ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF ARMENIA
ДОКЛАДЫ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ REPORTS

Հատոր 111 2011 № 3

ՄԱՆՐԷԱԲԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

ՈՒԴԴ 579.841.31+579.232

Ֆ. Ս. Մաթևոսյան, Թ. Հ. Ստեփանյան, Ս. Հ. Հարությունյան, Ն. Մ. Ալեքսանյան

Պալարաբակտերիաների ադհեզիոն ունակության մասին

(Ներկայացված է ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ Ժ. Ի. Հակոբյանի կողմից 19/VIII 2010)

Առանցքային բառեր՝ *պալարաբակտերիաներ, ադհեզիա, արմատածիլեր, նիտրագին*

Պալարաբակտերիաների և թիթեռնածաղկավոր բույսերի յուրահատուկ փոխազդեցությամբ իրականացվող մթնոլորտային ազոտի սիմբիոտիկ ֆիքսացիան շարունակում է մնալ բազմաթիվ հետազոտողների ուշադրության կենտրոնում: Ֆիզիոլոգիական-կենսաքիմիական լայնածավալ աշխատանքների հետ մեկտեղ, օգտագործելով ժամանակակից մեթոդներ, հատուկ ուշադրություն է դարձվում այս խնդրի մեխանիզմի, ինչպես նաև մոլեկուլային - գենետիկական տեսակետների պարզաբանմանը:

Պալարաբակտերիաների ադհեզիայի երևույթը հիմնականում ուսումնասիրվում է տեր-բույսերի հետ նրանց յուրահատուկ փոխազդեցությունը, տեսակային յուրահատկությունը և վիրուլենտությունը բնութագրելու, ինչպես նաև շտամների ընտրության նպատակով:

Պալարաբակտերիաների յուրահատուկ շտամներն ավելի լավ են ադսորբցվում իրենց տեր-բույսերի արմատների մակերեսին, քան ոչ յուրահատուկ շտամները: Հացազգիների արմատների վրա պալարաբակտերիաների ադհեզիան կախված է շտամային առանձնահատկություններից, մշակաբույսերի տեսակից և սորտից [1]: Առաջնային խնդիրը, որը պետք է լուծել, կպչողականությունը պայմանավորող բակտերիայի և բույսի մակերեսային բաղադրամասերի իդենտիֆիկացիան է, որը կբերի բակտերիայի և բույսի ցանկալի ասոցիացիաների ստեղծման [2]:

Զանազան կենսապարարտանյութերի ստացման ժամանակ օգտագործվում են բազմաթիվ նյութեր՝ մելաս, բենտոնիտ, տորֆ, ցեոլիտ և այլն [3,4], որոնք բարձրացնում են նրանց կպչողականությունը: Ադհեզիոն հատկության շնորհիվ միկրոօրգանիզմներն ավելի հեշտությամբ են հարմարվում շրջակա միջավայրին՝ գոյատևելով տարբեր էկոտիպերում և անբարենպաստ պայմաններում [5,6]: Սակայն որոշ նյութեր բացասաբար են ազդում շրջակա միջավայրի վրա և մեծացնում են պարարտանյութի ինքնարժեքը, այդ պատճառով

նպատակահարմար է ընտրել պալարաբակտերիաների այնպիսի տեսակներ և շտամներ, որոնք բարձր վիրուլենտության, ակտիվության, էֆեկտիվության հետ մեկտեղ օժտված լինեն նաև բնականից բարձր ադհեզիոն հատկություններով:

Միկրոօրգանիզմների ադհեզիան պայմանավորված է բջիջների աճման փուլերով: Ադհեզիան հասնում է առավել մեծության բջիջների զարգացման միջին փուլում, որի ժամանակ նրանց մակերեսին առաջացած գոյացությունները (ելուստներ, մտրակներ) փոփոխվում են և՛ քանակապես, և՛ որակապես, որի շնորհիվ նրանք իրենց վերջույթներով ավելի ամուր են կառչում ադսորբենտին: Կարևոր գործոններ են նաև սննդամիջավայրի կազմը, pH -ը, ջերմաստիճանը, մանրէների հիդրոֆոբ և հիդրոֆիլ վիճակները [7]:

Ներկայացվող աշխատանքի նպատակն է ազոտֆիքսող մանրէների լաբորատորիայում պահպանվող պալարաբակտերիաների տարբեր տեսակների հավաքածուից ընտրել առավել բարձր ադհեզիոն հատկություններով օժտված շտամներ՝ հողը ազոտով հարստացնող կենսապարարտանյութի մեջ օգտագործելու համար:

Նյութեր և մեթոդներ: Հետազոտվել է Հայաստանի տարբեր գոտիներից մեկուսացված ոսպի, ոլոռի, կորնգանի, սիսեռի պալարաբակտերիաների 30 շտամ:

Միկրոօրգանիզմների ադսորբցիայի օրինաչափությունը սկզբնական շրջանում հարմար է ուսումնասիրել թափանցիկ ադսորբենտների վրա՝ ապակի, մոդիֆիկացված ապակյա մակերեսներ, որը հնարավորություն է տալիս կատարելու մոդելային փորձեր՝ հեշտացնելով հետագա աշխատանքը ավելի բարդ, յուրահատուկ ադսորբենտների հետ աշխատելիս:

Պալարաբակտերիաների ադհեզիան ուսումնասիրվել է սովորական և կվարցի ապակիների, ինչպես նաև համապատասխան թիթեռնածաղկավոր բույսերի արմատածիլերի մակերեսներին: Կիրառվել են ջրի մեջ ողողելու և կենտրոնախույս ուժով ներգործելու մեթոդները: Ադհեզիան բնութագրվել է ադհեզիոն թվով (Y_F), որը հավասար է տվյալ պոկող ուժի ներգործությունից հետո ադսորբենտի վրա մնացած բջիջների թվին (N), նրանց սկզբնական թվի (N_0) համեմատությամբ արտահայտված տոկոսով $Y_F = \frac{N.100}{N_0}$ [8]: Փորձի համար օգտագործվել են ոսպի, ոլոռի, կորնգանի և սիսեռի 2սմ երկարություն և հաստություն ունեցող, հավասար արմատամագիկներով ծիլեր, որոնք ընկղմվել են պալարաբակտերիաների սուսպենզիաների մեջ, ապա կատարվել է պալարաբակտերիաների դեսորբցիա ЦВР-1 ցենտրիֆուգայով: Ադսորբցված բջիջների քանակը որոշվել է տրորված արմատածիլերի սուսպենզիաներում աստիճանական նոսրացումների և լուսային միկրոսկոպով ուղղակի հաշվելու մեթոդներով:

Պալարաբակտերիաների ադհեզիան որոշվել է 3 բնութագրող չափանիշներով

- միկրոօրգանիզմների 24, 48, 72-ժամյա աճ
- ադսորբենտի հետ նրանց շփման դինամիկա՝ 5,10, 20, 30, 60,120 րոպե տևողությամբ

▪ գործադրված կենտրոնախույս ուժի տարբեր մեծություններ՝ 9000g, 14000g և 20000g:

Բոլոր փորձերը դրվել են 5-6 և ավելի անգամ, յուրաքանչյուր մեծություն ուսումնասիրվել է 3-4 կրկնողությամբ:

Պալարաբակտերիաների ազոտֆիքսացիայի ակտիվությունը որոշվել է լաբորատոր, վեգետացիոն և դաշտային փորձերում աճեցված թիթեռնածաղկավոր բույսերի և նրանց պալարիկների նմուշներում, նախապես:

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրվել է ոլոռի, ոսպի և կորնգանի 26 շտամի ադհեզիան սովորական ապակու մակերեսին ջրում ողողելու մեթոդով: Անկախ տեսակային պատկանելությունից և ազոտֆիքսացիայի ակտիվությունից, բոլոր շտամներն էլ որոշակի չափերով ադսորբցվել են ապակու մակերեսին (աղյուսակ1): Ըստ որում ավելի ինտենսիվորեն ադսորբցվել են ոլոռի պալարաբակտերիաները. 1 սմ^2 մակերեսի վրա ադսորբցված բջիջների թիվը կազմել է 0.16-2.6մլն: Կորնգանի և ոսպի պալարաբակտերիաների դեպքում համապատասխանաբար 0.6-1.9 և 0.45-1.8մլն բջիջ:

Որոշվել է ոսպի պալարաբակտերիաների երկու շտամի ադհեզիան կվարցի ապակու մակերեսին կենտրոնախույս ուժով ներգործելու մեթոդով, բջիջների աճման տարբեր փուլերում (աղ. 2):

Աղյուսակ 1

Պալարաբակտերիաների ադհեզիան ապակու մակերեսին ջրում ողողելու մեթոդով (մլն/սմ^2)

Միկրոօրգանիզմներ, տեր- բույսեր		Շտամներ, համար	Ազոտֆիքսացիայի ակտիվությունը	Ադսորբցված բջիջների թիվը
Rhizobium leguminosarum	ոլոռ	5603,5601,5605	ակտիվ	1.8, 2.3, 2.6
		5611,5602,5605	" –"	0.16, 0.2, 1.3
		5658, 5607	ոչ ակտիվ	1.6, 2.2
	ոսպ	6018,6017	ակտիվ " –"	1.0, 1.1
		6020,6009,6007	" –"	1.6,1.7,1.8
		6019,6013,6008	ոչ ակտիվ	0.3, 0.45, 0.6
		6021,6012	" –"	1.4, 1.8
Rhizobium simplex	կորնգան	5922,5863	ակտիվ	0.68,0.88
		5881,5880, 5879	" –"	1.4, 1.8,1.9
		5888	ոչ ակտիվ	1.9
		5925,5894	" –"	0.6, 0.73

Նախնական սուսպենզիաները պարունակել են 5,0մլն բջիջ/մլ

Աղյուսակի տվյալները ցույց են տալիս, որ ոսպի պալարաբակտերիաների ուսումնասիրված երկու շտամների մոտ էլ ապակու 1 սմ^2 մակերեսին ադսորբցված բջիջների ամենաշատ քանակը նկատվում է նրանց 48-ժամյա աճի ժամանակ: Այսպես օրինակ, շտամ 6009-ի մոտ այն կազմում է – 1.15 մլն, շտամ 6020-ի մոտ՝ 0.94մլն բջիջ: Որևէ մեթոդով ներգործելուց հետո մակերեսներին մնացած, այսինքն՝ ամուր ադսորբցված, բջիջների պարզ քանակով դեռևս չի կարելի դատել ադհեզիայի մեծության մասին: Ավելի ճշգրիտ տվյալներ բջիջների և մակերեսների ամուր կապի մասին տալիս է Y_F մեծությունը, այսինքն՝ ադհեզիոն թիվը: Ոսպի շտամ 6020-ի ադհեզիոն թրվը հավասար է 52.2% -ի, շտամ 6009-ի

մոտ 50.0% : Ադհեզիայի ուժը, որը պահում է ոսպի պալարաբակտերիաները կվարցի ապակու մակերեսին, ինչպես երևում է աղյուսակի տվյալներից, ունի շտամային առանձնահատկություն: Ապակուն ադսորբցված շտամ 6020-ի բջիջների թիվն ավելի քիչ է շտամ 6009-ի համեմատությամբ, իսկ ադհեզիոն թիվն ավելի բարձր է :

Աղյուսակ 2

Ոսպի պալարաբակտերիաների ադհեզիան կվարցի ապակու մակերեսին կենտրոնախույս ուժով ներգործելու մեթոդով (մլն բջիջ/ սմ^2)

Շտամներ	Աճման տևողությունը, ժամ	Ադսորբցված բջիջների թիվը, N_0	Դեսորբցիայից հետո մնացած բջիջների թիվը, N	Ադհեզիոն թիվը, Y_F%
6009	24	1.3	0.5	38.4
	48	2.3	1.15	50.0
	72	1.4	0.38	27.0
6020	24	0.5	0.2	40.0
	48	1.8	0.94	52.2
	72	1.9	0.57	30.0

Քանի որ աշխատանքի նպատակը բարձր ադհեզիոն ունակությամբ օժտված շտամների ընտրությունն է, ուստի, մեր կարծիքով, ավելի հավանական տվյալներ կստացվեն, եթե պալարաբակտերիաների ադհեզիան ուսումնասիրվի համապատասխան թիթեռնածաղկավոր բույսերի արմատածիլերի մակերեսներին: Կիրառելով կենտրոնախույս ուժի տարբեր մեծություններ՝ ուսումնասիրվել է ոլոռի շտամ 5609-ի և կորնգանի շտամ 5881-ի ադսորբցիան տեր-բույսերի արմատածիլերի մակերեսներին, բջիջների 24, 48, 72-ժամյա աճի պայմաններում (աղ.3): Փորձերը ցույց են տալիս, որ պալարաբակտերիաների աճման տևողության փոփոխության հետ փոխվում է նաև մակերեսներին ամուր կպած բջիջների թիվը (Y_F): Ըստ որում առավել բարձր ադհեզիա նկատվում է միկրոօրգանիզմների 48-ժամյա աճի ժամանակ, որը ոլոռի շտամ 5609-ի մոտ կազմում է 56.0 և կորնգանի շտամ 5881-ի մոտ 54.1 %:

Բջիջների կպչողականության ամրության և շփման մակերեսի վրա ազդող ուժի մեծության որոշման համար ուսումնասիրվել է ոլոռի շտամ 5609-ի ադհեզիան ադսորբենտի հետ 5, 10, 20, 30, 60,120 րոպե շփման և 9000g, 14000g և 20 000g ազդող ուժի պայմաններում: Պարզվել է, որ ադսորբենտի հետ 30 րոպե շփման և կենտրոնախույս ուժի կիրառված 9000g մեծության դեպքում ուսումնասիրված շտամի ադհեզիոն թիվն ամենաբարձրն է՝ 53.0%:

Այնուհետև ուսումնասիրվել է ոլոռի, սիսեռի, կորնգանի և ոսպի 14 շտամի ադհեզիան արմատածիլերի մակերեսներին արդեն մեզ հայտնի պայմաններում, այսինքն, պալարաբակտերիաների 48-ժամյա աճի, ադսորբենտի հետ 30 րոպե շփման և 9000g ազդող ուժի մեծության պայմաններում (աղ.4):

Աղյուսակ 3

Ոլոռի և կորնգանի պալարաբակտերիաների ադհեզիան տեր-բույսերի արմատածիլերի մակերեսին միկրոօրգանիզմների աճի դինամիկայում (մլն բջիջ/ սմ^2)

Աճման տևողությունը, ժամ	Ադսորբցված բջիջների թիվը, N_0	Դեսորբցիայից հետո մնացած բջիջների թիվը, N	Ադհեզիոն թիվը, Y_F%
	Rhizobium leguminosarum 5609		
24	414.0	145.0	35.0
48	750.0	420.0	56.0
72	330.0	120.0	36.3
	Rhizobium simplex 5881		
24	700.0	330.0	47.1
48	720.0	390.0	54.1
72	700.0	300.0	43.0
84	430.0	180.0	41.8

Նախնական սուսպենզիաները պարունակել են 5.5 մլրդ բջիջ /մլ

Աղյուսակ 4

Պալարաբակտերիաների ադհեզիան տեր-բույսերի արմատածիլերի մակերեսներին միկրոօրգանիզմների 48-ժամյա աճի և 30 րոպե շփման պայմաններում (մլն բջիջ/ սմ^2)

Պալարա-բակտերիա-ների տեսակները	Տեր-բույսեր	Շտամներ	Ազոտֆիք-սացիայի ակտիվու-թյունը	Ադսորբցված բջիջների թիվը, N_0	Դեսորբցիայից հետո մնացած բջիջների թիվը, N	Ադհեզիոն թիվը Y_F%
Rhizobium leguminosarum	ոլոռ	5609, 5601	ակտիվ	700.0, 720.0	400.0, 410.0	57.1, 57.0
		5607	ոչ ակտիվ	730.0	410.0	56.1
	ոսպ	6018,6009 6020	ակտիվ	450.0, 500.0 560.0	210.0, 233.0 280.0	46.6, 46.6, 50.0
		6012, 6021	ոչ ակտիվ	410.0, 430.0	181.0, 210.0	44.1, 49.0
Rhizobium simplex	կորնգան	5880, 5879	ակտիվ	640.0, 660.0	340.0, 370.0	53.1, 56.0
		5925 , 5854	ոչ ակտիվ	380.0, 720.0	200.0, 360.0	53.0, 50.0
Mezorhizobium ciceri	սիսեռ	6042, 6050	ակտիվ	0.07, 0.07	0.025, 0.026	36.0, 37.1

Նախնական սուսպենզիան պարունակել է 5.5 մլրդ բջիջ/մլ

Իրենց տեր-բույսերի արմատածիլերի մակերեսներին ցուցաբերած ադհեզիոն ունակությամբ, մեր փորձի սահմաններում, ոլոռի պալարաբակտերիաներն առաջնային տեղ են գրավում, նրանք առանձնանում են պալարաբակտերիաների մյուս տեսակներից իրենց բարձր ադհեզիոն թվով, որը կազմում է 56.1-57.1%, կորնգանի պալարաբակտերիաները նույնպես օժտված են բարձր ադհեզիոն ունակությամբ 50.0–56.0%: Ոսպի պալարաբակտերիաների մոտ ադհեզիոն թիվը 44.1–50.0% է, իսկ սիսեռի պալարաբակտերիաները փոքր-ինչ զիջում են նախորդներին 36.0 – 37.1%:

Քննարկելով ստացված տվյալները կարելի է նշել, որ պալարաբակտերիաների ադհեզիայի մեծության համար կարևոր բնութագրող գործոններ են միկրոօրգանիզմների աճման փուլերը, որը մեր փորձերում էքսպոնենցիալ փուլն է (48 ժամ), ադսորբենտի հետ բջիջների շփման տևողությունը՝ 30 րոպե, և գործադրված կենտրոնախույս ուժի 9000g մեծությունը: Ուժը, որը պահում է բջիջները տեր-բույսերի արմատածիլերի մակերեսների վրա, կախված է նաև ուսումնասիրված պալարաբակտերիաների տեսակներից: Ինչպես արդեն նշվեց աղ.3–ում, ոլոռի և կորնգանի պալարաբակտերիաների մոտ այն ավելի մեծ է, քան ոսպի և սիսեռի: Կա նաև շտամային առանձնահատկություն, որը նշվում է աղ.2-ում:

Փորձերից կարելի է եզրակացնել, որ պալարաբակտերիաների ադհեզիոն ունակությունը չի համահարաբերակցվում նրանց ազոտֆիքսացիայի ակտիվության հետ: Նույնատիպ տվյալներ կան նաև այլ հեղինակների աշխատանքներում, որտեղ ցույց է տրված, որ առվույտի և ոլոռի պալարաբակտերիաների ադսորբցվելու ունակությունը տեր-բույսերի արմատների վրա կապված չէ նրանց վիրուլենտության հետ [1, 9]:

Կատարված աշխատանքի արդյունքում ընտրվել են բարձր ադհեզիոն ունակությամբ օժտված ոլոռի և կորնգանի շտամներ, որոնք օգտագործվել են հողում ազոտ կուտակող "Նիտրագին" կենսապարարտանյութի պատրաստման ժամանակ: Հայաստանի տարբեր հողակլիմայական պայմաններում կատարված փորձարկումները ցույց են տվել, որ մեր կողմից օգտագործված "Նիտրագին" կենսապարարտանյութն ապահովում է թիթեռնածաղկավոր բույսերի հետ ակտիվ սիմբիոզ, բարելավում է բույսերի աճը, դիմադրողականությունը, ավելացնում է ազոտի քանակը հատիկում և կանաչ զանգվածում[10]:

ՀՀ ԳԱԱ միկրոբիոլոգիայի և մանրէների ավանդադրման կենտրոն

Ֆ. Ս. Մաթևոսյան, Թ. Հ. Ստեփանյան, Ս. Հ. Հարությունյան, Ն. Մ. Ալեքսանյան

Պալարաբակտերիաների ադհեզիոն ունակության մասին

Որոշվել է պալարաբակտերիաների ադհեզիան ապակու և թիթեռնածաղկավոր բույսերի արմատածիլերի մակերեսներին՝ կիրառելով կենտրոնախույս ուժով ցենտրիֆուգելու մեթոդը: Ցույց է տրված, որ պալարաբակտերիաների ադհեզիայի մեծությունը կախված է բակտերիայի տեսակից, շտամից, հասակից, ադսորբենտի հետ նրա շփման տևողությունից և գործադրված կենտրոնախույս ուժի մեծությունից: Պալարաբակտերիաների ազոտֆիքսացիայի ակտիվության և ադհեզիայի միջև համահարաբերակցություն չի հայտնաբերվել: Հողը հարստացնող "Նիտրագին" կենսապարարտանյութի պատրաստման համար օգտագործվել են *Rhizobium leguminosarum* և *Rh. simplex* պալարաբակտերիաների շտամները, որոնք օժտված են բարձր ադհեզիոն հատկությամբ:

Ф. С. Матевосян, Т.У. Степанян, С.А. Арутюнян, Н.М. Алексанян

Об адгезивной способности клубеньковых бактерий

С применением метода воздействия центробежной силы центрифугирования определена адгезия клубеньковых бактерий на поверхности стекла и корневых проростков бобовых растений. Показано, что величина адгезии клубеньковых бактерий зависит от вида, штамма, возраста бактерий, времени контакта с адсорбентом и величины центробежной силы. Корреляция между активностью азотфиксации и адгезией клубеньковых бактерий не установлена.

Для изготовления землеудобрительного препарата "Нитрагин" использованы штаммы *Rhizobium leguminosarum* и *Rh. simplex*, обладающие высокой адгезивной способностью.

F. S. Matevosyan, T. H. Stepanyan, S. H. Harutunyan, N. M. Alexanyan

On Adhesion Activity of Nodule Bacteria

The adhesion of nodule bacteria on glass and legume plant root shoots has been determined by method of centrifugal forces. It has been shown that adhesion value of nodule bacteria depends on species, strain, age of bacteria , contact time with adsorbent and centrifugal forces value Correlation between nitrogen fixation activity and adhesion of nodule bacteria has not been revealed

The strains of *Rhizobium leguminosarum* and *Rh. simplex* with high adhesion ability have been used for preparation of bacterial fertilizer "Nitragin".

Գրականություն

1. *Аввакумова Е. Н., Арутюнян С. А.* - Биолог. ж. Армении.1990. Т. 43. N2. С.116-119

2. *Dazzo F.B.* - Microbial Adhesion and Aggregation. Workshop. Berlin 1984. Jan.15-20. P. 85-93.

3. *Налбандян А. Д., Аветисян В.А.* - Биолог. ж. Армении 1988. Т. 41. N2. С.147-149

4. *Aleksanyan N., Stepanyan T., Harutyunyan S., Matevosyan F., Akopian J., Saghiyan A.* - Conference: Biotechnology in Armenia &ISTC contribution, Tsakhkadzor 2008. Sept.28-Oct.-02. P.198-199.

5. *Николаев Ю.А., Проссер Дж.И.* - Микробиология. 2000. Т. 69. N2. С. 231-236

6. *Fletcher M.* In: Bacterial adhesion (Molecular and ecological diversity). New York: Wiley – Liss. 1996. P. 1-24.

7. *Самонин В.В., Еликова Е.Е.*-Микробиология. 2004. Т. 73. N6. С. 810-816.

8. *Звягинцев Д. Г., Перцовская А.Ф., Яхин Е.Д., Авербах Э.И.* - Микробиология. 1971. Т.40. N6. С. 1024-1028.

9. *Anolles G. C., Fevelukes G.* - Appl. and Environm. Microbiol. 1986. V. 52. N2. P. 371-376.

10. *Pueppke S. G.* - Plant Physiol. 1984. V. 75. N4. P. 924-928.