

Биолог. журн. Армении. 3-4 (59), 2007

УДК 579.64.58.071

ԴԻԱԶՈՏՐՈՖՆԵՐԻ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՀԱՅԱՍՏԱՆՈՒՄ ՄԵԱԿՈՂ ՀԱՅԱԶԻՆԵՐԻ ԱՐՄԱՏԱՅԻՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳՈՒՄ

Վ.Գ. ՆԻԿՈՂՈՍՅԱՆ, Ի.Բ. ԲԱՂՂԱՍՏՐՅԱՆ

«ՀԱՍ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, 2201, Արմավան

Ուսումնասիրվել են ցորենի ու գարու արմատային համակարգից մեկուսացված ազոտֆիքսող մանրէների բարդ կազմ ունեցող համակեցությունները որոնք օժտված են ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվությամբ՝ մրցունակ են և նպաստում են ցորենի սերմերի աճնեցողությանը: Պարզվել է, որ A42 ոչ սիմբիոտիկ ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունը (ՍՄՀ) կազմված է *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* ցեղերին պատկանող երեք դիազոտրոֆներից և նրանց ուղեկցող չորս այլ մանրէներից: Նման բարդ կազմ են ունեցել նաև *Azospirillum* պարունակող A66 և A51 ՍՄՀ-ները: Ցույց է տրված, որ A42 և A66 ՍՄՀ-ների տեսակային կազմն ու ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը պահպանման վեց տարիների ընթացքում մնացել են անփոփոխ: Պարզվել է նաև, որ ՍՄՀ-ներում զարգացող որոշ բակտերիաներ դիազոտրոֆներից պաշտպանում են չրջապատի կոնկուրենտներից:

Изучены сообщества азотфиксирующих микроорганизмов (СМ), выделенные из корневой системы пшеницы и ячменя, которые активно фиксируют азот, конкурентоспособны и стимулируют росту семян пшеницы. Показано, что СМ A42 состоит из трех диазотрофов родов *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* и четырех сопутствующих микроорганизмов. Подобный сложный состав имеют также *Azospirillum*, содержащие СМ A66 и A51. Выявлено, что видовой состав и активность азотфиксации СМ A42 и A66 при шестилетнем хранении остаются без изменения. Показано также, что некоторые бактерии, развивающиеся в СМ защищают диазотрофов от окружающих конкурентов.

The communities of nitrogen-fixing microorganisms (CNFM) isolated from the root system of wheat and barley have been studied. The CNFM possess a high degree of nitrogen-fixing activity, they are competitive and stimulating the growth of the wheat seeds. The community A42 of non-symbiotic nitrogen-fixing microorganisms was found to consist of three diazotrophs of genera *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* in combination with four other microorganisms. The *Azospirillum* containing CNFM A66 and A51 as well had similar complex composition. It was shown that the species composition and nitrogen-fixing activity of the CNFM A42 and A66 remain to be unaltered during six years of storage. Some of bacteria grown in CNFM was found to protect diazotrophs from surrounding competitors.

Դիազոտրոֆներ - միտրոգենազային ակտիվություն - որոգսֆերա -
ռիզոսֆան - ցորեն

Դիազոտրոֆների խառը կուլտուրաների բարերար ազդեցությունը բույսերի աճնեցողության վրա հայտնի է շատ հեղինակների աշխատաքներից [7, 13, 14]: Ցույց է տրված, որ դիազոտրոֆների խառը կուլտուրաները մաքուր կուլտուրաների համեմատ ավելի շատ ազոտ են ֆիքսում [2, 4]: Գլազովեան և ուրիշները փորձարկել են բույսերի ռիզոսֆերայից մեկուսացված մի շարք ազոտֆիքսող խառը կուլտուրաներ, որոնց տեսակային կազմը, տարբեր

պոստլյուսցիաների հարաբերակցությունը և ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվությունը լաբորատոր պայմաններում մեկ տարի պահպանման ընթացքում մնացել է հաստատուն [4]: Տեղեկություններ կան նաև, որ նույն բույսի ռիզոսֆերան սովորաբար պարունակում է 1-4 ազոտֆիքսատորներ [15]:

Սակայն անհրաժեշտ է նշել, որ հացազգիների ռիզոսֆերայում ու ռիզոպլանում տարբեր դիագնոստիկներից բաղկացած համակեցությունները քիչ են ուսումնասիրված: Մինչ այժմ հայտնի չի ԱՄՅ-ներում դիագնոստիկներին ուղեկցող այլ մանրէների դերը: Չի ուսումնասիրվել նաև ազոտֆիքսող համակեցությունների կազմն ու ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը ծայրահեղ պայմաններում երկարատև պահպանման ընթացքում: Սույն հաղորդումը նվիրված է այդ ուղղությամբ մեր կատարած ուսումնասիրություններին:

Լյուր և մերոդ: Փորձարկվել են 3 այաստանի տարբեր շրջաններում մշակվող ցորենի ու գարու ռիզոսֆերայից ու ռիզոպլանից մեր կողմից նախկինում մեկուսացված 2, A42, A66 և A51 ԱՄՅ-ները: Շուրջ 120 ԱՄՅ-ներից ընտրված *Azotobacter* պարունակող մրցումակ A42 և A51 համակեցությունները մեկուսացման առաջին տարում օժտված են եղել ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվությամբ և նպաստել են ցորենի սերմերի աճեցողությանը:

Ուսումնասիրված ԱՄՅ-ներում զարգացող առանձին մանրէների հայտնաբերման համար օգտագործվել են էքիի, Չապեկի փնոգրադսկու, ՄՊԱ, իսկ *Azospirillum*-ի հայտնաբերման համար RC [13] սենզամիջավայրերը: Ազոտֆիքսող բացիլների ուսումնասիրման ընթացքում որոշ դեպքերում փորձարկվել է նաև GB սենզամիջավայրը [15]:

Կուլտուրաների իդենտիֆիկացման համար Բերգեի [9, 10] որոշիչներից բացի օգտագործվել են նաև այլ հեղինակների աշխատանքները [16, 17]: Սանրենների անտագոնիստական փոխազդեցությունը որոշվել է ազար-բլոկների, իսկ ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը վինոգրադսկու հեղուկ սենզամիջավայրում, ացետիլենային եղանակով [12]:

Արդյունքներ և քննարկում: Փորձերից պարզվել է, որ *Azotobacter* պարունակող ուսումնասիրված համակեցությունները, բացառությամբ 2 ԱՄՅ-ի, լաբորատոր պայմաններում 1-2 տարվա ընթացքում կատարված բազմակի վերացանքսերից հետո, ցուցաբերել են ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվություն: 2 ԱՄՅ-ում, պահպանության երկրորդ տարուց հետո *Azotobacter* չի հայտնաբերվել, որի հետևանքով զգալիորեն նվազել է այդ համակեցության ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը: Փորձարկված ԱՄՅ-ները հետագա հինգ տարիներին պահպանվել են ծայրահեղ պայմաններում (ծնոթանմիսներին ցածր ջերմաստիճան -2 +2°C, վերացանքսեր տարեկան մեկ անգամ, ջերմաստիճանի կտրուկ փոփոխություններ և այլն):

Մույրում 1 ԱՄՅ-ների ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը երկարատև պահպանման ընթացքում

ԱՄՅ-ներ	Մեկուսացման տարեթիվը	Պենիցիլինի սրվակներում ֆիքսված ազոտը մգ / 9 ցրում		
		մեկուսացումից հետո	1990թ	1995թ
2	1988	0.42	0.24	0.22
A 42	1988	0.48	0.46	0.48
A 66	1989	0.50	0.51	0.52
A 51	1989	0.52	0.50	0.32

Ինչպես ցույց տվեցին ուսումնասիրությունները (աղ. 1) հինգ տարի նման պայմաններում պահպանվելուց հետո A42 և A66 ԱՄՅ-ների ազոտի ֆիքսման

ակտիվությունը մնացել է անփոփոխ: Փորձարկված համակեցությունների ծայրահեղ պայմաններում զոյատևելու այդ հատկությունը հավանաբար ծևավորվել է in situ պայմաններում զարգանալիս, որտեղ արտաքին զործոնները ևս հաճախակի կտրուկ փոփոխությունների են ենթարկվում: Սակայն նման երևույթ չի նկատվել A51 ՍՄՀ-ում, որտեղ, ծայրահեղ պայմաններում երկարատև պահպանումից հետո *Azotobacter* չի հայտնաբերվել:

Տարբեր սննդամիջավայրերի վրա կատարված ցանքսերը ցույց տվեցին, որ փորձարկված ՍՄՀ-ները ունեն բարդ կազմ, որի մեջ մտնում են 1-3 դիագնոստիկներ և նրանց ուղեկցող 2-6 այլ մանրէներ (աղ. 2):

Աղյուսակ 2. ՍՄՀ-ներում հայտնաբերված տարբեր մանրէների քիվը

ՍՄՀ-ներ	Սննդամիջավայրեր							Սանրեների ընդհանուր քիվը ՍՄՀ-ում
	Էջրի		Չապել		ՍՊԱ		ԲՀ-ում <i>Azospirillum</i> առկայու- թյունը	
	ընդհանուր քիվը	դիագնո- ստիկներ	ընդհանուր քիվը	չեն զարգանում էջրի վրա	ընդհանուր քիվը	չեն զարգանում էջրի վրա		
2	3	2	3	0	1	0	-	3
A42	6	3	6	0	3	1	-	7
A66	5	2	5	0	2	1	+	7
A51	6	2	5	0	3	2	+	9

Հետագա ուսումնասիրություններից պարզվեց, որ հացագգիների դիզոսֆերայից ու դիզոպլանից մեկուսացված ՍՄՀ-ների կազմում հանդես եկող դիագնոստիկները տարբեր ցեղերի ներկայացուցիցներ են (աղ. 3):

Աղյուսակ 3. Դիագնոստիկների համակեցությունների կազմը ցորենի ու գարու արմատային համակարգում

ՍՄՀ-ներ	Սեկուսացման վայրը բույսը	Դիագնոստիկներ
2	Մասիսի յոթան. գորենի դիզոսֆերա	<i>Azotobacter armeniacus</i> <i>Bacillus</i> sp.
A42	Կոտայքի չրջան, գարու դիզոսֆերա	<i>Azotobacter armeniacus</i> <i>Klebsiella</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.
A66	Աշտարակի չրջան, ցորենի դիզոպլան	<i>Azotobacter armeniacus</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Azospirillum</i>
A51	Աշտարակի շրջան, ցորենի դիզոպլան	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Azospirillum</i>

Հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ մեկուսացման առաջին տարում փորձարկված բոլոր ՍՄՀ-ները *Azotobacter* են պարունակել, կարելի է հետևեցնել, որ A51 համակեցությունը սկզբնական շրջանում բաղկացած է եղել *Azotobacter*-ից, *Azospirillum*-ից, *Agrobacterium*-ից, և *Flavobacterium*-ից իսկ 2- ը միայն *Azotobacter*-ից և ազոտֆիքսող բացիլից: Ստանձնապես ուշագրավ է երեքական դիագնոստիկներից բաղկացած A42 և A66 ՍՄՀ-ները, որոնց կազմն ու ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը ինչպես նշվեց վերևում, ծայրահեղ պայմաններում երկարատև պահպանումից հետո մնացել է անփոփոխ:

Ցորենի արմատներում *Azotobacter*-ի առկայության վերաբերյալ

գրականությունից հայտնի են հակասական կարծիքներ [5, 18], չնայած մի շարք հեղինակներ հաստատում են այնտեղ ազոտֆիքսող բացիլների [3], *Azospirillum*-ի [1], *Agrobacterium*-ի [8] զարգացումը: Տեղեկություններ կան նաև հացազգիների նկատմամբ *Klebsiella*-ի բարերար ներգործության վերաբերյալ [11]: Սակայն վերոհիշյալ ազոտֆիքսատորներից բաղկացած համակենցությունների վերաբերյալ տեղեկություններ գրականությունից մեզ չեն հանդիպել:

Հետագա ուսումնասիրություններից պարզվեց, որ A42 ՍՄՀ-ում դիագնոստիկներին ուղեկցող *Erwinia* sp. A42-10 և A51 ՍՄՀ-ում զարգացող *Flavobacterium* sp. A51-M1 բակտերիաները, համակենցությունում առկա բոլոր ազոտֆիքսատորներին պաշտպանում են հողերում մեծ տարածում ունեցող սպորավոր շատ բացիլների անտագոնիստական ազդեցությունից: Առանձնապես կարևոր է նշել, որ դիագնոստիկների այդ պաշտպանները ոչ միայն ինակտիվացնում են անտագոնիստների կողմից սինթեզվող հակաբիոտիկները, այլ նաև ակտիվորեն ճնշում են դրաց զարգացումը (աղ. 4): Հետաքրքրական է այն երևույթը, որ ազոտֆիքսատորների այդ երկու պաշտպանները, անտագոնիստական ոչ մի ներգործություն չեն ցուցաբերել ուսումնասիրված ազոտֆիքսող բացիլների և մյուս դիագնոստիկների հանդեպ:

Աղյուսակ 4 ՍՄՀ-ում դիագնոստիկներին ուղեկցող բակտերիաների անտագոնիզմը տարբեր մանրէների նկատմամբ (աճի ծնշման զոնայի տրամագիծն ազարային սննդամիջավայրում, մմ)

Մանրէներ	Շտամներ	Ազոտի ֆիքսման ունակությունը	A 42-10	A 51-M1
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	35-2	-	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P5-32	-	0	0
<i>Mycobacterium vaccae</i>	21	-	0	0
<i>Bacillus badius</i>	30	-	12	0
<i>Bacillus licheiformis</i>	12	-	26	17
<i>Bacillus megaterium</i>	21	-	13	18
<i>Bacillus circulans</i>	55	-	18	13
<i>Bacillus pumilus</i>	43	-	22	18
<i>Bacillus subtilis</i>	19	-	23	16
<i>Bacillus</i> sp.	A13-2	+	0	0
<i>Bacillus</i> sp.	A37-1	+	0	0
<i>Bacillus</i> sp.	A45-1	+	0	0
<i>Bacillus</i> sp.	A12_1	+	0	0
<i>Azotobacter chroococcum</i>	C-6	+	0	0
<i>Azotobacter chroococcum</i>	B-6111	+	0	0
<i>Klebsiella</i> sp.	58-1	+	0	

Օւսմորություն: «+» ֆիքսում է ազոտը, «-» չի ֆիքսում ազոտը:

Բերված տվյալները հաստատում են հայտնի այն օրինաչափությունը, որ բնական ընտրության ճանապարհով առաջացած միկրոբային ցենոզներում գործում են մանրէների յուրահատուկ փոխհարաբերության մեխանիզմներ [6]:

Կատարված ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ Հայաստանի ցածրադիր և մախալեռային շրջաններում մշակվող հացազգիների արմատային համակարգում հիմնականում գերակշռում են *Azotobacter* կամ *Bacillus* և 1-2

ուղեկցող մանրէներ պարունակող պարզ կազմով ՍՄՀ-ները: Դրանց համեմատ ավելի քիչ են տարածված երկու դիագնոտրոֆներից (*Azotobacter-Bacillus*, կամ *Azotobacter-Azospirillum*) կազմված համակեցությունները. նրանց ուղեկցող մի քանի մանրէների հետ միասին. Սակայն հետագա փորձարկումներից պարզվեց, որ իրենց էֆեկտիվությամբ առանձնապես աչքի են ընկել ավելի հազվադեպ հանդիպող. մրցունակ. տարբեր դիագնոտրոֆներից և նրանց ուղեկցող այլ բակտերիաներից բաղկացած ազոտֆիքսող մանրէների բարդ կազմով համակեցությունները: Նման համակեցությունները, ինչպես նաև մեր կողմից փորձարկված A42 և A66 ՍՄՀ-ները զործնական կիրառման մեծ հեռանկարներ են ստեղծում: Բնական պայմաններում այդ համակեցությունները իրենց մրցունակության շնորհիվ կարող են դոմինանտել հողում զարգացող աբորիգեն այլ մանրէների նկատմամբ և զգալիորեն նպաստել բույսերի զարգացմանը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Басилишвили Л.А., Пущбидзе Н.Н. Собр.м. АНГССР. 1, 14, 3, 617-620, 1984.
2. Белимов А.А., Кожемяков А.П. Бюллетень ВНИИ с/х микробиологии, 51, 26, 30, 1988.
3. Берестецкий О.А., Васюк Л.Ф., Элиашвили Т.А. Микроорганизмы как компонент биосенsoза, Материалы Всес. симпози. Алма-Ата 27-29 сент. 1982, Алма-Ата, 186-187, 1982.
4. Глаголева О.Б., Умаров М.М., Злотничков А.К. Микробиология, 63, 2, 221-227, 1994.
5. Красильников И.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М., 1958.
6. Одум Ю. Основы экологии, М., 1975.
7. Умаров М.М., Шабазов В.П., Смолин В.Ю., Мамедов И.М. Почвоведение, 9, 70-75, 1993.
8. Чумаков М.И., Горбань В.В., Ковлер Л.Е. и др. Микробиология, 61, 1, 92-103, 1992.
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1, 1984.
10. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, 1986.
11. Cakmakci M. Lutu, Evans H.J., Seidler R.J. Plant and Soil. 61, 1-2, 53-63, 1983.
12. Hardy R.W., Holsten R.D., Jochson E.K., Burns R.C. Plant Physiol. 43, 1185-1207, 1968.
13. Kundy B.C., Gaur A.C. Plant and Soil. 57, 2- 3, 223-230, 1980.
14. Lethbridge G., Davidson M.S. Soil Biol. and Biochem. 15, 3, 365-374, 1983.
15. Patriquin D.G., Dobereiner J., Jain D.K. Can. J. Microbiol. 29, 8, 900-915, 1983.
16. Seldin L., Van Elsas J.D., Penido Elisa G.G. Plant and Soil, 70, 249-255, 1983.
17. Seldin L., Van Elsas J.D., Penido Elisa G.G. International Journal of Systematic Bacteriology, 34, 4, 451-456, 1984.
18. Tippannovar C.M., Reddy T.K. Ramachadra. Curr. Sci. (India), 58, 23, 1342-1343, 1989.

Поступили 17.IV.2000