում է 45 օրվանից: Փորձարկված կուլտուրաների ճնշող մեծամասնության մոտ լողարիթմական ֆազը տևում է 20—30 օր, այն դեպքում, երբ *Azotobacter chroococcum*-ի մոտ այն կազմում է ընդամենը 7 օր [11]:

Հեղուկ էջերի և Ֆյոդորով-Կալինինսկայայի սննդամիջավայրում ուսումնասիրված *Pseudomonas* ջեդին պատկանող 21 տարբեր կուլտուրաների բազմացման գործակիցը (մաքսիմալ տիտրի և ներմուծված բջիջների քանակության հարաբերությունը) սովորաբար տատանվում է 50—200-ի սահմաններում:

Հեղուկ էջերի սննդամիջավայրում օլիգոնիտրոֆիլների աճմանը որոշակիորեն չի նպաստել նաև միջավայրում լուծելի թթվածնի ավելացումը: Նկ. 2-ից երևում է, որ աէրացիան թափահարիչի պայմաններում նպաստել է շտ. № 9-ի և հակառակը ճնշել է շտ. № 67, 84-ի զարգացումը: Լենհրաժեշտ է նշել, որ շտ. № 104-ի տիտրը չնայած պահպանվել է նույնությամբ, սակայն հանգստի պայմաններում զարգանալիս այն միջավայրում սինթեզել է մեծ քանակությամբ լորձ, որը չի նկատվել թափահարիչի պայմաններում աճեցնելիս: Ինչպես երևում է աղ. 1-ի տվյալներից, այդ կուլտուրան հանգստի պայմաններում զարգանալիս, ի տարբերություն մյուսների, օգտագործել է սննդամիջավայր ներմուծված շաքարի զգալի մասը (65%), չնայած նրա ֆիքսած



Նկ. 2. Աէրացիայի ազդեցությունը օլիգոնիտրոֆիլ բակտերիաների զարգացման վրա: I — թափահարիչի պայմաններում, II — հանգստի պայմաններում 1—10 օրվա կուլտուրաներ, 2—20 օրվա կուլտուրաներ:

ազոտի քանակը մյուս կուլտուրաների համեմատ ավելի ցածր է: Հետևաբար, շտ. № 104-ը սննդամիջավայրի սախարոզը հիմնականում օգտագործել է արտաբջջային բաղադրարարների սինթեզման համար:

Օգտագործված շաքարի և ֆիքսված ազոտի քանակության միջև ընդհանուր կապ չի նկատվել նաև այլ կուլտուրաների մոտ, որը հավանաբար պետք է վերագրել անբավարար քանակությամբ ազոտ պարունակող միջավայրերում զարգացող տարբեր բակտերիաների բջջի բիմիական կազմի սպեցիֆիկությանը:

Ուսումնասիրությունների ընթացքում մեզ հետաքրքրել է նաև այն հարցը, թե իրենց կենսագործունեության ընթացքում օլիգոնիտրոֆիլ բակտերիաները C-ի և N-ի ինչպիսի աղբյուրներ են օգտագործում և ո՞րն է նրանց զարգացման ամենաբարենպաստ սննդամիջավայրը: Այդ ուղղությամբ տարբեր շաքարների, սպիրտների և օրգանական թթուների վերաբերյալ կատարված փորձերի արդյունքների մի մասն ամփոփված է աղ. 2-ում: Բերված տվյալներից պարզ նկատվում է, որ օլիգոնիտրոֆիլների տիտրը շատ մեծ է շաքարատականքի տարբեր քանակների տարբերակներում: Սախարոզի տարբերակի

Աղյուսակ 1

Օլիգոնիտրոֆիլ բակտերիաների ազոտֆիքսացիան
էջբի սննդամիջավայրում (ֆիքսված N-ը մգ-ով)

Pseudomonas ցեղի շտամներ	50 մլ սննդամիջավայրում ֆիքսված N-ը	օգտագործված շաքարի ‰-ը	1 գ օգտագործված շաքարից ֆիքսված N-ը
95	0,18	15	1, 2
104	0,48	65	0,74
84	0,22	20	1, 1
67	0,33	35	0,95
20	0,34	20	1, 7
9	0,30	20	1, 5
11	0,15	15	1, 0

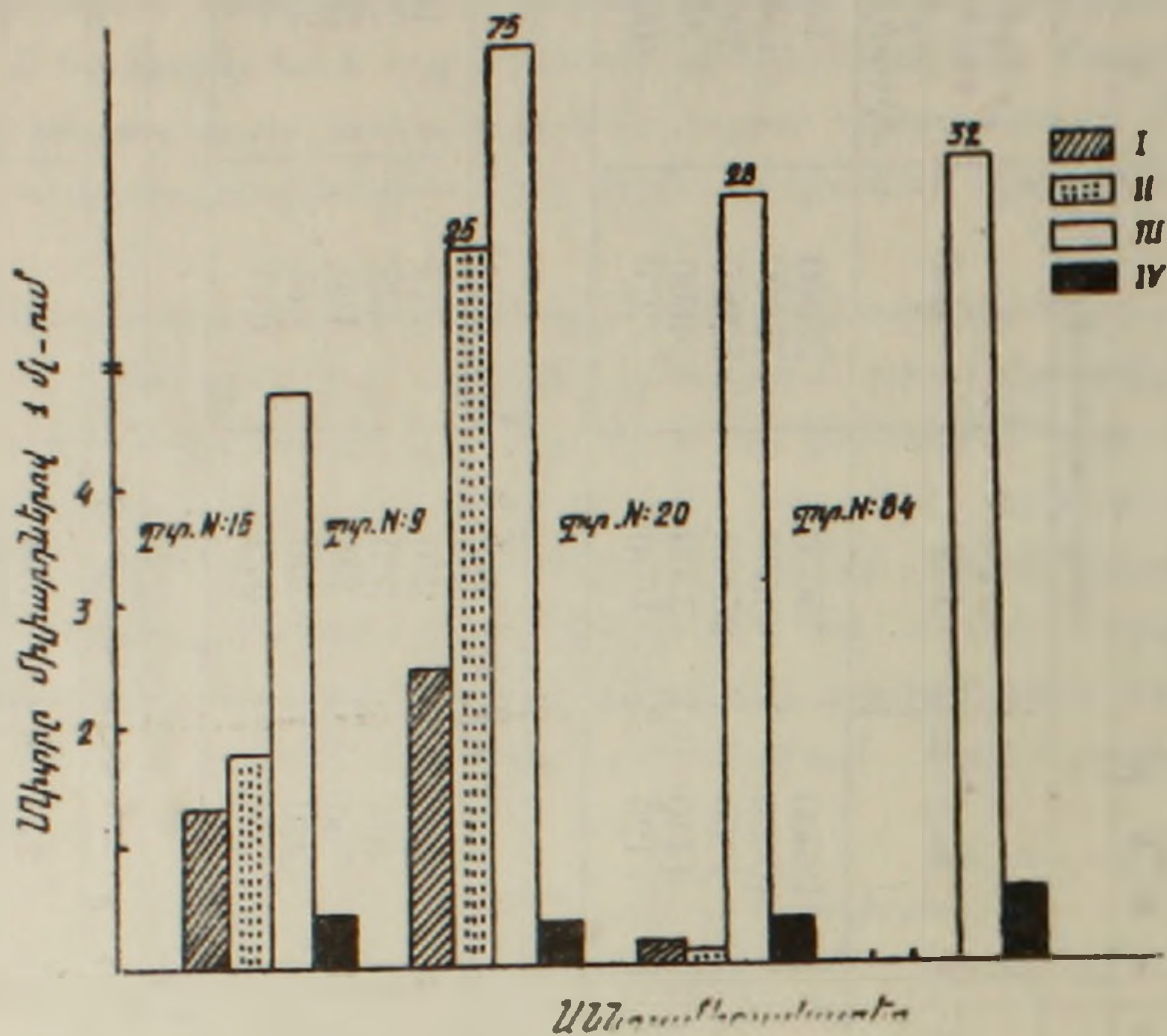
համեմատ, բջիջների բազմացման գործակիցը մեծ է նաև մաննիտի օգտագործման դեպքում, իսկ որոշ կուլտուրաներ էլ (շտ. № 11, 67, 15) լավ են յուրացրել սաթաթթուն:

Աղ. 2-ի տվյալներից նույնպես երևում է, որ ուսումնասիրված օլիգոնիտրոֆիլներն իրենց կենսագործունեության ընթացքում սննդամիջավայր ներմուծված C-ի փոքր մասն են օգտագործում, որի հետևանքով միջավայրում սախարոզի, մաննիտի կամ գլիցերինի քանակն ավելացնելիս բջիջների թիվը մեծ փոփոխության չի ենթարկվում: Օրգանական թթուների բարձր քանակի դեպքում բջիջների տիտրը զգալիորեն նվազում է: Ուսումնասիրված օլիգոնիտրոֆիլները համեմատաբար թույլ են զարգանում գլյուկոզի, արաբինոզի, էթիլ սպիրտի և բուրբուրի շեն զարգանում յուղաթթվի, բենզոյաթթվի, քաջախաթթվի ու բութանոլի առկայության պայմաններում, այն դեպքում, երբ այդ նյութերից շատերը ըստ Կալինինսկայայի [2] մեծ ինտենսիվությամբ են յուրացնում օլիգոնիտրոֆիլների և այլ միկրոօրգանիզմների խառը կուլտուրաները:

Փորձերը ցույց տվեցին, որ օլիգոնիտրոֆիլներն իրենց զարգացման համար, որպես ածխածին խթանիչ ու C-ի և N-ի աղբյուր, բավական մեծ ինտենսիվությամբ են օգտագործում նաև թրեոնինը, վալինը, արգինինը, օրնիթինը, հիստիդինը և B խմբի վիտամինների կոմպլեքսը:

Շ-ի տարբեր աղբյուրների ազդեցությունը օլիգոնիտրոֆիլների զարգացման վրա,
բջջերի տիտրը 1 մլ-ում միլիոններով, աճեցման 20-րդ օրը

Pseudomonas ցեղի շտամներ	Ներմուծված բջջերի քանակը	Շ ա բ ա ր ն ե ր							
		սախարոզ, %				շաքարատակաճ, %			
		0,3	1,5	3,0	բաղմացման դորձակիցը մաք- սիմալ տիտրի դեպքում	0,3	1,5	3,0	բաղմացման դորձակիցը մաքսիմալ տիտրի դեպքում
20	2, 9	270	250	250	93	18000	15000	28000	9655
9	4, 6	180	220	240	52	40000	48000	75000	16304
84	1, 0	450	600	550	600	1760	25000	32000	32000
15	1, 5	280	300	310	206	1440	3200	4600	3067
6	0,04	32	40	25	1000	120	1600	270	40000
Ս ա լ ի ր ա ն ե ր									
մ ա ն ն ի տ, %					դ լ ի ց ե լ ի ն, %				
20	2, 0	1600	1840	800	920	250	280	240	140
9	2, 5	2480	3000	3560	1424	464	560	328	224
84	1, 0	2400	1280	1150	2400	560	324	120	560
15	1, 2	1850	2150	1980	1791	280	320	44	266
6	0,03	6,0	30	74	2466	—	0,2	0,3	10
Օ Ր Դ ա ն ա կ ա ն թ թ ու ն ե ր									
ս ա թ ա թ թ ու տ, %					լ ի մ ո ն ա թ թ ու տ, %				
11	1,0	280	85	1,5	280	2,0	1,0	—	2
67	1,7	940	210	—	553	44	1,0	—	25
15	0,1	80	35	1,5	800	49	80	28	80



Նկ. 3. Օլիգոնիտրոֆիլ բակտերիաների զարգացումը տարբեր սննդամիջավայրերում:
I—ՄՊԲ, II—Չապեկ, III—էջրի+շաքարատականք 3%, IV—էջրի:

Սակայն նշենք, որ օլիգոնիտրոֆիլների զարգացման վրա, թվարկված C-ի տարբեր աղբյուրների, ամինաթթուների ու B խմբի վիտամինների թողած բարերար ներգործությունը անհամեմատ հեռու է շաքարատականքի թողած ազդեցությունից:

Հետազոտություններից պարզվեց, որ մեր փորձարկած *Pseudomonas* ցեղին պատկանող օլիգոնիտրոֆիլ բակտերիաները յուրահատուկ ֆիզիոլոգիական առանձնահատկություններով են օժտված: Այդ բակտերիաներից շատերը (ինչպես, օրինակ, շտ. № 95, 86, 42, 84, 96) չեն զարգանում սպիտակուցային (ՄՊԲ) և նիտրատային ազոտ պարունակող (Չապեկ) սննդամիջավայրերում: Նրանց զարգացման համար ամենալավ միջավայրը, ինչպես պարզ ներկատվում է Նկ. 3-ից, նույնպես հեղուկ էջրի-ն է՝ շաքարատականքի առկայությամբ:

Օլիգոնիտրոֆիլների սպիտակուցային միջավայրերում չզարգանալը հավանաբար պետք է վերադրել այն բանին, որ այդ միկրոօրգանիզմները էվոլյուցիոն զարգացման ընթացքում հարմարվել են օրգանական և հանքային միացություններով աղքատ միջավայրերում զարգանալուն, որի հետևանքով էլ նրանց մի մասը գուրկ է պրոտեոլիտիկ ֆերմենտներից: Ըստ երևույթին, մասամբ դրանով է պայմանավորված նաև այն երևույթը, որ օլիգոնիտրոֆիլների տարածվածությունը սահմանափակ է օրգանական նյութերով ու հումուսով հարուստ հողերում [2]:

Շաքարատականք պարունակող սննդամիջավայրերում օլիգոնիտրոֆիլների ուժեղ զարգացումը, այնտեղ առկա ազոտային տարբեր նյութերի, ամինաթթուների, վիտամինների ու բիոլոգիապես ակտիվ մի շարք այլ միացությունների արդյունք է: Միայն առանձին ամինաթթուների և B խմբի վիտամինների ներգործությամբ, ինչպես ցույց տվեցին ուսումնասիրությունները, չի ստացվում այն էֆեկտը, ինչ շաքարատականքի օգտագործման դեպքում:

Հետևաբար, օլիգոնիտրոֆիլներն իրենց նորմալ զարգացման համար տարբեր բնույթի կոմպլեքս միացությունների կարիք են զգում: Բնության մեջ նման տիպի միացություններ հավանաբար նրանք ստանում են այլ միկրոօրգանիզմների հետ հողային բիոցենոզում համատեղ զարգանալիս, մանավանդ, որ ներկայումս գրականությունից հայտնի է, որ այդպիսի համակենցության պայմաններում օլիգոնիտրոֆիլների զարգացումն ու ազոտի ասիմիլյացիան շատ ավելի ինտենսիվ են ընթանում:

ԳԱ մանրէաբանության ինստիտուտ

Ստացված է 24. XII 1973 թ.

В. Г. НИКОГОСЯН, Н. М. САЯДЯН, С. Б. ШАХМУРАДЯН

О ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЯХ ОЛИГОНИТРОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Р е з ю м е

В жидкой среде Эшби чистые культуры олигонитрофильных бактерий из рода *Pseudomonas* развиваются слабо и медленно. Они имеют лаг-фазу длительностью 24—48 час., а логарифмическую фазу 20—30, а порой до 45 дней. Коэффициент размножения у олигонитрофилов обычно невелик (50—200). Фиксированный азот у этих культур на 1 г употребляемого сахара не превышает 1,7 мг.

Часть изученных олигонитрофилов не развивается в средах, содержащих нитратный или белковый азот. Увеличение количества растворимого кислорода в жидкой среде Эшби обычно подавляюще действует на рост олигонитрофилов.

Различные источники углерода, аминокислоты и комплекс витаминов группы В, иногда благоприятствуют развитию олигонитрофилов. Исследования показали, что наилучшей средой для развития этих микроорганизмов, является жидкая среда Эшби с мелассой, где титр клеток часто достигает десятков миллиардов.

Для своего нормального развития олигонитрофилы, по-видимому, нуждаются в комплексных соединениях различного характера.

Գ Ր Ա Շ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

1. Калининская Т. А. Микробиология, 36, 2, 1967.
2. Калининская Т. А. Микробиология, 36, 4, 1967.
3. Мальцева Н. Н. ДАН СССР, 181, 1968.
4. Мальцева Н. Н. Микробиология, 40, 2, 1971.
5. Мальцева Н. Н. и Изжеурова В. В. Микробиол. ж. УРСР, 34, 5, 1972.
6. Мальцева Н. Н., Изжеурова В. В. и Рожанская А. М. Микробиология, 42, 3, 1973.
7. Никогосян В. Г., Саядян Н. М., Шахмурадян С. Б. Биологический журнал Армении.
8. Работнова И. А. и Минеева Л. А. Микробиология, 28, 3, 1959.
9. Федоров М. В. и Калининская Т. А. Известия ТСХА, 2, 1960.
10. Федоров Т. А. и Калининская Т. А. Доклады ТСХА, 70, 1961.
11. El-Refai A. H., El-Sayed M. A., Mdhamed T. A. Microbiol. esp. 25, 2, 1972.
12. Winslow C., Walker H. a Subermelster M. J. Bact., 24, 1932.