



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(62), 2010

**ԱՅԵՏԻԼԵՆԱՅԻՆ ԵՂԱՆԱԿՈՎ ԱԶՈՏ ՖԻՔՍՈՂ
ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ
ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՆԻՏՐՈԳԵՆԱԶՄԱՅԻՆ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ**

Վ.Գ. ՆԻԿՈՂՈՍՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի օ մանրէների ավանդադրման կենտրոն

Հետազոտվել են ագեստիլենային եղանակով ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվությամբ օժտված դիագոտրոֆների և դրանց համակեցությունների ընտրության հարցերը: Առաջարկվել է հեղուկ սննդամիջավայրում ակտիվ կուլտուրաների ընտրության հեշտացված եղանակ:

Նիտրոգենազային ակտիվություն - դիագոտրոֆներ - համակեցություն - ազոտֆիքսում

Ацетиленовым методом изучались вопросы отбора диазотрофов и их сообществ, наделенных высокой азотфиксирующей активностью. Предложен облегченный способ отбора активных культур в жидких средах.

Нитрогеназная активность – диазотрофы – сообщество – азотфиксация

The problems for selecting the diazotrophs and communities with high nitrogen-fixing activity were studied by the acetylene method. A simplified method has been suggested for choosing the active cultures in the liquid media.

Nitrogenase activity – diazotrophs – community – nitrogen fixation

Վերջին տասնամյակներում լայն տարածում է ստացել ազոտի ֆիքսման ակտիվության որոշման համար օգտագործվող ագեստիլենային եղանակը, որի արդյունքում ներկայումս այդ մեթոդի առանձնահատկությունների վերաբերյալ հայտնի են արժեքավոր շատ աշխատանքներ: Չնայած որոշակի ձեռքբերումների՝ այնուամենայնիվ ազոտֆիքսող միկրոօրգանիզմների, կամ նրանց համակեցությունների հիմնահարցը ագեստիլենային եղանակով ազոտի ֆիքսման ակտիվության ճշգրիտ որոշման որոշակի դժվարությունների հետ է առնչվում: Ցույց է տրված, որ որոշ միկրոօրգանիզմներ ունակ են օքսիդացնելու ինչպես ագեստիլենը և էթիլենը, այնպես էլ սինթեզելու դրանք [7]: Հայտնի է նաև, որ ագեստիլենի վերականգնման արագությունը մեծ չափով պայմանա-վորված է կուլտուրաների զարգացման պայմաններից [5], որի հետևանքով՝ ըստ վերականգնված էթիլենի ազոտի ֆիքսման ակտիվության վերահաշվարկի գործակիցը կարող է տատանվել 2,3-25-ի սահմաններում [8,9]: Բացի այդ, կան տեղեկություններ, որ ագեստիլենը ճնշում է միկրոօրգանիզմների զարգացումը [6], իսկ էթիլենի ճնշիչ ազդեցությունը հաստատվել է մեր ուսումնասիրություններում [3]: Ակնհայտ է, որ ներկայացվածը կարող է փորձերի սխալ արդյունքների ստացման պատճառ հանդիսանալ:

Նախկինում մեր կատարած ուսումնասիրությունները ցույց էին տվել, որ ագեստիլենային եղանակով ազոտոբակտերի ազոտի ֆիքսման ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ է նիտրոգենազային ակտիվությունը որոշել նրա զարգացման ընթացքում ամեն օր, քանի որ միայն այդ դեպքում են ստացված արդյունքները համընկնում ազոտի ընդհանուր

քանակությամբ (Կելդալի մեթոդ) որոշված արդյունքներին [4]:

Չնայած ներկայացված եղանակի ճշտությանը, այդ մեթոդը հնարավոր է օգտագործել միայն փորձարկվող կուլտուրաների սահմանափակ քանակի դեպքում: Իսկ ինչպես վարվել ակտիվ կուլտուրաների սելեկցիայի նպատակով մասսայական ուսումնասիրությունների դեպքում, երբ գործ ունենք հարյուրավոր կուլտուրաների հետ: Այդ հարցի պարզաբանման վերաբերյալ մեր ուսումնասիրությունների արդյունքները բերվում են սույն հոդվածում:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրությունների նյութ են հանդիսացել Հայաստանի տարբեր հողերից և այնտեղ մշակվող ցորենի ու գարու արմատային զոնայից նախնիներում մեր կողմից մեկուսացված ոչ սինթետիկ ազոտֆիքսատորները, ազոտֆիքսող միկրոօրգանիզմների համակցությունները [ԱՄՀ], ինչպես նաև ՀՀ ԱԱ Միկրոբիոլոգիայի և մանրէների ավանդադրման կենտրոնում պահպանվող *Azotobacter chroococcum* - B-6111 շտամը [1,3]:

ԱՄՀ-ների և դիագնոստիկների նիտրոգենազային ակտիվությունը Վինոգրադսկու հեղուկ սննդամիջավայրում (3-5 և ավելի կրկնողությամբ) որոշել ենք ացետիլենային եղանակով [1,2,7,8]: Այդ նպատակով 15 մլ տարողության 3 մլ սննդանյութ պարունակող պենիցիլինի սրվակները վարակել ենք տարբեր համակցություններով կամ դիագնոստիկ-ներով, այնուհետև կուլտուրաների աճեցումը 270-ում, հիմնականում 11 օր տևողությամբ իրականացվել է աերոբ և միկրոաերոբիկ պայմաններում: Աերոբ պայմանների դեպքում պենիցիլինի սրվակները փակվել են բամբակյա խցաններով և ամեն օր պարբերաբար բամբակյա խցանները փոխարինվել են ռետինե խցաններով, ներմուծվել ացետիլեն ու 1ժ հետո որոշվել նիտրոգենազային ակտիվությունը: Այնուհետև ռետինե խցանները նորից փոխարինվել են բամբակյա խցաններով և շարունակել կուլտուրաների աճեցումը, հաջորդ օրերին կրկնելով ներկայացվածը:

Փորձարկող նույն կուլտուրաները միկրոաերոբիկ պայմանների դեպքում վարակման օրը պենիցիլինի սրվակների բամբակյա խցանները փոխարինվել են ռետինե խցաններով, ներմուծվել ացետիլեն և այն պահպանվել կուլտուրաների աճեցման ամբողջ ժամանակաշրջանում, իսկ նիտրոգենազային ակտիվությունը որոշվել է միայն զարգացման III, VI և XI օրերին:

Արդյունքներ և քննարկում: Մեր բազմամյա ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ հեղուկ սննդամիջավայրում տարբեր ԱՄՀ-ների և առանձին դիագնոստիկների նիտրոգենազային ակտիվության պոտենցիալը աերոբ և միկրոաերոբիկ պայմաններում զարգանալիս միմյանցից մեծ չափերով չեն տարբերվում: Այդ ուղղությամբ կատարված բազմաթիվ հետազոտությունների արդյունքների մի մասը զետեղված է աղ. 1-ում և 2-ում:

Աղյուսակ 1. Ազոտֆիքսող մանրէների և նրանց համակցությունների ազոտի ֆիքսման դինամիկան աերոբ պայմաններում (նիտրոգենազ՝ ային ակտիվությունը, մկ/մոլ C_2H_2/d)

ԱՄՀ-ներ, դիագնո- ստիկներ	Օրեր											Հնդամներ
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VII I	IX	X	XI	
ԱՄՀ C65	0,1	0,3	1,3	1,5	1,0	0,7	0,3	0,2	0,1	0,1	0,0	5,6
ԱՄՀ 07-62	0,2	0,5	1,2	1,6	1,1	0,8	0,4	0,2	0,1	0,0	0,0	6,1
A65 ն-1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,2	0,1	3,3
A.chr.B-6111	0,2	0,4	0,6	0,3	0,3	0,5	0,8	0,4	0,4	0,1	0,1	4,1
A42 Bac.-1	0,1	0,0	0,1	0,3	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	1,5

Աղյուսակ 2. Ազոտֆիքսող մանրէների և նրանց համակցությունների ազոտֆիքսացիան զարգացման տարբեր օրերում միկրոաերոբիկ պայմաններում (մկ/մոլ C_2H_2 , գումարային քանակ՝ ըստ նշված օրերի)

ԱՄՀ-ներ, դիագնո- ստիկներ	Օրեր			Մաքսիմում ակտիվությունը
	III	VI	XI	
ԱՄՀ C65	1,5	5,2	5,1	5,2
ԱՄՀ 07-62	4,1	5,7	5,6	5,7
A65 ն-1	0,9	3,9	3,6	3,9
A.chr.B-6111	1,2	4,2	3,9	4,2
A42 Bac.-1	0,2	1,5	1,4	1,5

Ստացված տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ պենիցիլինի սրվակներում ներմուծված ագեսիվների քանակության (~ 6%) տևական առկայությունը գրեթե չի ձևում ազոտֆիքսող միկրոօրգանիզմների աճեցողությանը, որի հետևանքով աղ. 2-ում ներկայացված տվյալները զգալիորեն չեն տարբերվել նույն կուլտուրաների աներոբ պայմաններում զարգանալիս ստացված տվյալներից (աղ.1), երբ փորձարկված կուլտուրաներն ամեն օր միայն 1ժ են ենթարկվել ներմուծված ագեսիվների ներգործությանը:

Աղյուսակներում ներկայացված օրինաչափությունները պահպանվել են հետազոտված ազոտֆիքսատորների ճնշող մեծամասնության մոտ: Նկատվել են նաև բացառություններ, երբ որոշ ԱՄՀ-ներում նիտրոգենազային ակտիվությունն իր մաքսիմումին է հասել աճեցողության XV, նույնիսկ XX օրը: Ավելի հազվադեպ նկատվել է նաև համակեցությունում նիտրո- գենազային ակտիվության երկու մաքսիմում, որը հավանաբար նրանց երկարատև համատեղ զարգացման ընթացքում տեղի ունեցող նյութափոխանակության բարդ պրոցեսների արդյունք է հանդիսանում:

Աղ.2-ում բերված տվյալներից նկատվում է, որ հետազոտված կուլտուրաների նիտրոգենազային ակտիվությունն իր մաքսիմումին է հասնում VI օրը, իսկ հետո մասամբ նվազում: Մեր ուսումնասիրությունների ընթացքում որոշ ազոտֆիքսատորների մոտ այդ նվազումը շատ ավելի մեծ է: Պատճառը պարզ է: Նույն սրվակից նմուշներ վերցնելիս գազերի քանակությունը պակսում է, կամ կուլտուրաների առաջացրած գազերի հետևանքով ռետինե խցաններից արտառոտ է տեղի ունենում, բացի այդ, հատկապես ԱՄՀ-ների դեպքում հնարադր է նաև ագեսիվների և էթիլենի օգտագործում և այլն:

Այսպիսով, հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ աղյուսակներում ներկայացված օրինաչափությունները երկարատև փորձարկումների ընթացքում նկատվել են հետազոտված ազոտֆիքսատորների ճնշող մեծամասնության մոտ, կարելի է եզրակացնել, որ ազոտֆիքսող մանրէների և նրանց համակեցությունների ակտիվ կուլտուրաների ընտրության նպատակով ներկայացված այս եղանակը (աղ. 2) նպատակահարմար է օգտագործել մասսայական ուսումնասիրությունների ժամանակ, որի դեպքում տնտեսվում է զգալի նյութական ռեսուրսներ, նվազում է անհրաժեշտ աշխատանքների ծավալը և, ամենակարևորը, ծախսվում է ավելի քիչ ժամանակ: Այս եղանակով ընտրված ակտիվ ազոտֆիքսատորներն ու նրանց համակեցությունները հետագայում ավելի մանրակրկիտ կարելի է ուսումնասիրել նաև հանրահայտ այլ մեթոդներով:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Նիկորոյան Վ.* Հիագոտրոֆների և նրանց համակեցությունների պեկտինի յուրացման ու ազոտի ֆիքսման ակտիվության մասին. Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 60, 1-2, 188-191, 2008.
2. Метод, рекоменд. по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценке их эффективности. Л., 18с. 1979.
3. *Никогосян В.Г.* Азотфиксирующая способность антибиотикоустойчивых мутантов азотобактера. Биолог. журн. Армении, 34, 269-273, 1981.
4. *Никогосян В.Г.* Сравнительная оценка азотфиксирующей активности азотобактера ацетиленовым методом и по общему азоту. Микробиология, 52, 4, 848-850, 1983.
5. *Понкратова Е.М.* Участие азотфиксирующих водорослей в накоплении азота в почве. Изв. АН СССР, Сер. биол. 2, 188, 1979.
6. *Умаров М.М.* Ассоциативная азотфиксация, М., Изд. Моск. ун-та, 132с. 1986.
7. *Федоровна Р.И., Милехина Е.И., Илюхина Н.И., Бражников В.В.* К вопросу по применению ацетиленового метода для определения азотфиксирующей способности почв. Изв. АН СССР, Сер. биол. 1, 106, 1973.
8. *Hardy R.W., Holsten R.D., Jackson E., Burns R.C.* The Acetylene-Ethylene Assay for N₂ Fixation. Plant Physiol., 43, 1185, 1968.
9. *Hardy R.W., Burns R.C., Holsten R.D.* Application of the Acetylene-Ethylene Assay for Measurement of Nitrogen Fixation. Soil Biol. and Biochem., 5, 47, 1973.

Ստացվել է 15.12.2008