



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3 (72), 2020

**AZOTOBACTER CHROOCOCCUM-ի ԶԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ
ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ԱՆՏԱՌԱՅԻՆ ԴԱՐՉՆԱԳՈՒՅՆ ՅՈՂԵՐՈՒՄ
BACILLUS THURINGIENSIS ՏԵՍԱԿԻ ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ
ՄԻՋԱՏԱՍՊԱՆՆԵՐՈՎ ՑՈՂՈՒՄԻՑ ԴԵՏՈ**

Ե.Ն. ՉԱՊԱՆՅԱՆ¹, Ս.Յ. ԶԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ², Մ.Ա. ՍԱՐԳՍՅԱՆ¹

¹ Սննդամթերքի անվտանգության ոլորտի ռիսկերի
գնահատման և վերլուծության գիտական կենտրոն
elene.chapanyan@mail.ru

² ԶԳԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» գիտաարտադրական կենտրոն

Երկամյա հետազոտություններով հաստատված է, որ *Bacillus thuringiensis* (Bt) տեսակի բակտերիական միջատասպաններով ցողված և չցողված (ստուգիչ) անտառային դարչնագույն հողերի *Azotobacter chroococcum*-ի զարգացման քանակությունը էշի ագարային սննդամիջավայրի վրա հունիսից սեպտեմբեր կրում է դինամիկական փոփոխություն. առավելագույն և նվազագույն քանակությունները դրսևորվելով համապատասխանաբար հունիսին և սեպտեմբերին:

Բակտերիական միջատասպաններով ցողված և չցողված անտառային դարչնագույն հողերից մեկուսացված *Az. chroococcum*-ի ձևաբանական և ֆիզիոլոգիական ցուցանիշները եղել են նույնական:

Փորձի սխալի և Ստյուդենտի $t_{\text{գախանիշի}}$ -ի ցուցանիշներով հաստատված է, որ գիտափորձերի արդյունքները հավաստի են և Bt տեսակի բակտերիաներով ցողված և չցողված (ստուգիչ) անտառային դարչնագույն հողերում առկա *Az. chroococcum*-ի քանակությունների միջև չկա հավաստի տարբերություն:

Bacillus thuringiensis տեսակի միջատասպաններ – ցողում – *Az. chroococcum* – անտառային
դարչնագույն հողեր – վիճակագրական ցուցանիշներ

Двухлетними исследованиями установлено, что в неопрыснутых (контроль) и опрыснутых бактериальными инсектицидами вида *Bacillus thuringiensis* (Bt) коричневых лесных почвах количество колоний *Azotobacter chroococcum* на Эшби агаровой среде претерпевает динамические изменения: максимальное и минимальное количество наблюдается соответственно в июне и сентябре.

Az. chroococcum, выделенные из опрыснутых и неопрыснутых (контроль) коричневых лесных почв, по морфолого-физиологическим показателям были идентичными.

С помощью ошибок опыта и $t_{\text{критерия}}$ Стьюдента установлено, что результаты опытов достоверны и нет достоверных различий между численностью *Az. chroococcum* в неопрыснутых и опрыснутых Bt бактериями коричневых лесных почвах.

Инсектициды вида *Bacillus thuringiensis* – опрыскивание – *Az. chroococcum* – коричневые лесные почвы – статистические показатели

Upon the two-year investigations it has been proved that in the unsprayed brown forest soils (control) and in those sprayed with bacterial insecticides of *Bacillus thuringiensis* (Bt) type, the quantity in the colonies of the *Azotobacter chroococcum* is undergoing dynamical changes from June to September, demonstrating maximum and minimum amounts in June and September respectively.

The morphological and physiological indicators of the *Az. chroococcum* isolated from the unsprayed brown soils and from those sprayed with the bacterial insecticides have been proved identical.

Through the indices of experimental error and Student's *t*-test it has been proved that the results of the scientific experiments are valid and that there isn't any significant difference between the colonial quantities of *Az. chroococcum* in unsprayed brown forest soils and in those sprayed with the bacterial insecticide of Bt type.

*Insecticides of Bacillus thuringiensis type – spraying – Az. chroococcum –
brown forest soils – statistical indices*

Ազոտը կենսածին կարևոր տարր է, որը ներառված է բույսերի և կենդանիների կենսաքանոնային կարևոր նշանակություն ունեցող միացությունների (ամիններ, պեպտիդներ, ամինաթթուներ, սպիտակուցներ, նուկլեինաթթուներ, որոշ վիտամիններ, ամիդներ, նիտրիլներ և այլն) կազմում [12, 20]: Նշյալ տարրը մասնակցություն ունի նաև բույսերի ֆոտոսինթեզի և շնչառության պրոցեսներում [20]:

Ազոտի պաշարը բնության մեջ չնայած անսպառ է, այնուհանդերձ, բույսերը հաճախ ազոտի սուր կարիք են զգում և նրանց ցածր բերքատվությունը հիմնականում պայմանավորված է ազոտի պակասությամբ: Դա բացատրվում է նրանով, որ բույսերն օժտված չեն օդի մոլեկուլային ազոտը ֆիքսելու (կապելու) և այն մատչելի ազոտի փոխարկելու ունակությամբ [13]:

Մթնոլորտային ազոտի կապումը և այն բույսերի համար մատչելի ձևի վերածումը կատարվում է ֆիզիկո-քիմիական [3, 14] և կենսաքանակային [14, 21]-եղանակներով: Ֆիզիկո-քիմիական եղանակով կապվում է մոլեկուլային ազոտի չնչին քանակը, որը նյութերի ընդհանուր շրջանառության պրոցեսում նշանակալից դերակատարում չունի [3], իսկ կենսաքանակային եղանակով գազային ազոտի ֆիքսումը տնտեսական խոշոր նշանակություն ունեցող պրոցես է, որի շնորհիվ բարելավվում է հողի բերրիությունը: Կենսաքանակային եղանակով մոլեկուլային ազոտի նշանակալից քանակություն կապում են սիմբիոտիկ պալարաբակտերիաներն ու ազատ ապրող հողաբնակ որոշ մանրէները [3, 14, 21]:

Հաստատված է, որ հողաբնակ ազատ ապրող մանրէներից հողը կապված ազոտով առավելապես հարստացնում են *Azotobacter* ցեղի ներկայացուցիչները, որոնք 1 գ օգտագործված շաքարի դիմաց կապում են մինչև 20 մգ ազոտ [18]: Ընդ որում, մոլեկուլային ազոտը կապվելիս բակտերիական բջջում սկզբից սինթեզվում է գլյուտամինաթթու, որի հիման վրա նաև մնացած ամինաթթուների տեսականին, վերջիններիս առկայությամբ՝ նաև սպիտակուցները [11]:

Բացի այդ, հայտնի է նաև, որ վնասակար միջատների դեմ պայքարի նպատակով օգտագործվող ինսեկտիցիդների աննշան մասն է խոցում վնասատուներին, իսկ հիմնական չափաբաժինը (60-99 %) տարբեր ուղիներով՝ ցողելիս, անձրևաջրերով ցողված սաղարթը լվացվելիս [17, 19], մահացած թրթուրների և հարսնյակների մարմիններից [6] ի վերջո ընկնում է հող:

Մեր հետազոտությունների արդյունքներում հաստատված է, որ կենսացենոզից մեր կողմից անջատած *Bacillus thuringiensis* (Bt) տեսակի միջատասպան շտամները ցողման արդյունքում անտառային դարչնագույն հող ընկնելիս, քանակության նվազման միտումով պահպանվում են 4 ամիս [2]: Ուստի, ելնելով վերոնշվածից, խնդիր ենք դրել երկամյա (2018-2019 թթ.) հետազոտություններով բացահայտել ցողման արդյունքում հող ընկած բակտերիական միջատասպանների ազդեցությունը հողի բերրության ցուցանիշ հանդիսացող *Azotobacter chroococcum*-ի քանակության վրա:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտության նյութ են հանդիսացել ագրոցենոզում բնականորեն մահացած թրթուրներից մեր կողմից մանրէաբանական եղանակով [8] անջատած Bt տեսակի բակտերիական Bt_{ECHS}-68, Bt_{ECHS}-73, Bt_{ECHS}-92 միջատասպանները (շտամների անվանակոչումը մեր կողմից), Ռուսաստանի Դաշնությունում թողարկված [Էպիդոցիդ (3000 ԱՄ/մգ) բակտերիական պատրաստուկը, Ապարանի տարածաշրջանի Ձորագլուխ համայնքին հարակից անտառային դարչնագույն հողերը, մոլեկուլային ազոտ ֆիքսող հողաբնակ *Azotobacter chroococcum*-ը: Անտառփորձատեղամասերում անտառային դարչնագույն հողի A հորիզոնում (2-14-սմ ուղղաձիգ խորություն) հումուսի պարունակությունը կազմել է 6,3 %, рН-ը՝ 6,4:

Azotobacter chroococcum-ի ձևավորած գաղութների բանակության դինամիկան վեգետացիայի շրջանում որոշվել է Էշբի ագարային սննդամիջավայրի վրա, որի պատրաստումը կատարվել է ըստ [8,15] մեթոդական ձեռնարկների: Bt տեսակի բակտերիական միջատասպաններով չցողված (ստուգիչ) և ցողված (փորձնական տարբերակներ) անտառային դարչնագույն հողերից մեկուսացված *Az. chroococcum* բակտերիական բջիջների չափագրումները կատարվել են ըստ մանրէաբանության գործնական և ուսումնամեթոդական ձեռնարկների [1,10], բակտերիական մտրակների ներկումը և ազոտաբակտերի կողմից ածխաջրերի յուրացումը որոշվել է ըստ Լաբինսկայայի [7], Նիտրատների և Նիտրիտների վերականգնումը, կատալազային, օքսիդազային և ամիլազային ակտիվության որոշումն ըստ՝ [10], Ժելատինի հեղուկացումն՝ ըստ [1, 10] մեթոդական ձեռնարկների:

Ստուգիչ տարբերակ առանձնացված անտառային դարչնագույն հողը ցողվել է լուծիչով՝ ջրով, որը միջատասպան բակտերիական կախույթ պատրաստելիս ևս ծառայել է որպես լուծիչ: Անտառտեղամասերում ցողված կուլտուրալ հեղուկի տիտրը (խտությունը) եղել է 600 մլն սպոր/մլ, իսկ աշխատանքային հեղուկի ծախսը՝ 1000 լ/հա: Անտառտեղամասերում ցողումները կատարվել են OBT-1A մակնիշի տրակտորային, առանձին դեպքերում՝ Ozdesan մակնիշի մեջքի սրկիչներով: *Azotobacter chroococcum*-ի ձևավորած գաղութների բանակական ցուցանիշները ելքարկվել են վիճակագրական վերլուծության [4, 5]:

Արդյունքներ և քննարկում: Երկամյա (2018-2019թթ.) լաբորատոր հետազոտություններով բացահայտված է, որ Էշբի ագարային սննդամիջավայրի վրա հողային կնձիկներից ձևավորված (աճած) *Azotobacter chroococcum*-ի գաղութների բանակությունը Bt տեսակի բակտերիական առանձին միջատասպաններով (Bt_{ECHS}-68, Bt_{ECHS}-73, Bt_{ECHS}-92, [Էպիդոցիդ) ցողված և չցողված (ստուգիչ) անտառային դարչնագույն հողերում, վեգետացիայի (բուսածման) շրջանում՝ (հունիսից սեպտեմբեր) կրում է դինամիկական փոփոխություն:

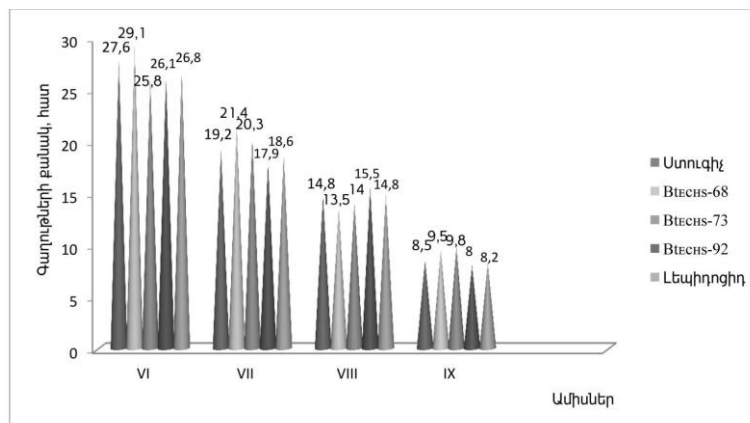
Գծապատկեր 1-ի տվյալներից երևում է, որ քննարկված տարբերակներում *Azotobacter*-ի գաղութների երկամյա առավելագույն միջին բանակություններն արձանագրվել են հունիսին, նվազագույնը՝ սեպտեմբերին. նշյալ ամիսներին երկամյա միջին ցուցանիշները տարբերակներում տատանվելով համապատասխանաբար 25,8-29,1 և 8,0-9,5 գաղութի սահմաններում: Հունիսի համեմատ, հուլիսին և օգոստոսին դիտվել է ձևավորված գաղութների բանակության աստիճանաբար նվազում (երկամյա միջին ցուցանիշները տատանվելով համապատասխանաբար 17,9-21,4 և 13,5-15,5 գաղութի սահմաններում):

Azotobacter chroococcum-ի բանակության երկամյա միջին ցուցանիշները ստուգիչ (չցողված) տարբերակում հունիսին, հուլիսին, օգոստոսին և սեպտեմբերին կազմել են համապատասխանաբար 27,6; 19,2; 14,8 և 8,5 գաղութ:

Հետազոտություններով հաստատված է նաև, որ *Azotobacter*-ի գաղութների միջին բանակությունների նվազումը հուլիսին, օգոստոսին և սեպտեմբերին, հունիսի համեմատ, կազմել է համապատասխանաբար 28,1, 46,4 և 67,7 %:

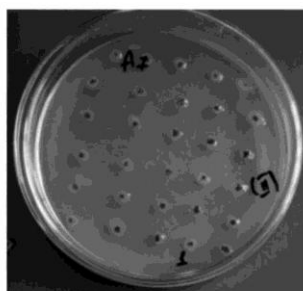
Որոշ հեղինակների պնդմամբ, հողի խոնավությունը [16, 22] և ջերմությունը [9] համարվում են հողաբնակ ազոտաբակտերների բանակության դինամիկայի որոշիչ գործոններ: Հավանաբար, վեգետացիայի շրջանում վերը նշված գործոններով պայմանավորված է *Azotobacter chroococcum*-ի բանակության դինամիկան նաև Bt տեսակի բակտերիական միջատասպաններով ցողված և չցողված անտառային դարչնագույն հողերում:

Նկ. 1-ում ներկայացված են Էշբի ագարային սննդամիջավայրի վրա, հողե կնձիկների շուրջը հունիսին ձևավորված *Az. chroococcum*-ի գաղութները:

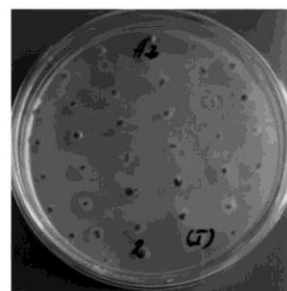


Փնայատկեր 1. *Azotobacter chroococcum*-ի գաղութների երկամյա (2018-2019 թթ.) միջին քանակությունները Bt տեսակի բակտերիական միջատասպաններով ցողված և չցողված անտառային դարչնագույն հողերում

Հողե կնձիկներից ձևավորված *Azotobacter chroococcum*-ի գաղութների քանակության 2018 թ. գիտափորձերի արդյունքների վիճակագրական վերլուծությունից պարզվել է, որ տատանման գործակցի և փորձի սխալի ցուցանիշները քննարկված տարբերակներում հունիսից սեպտեմբեր ընդհանուր առմամբ տատանվելով համապատասխանաբար 5,10-12,67 և 2,3-5,7 %-ի սահմաններում հաստատել են, որ գիտափորձերի արդյունքները հավաստի են:



Ա



Բ

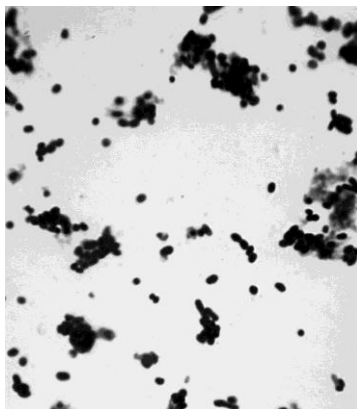
Նկար 1. Էջի ագարային սննդամիջավայրի վրա Bt տեսակի միջատասպաններով ցողված (Ա) և չցողված (ստուգիչ) (Բ) հողե կնձիկների շուրջը ձևավորված *Az. chroococcum*-ի գաղութներ

2018թ. հետազոտության տվյալների Ստյուդենտի t -ափանիշ-ի հաշվարկային ցուցանիշները, $P_{0,95}$ և $n=5$ պարամետրերի դեպքում, ընդհանուր առմամբ տատանվելով 0,272-2,236-ի սահմաններում և լինելով փոքր Ստյուդենտի t -ափանիշ-ի աղյուսակային 2,571 ցուցիչից հաստատել են, որ Bt տեսակի բակտերիական միջատասպաններով առանձին ցողված և չցողված (ստուգիչ) տարբերակներում արձանագրված *Azotobacter chroococcum*-ի գաղութների քանակական ցուցանիշների միջև, համապատասխան ամիսների կտրվածքով, չկա արժանահավատ տարբերություն:

Գիտափորձերի արդյունքներով հաստատված է նաև, որ Bt տեսակի բակտերիական միջատասպաններով ցողված անտառային դարչնագույն հողերից մեկուսացված *Azotobacter chroococcum*-ը պահպանել է չցողված (ստուգիչ) անտառային հողից մեկուսացված *Az. chroococcum*-ին բնորոշ ձևաբանական և ֆիզիոլոգիական առանձն

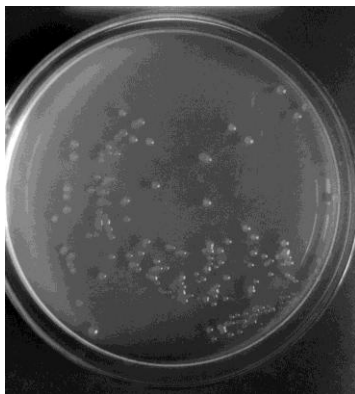
Նահատկությունները: Մասնավորապես, հողում մնալուց հետո ազոտոբակտերի երիտասարդ բջիջները պահպանել են ձողիկաձև տեսքը, մտրակների առկայությունն ու շարժունակությունը, նաև՝ բջի 3,6 x 2,1 մկմ երկայնական և լայնական միջին չափերը: Չարգացման հետագա փուլում (սննդամիջավայրի վրա աճելուց 38 Ժ անց) բջիջներն ընդունել են օվալաձև տեսք (տրամագիծը՝ 1,7-2,0 մկմ)՝ միաժամանակ կորցնելով մտրակներն ու շարժունակությունը:

Փորձատեղամասերից մեկուսացված *Az. chroococcum*-ի բջիջները լուսային մանրադիտակի տեսադաշտում երևացել են մեկական, զույգով, շղթաների կամ անկանոն կույտերի տեսքով (նկ.2):



Նկ. 2. *Azotobacter chroococcum*-ի բջիջները լուսային մանրադիտակի տեսադաշտում

Աճի սկզբնական փուլում ազոտոբակտերը Էշբի ագարային սննդամիջավայրի վրա ձևավորել է ուռուցիկ, լորձնային անգույն գաղութներ, որոնց միջին տրամագիծը կազմել է 1,8 մմ (նկ. 3):



Նկ. 3. *Azotobacter chroococcum*-ի 3 օրական գաղութները

Չարգացման հետագա փուլում գաղութները ներկվել են իրենց իսկ կողմից սինթետիկ սննդամիջավայրը չներկող մուգ-գորշավուն գունանյութով: Դիտարկումներով հաստատվել է, որ գաղութների ձևավորումը Էշբի ագարային սննդամիջավայրի վրա սկսվել է ցանքից 9 Ժ անց:

Մեր հետազոտության արդյունքում հաստատված է, որ բակտերիական միջատասպաններով ցողված և չցողված (ստուգիչ) անտառային դարչնագույն հողերից պինդ սննդամիջավայրի վրա մեկուսացված *Az. chroococcum*-ը յուրացնում է միա- (մաննիտ, դեքստրոզ, լեվուլոզ, արաբինոզ), երկ- (մալտոզ, լակտոզ) և բազմաշաքարներ (սուլա), ազոտի աղբյուրներից (մոլեկուլային ազոտից բացի)՝ նիտրատներ և նիտրիտներ, ժելատինը չի հեղուկացնում (օժտված չէ պրոտեոլիտիկ ակտիվությամբ)։ Սննդամիջավայրի վրա ձևավորված ազոտոբակտերի գաղութներն օժտված են կատալազային և օքսիդազային ակտիվությամբ։ Նշյալ կուլտուրան օժտված է նաև ամիլոլիտիկ ակտիվությամբ։ Ընդ որում, ինչպես բակտերիական միջատասպաններով ցողված, այնպես էլ չցողված (ստուգիչ) անտառային դարչնագույն հողերից մեկուսացված *Az. chroococcum*-ի կուլտուրաները առանձին փորձի սահմանում ֆիզիոլոգիական պրոցեսներն իրականացրել են նույն ինտենսիվությամբ։

Այսպիսով, Bt տեսակի բակտերիական միջատասպաններով ցողված և չցողված (ստուգիչ) անտառային դարչնագույն հողերից մեկուսացված և էշբի ազարային սննդամիջավայրի վրա աճած *Az. chroococcum*-ի գաղութների երկամյա միջին քանակությունները վեգետացիայի շրջանում կրել են փոփոխություն՝ առավելագույն և նվազագույն քանակությունները դրսևորվելով համապատասխանաբար հունիսին և սեպտեմբերին։

Փորձի սխալի և տատանման գործակցի ցուցանիշներով հաստատվել է, որ գիտափորձերի արդյունքները հավաստի են։

Ստյուդենտի $t_{\text{չափանիշ}}$ -ով հաստատվել է, որ Bt տեսակի բակտերիական միջատասպաններով առանձին ցողված և չցողված (ստուգիչ) տարբերակներում արձանագրված *Az. chroococcum*-ի գաղութների քանակական ցուցանիշների միջև չկա արժանահավատ տարբերություն։

Փորձատեղամասերի (ցողված և չցողված) հողերից մեկուսացված *Az. chroococcum* կուլտուրաները ձևաբանական և ֆիզիոլոգիական հատկանիշներով ցուցաբերել են միատիպ դրսևորումներ։

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Թռչունյան Ա. Հ., Փանոսյան Հ. Հ., Բազունյան Ի. Լ., Մարգարյան Ա. Ա., Պոպով Յու. Գ. Մանրէաբանության լաբորատոր աշխատանքներ (Ուսումնամեթոդական ձեռնարկ)։ Երևան, ԵՊՀ, 314 էջ, 2014։
2. Չապանյան Ե.Ն. Ցողումից հետո Bt տեսակի բակտերիական միջատասպանների քանակության դինամիկան անտառային դարչնագույն հողերում. ՀԱԱՀ տեղեկագիր, Երևան, N 3, էջ 76-80, 2019։
3. Փանոսյան Հ. Կ. Միկրոբները և նյութերի փոխակերպումները։ Երևան, ՀՍՍՌ ԳԱ, էջ 224 և 244-245, 1956։
4. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., Медгиз, 180 с, 1962.
5. Бернштейн А. Справочник статистических решений. М., Статистика, 162 с, 1968.
6. Гукасян А.Б., Туранова Л.К., Саркисян М.А., Сорокина А.Г. Продуктивность кристаллообразующих микроорганизмов в лесных биогеоценозах. В сб.: Микрофлора и перспективы ее использования в повышении продуктивности лесов. Красноярск, с. 3-18, 1978.
7. Лабинская А.С. Практическое руководство по микробиологическим методам исследования. М., Мед. лит., с. 57 и 431, 1964.
8. Нетрусов А.И., Егоров М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М., ИЦ Академия, 608 с, 2005.
9. Понкратов А.Я. Микробиология, М., Колос, с. 85-86, 1971.
10. Практикум по микробиологии. М., МГУ, 307 с, 1976.
11. Пронюза А.А., Цуцупа Т.А., Мазина А.В. Кормоведение: теория и практика. М., 248 с, 2019.
12. Роуз Э. Химическая микробиология. М., Мир, с. 72, 1971.
13. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., МУ, с. 307, 1995.

14. *Степанян Т.У., Арутюнян С.А., Алексанян Н.М., Матевосян Ф.С., Акопян Ж.И.* Использование клубеньковых бактерий в ассоциации с почвенными свободноживущими бактериям для инокуляции небобовых растений. Биологический журн. Армении, 62, 3, с. 86-90, 2010.
15. *Сэги Й.* Методы почвенной микробиологии. М., Колос, с. 149 и 267, 1983.
16. *Танатин Б.Я., Пафикова М.А.* О распространении азотобактера в почвах Исфаринского района Северного Таджикистана. Уч. записки ленинабадск. гос. пед. ин-та им С.М. Кирова., вып. 8, с. 112-115, 1963.
17. *Чигарев Г.А., Старостин С.П., Калабина М.Н.* Снос пестицидов при их применении Бюл. ВНИИЗР. Л., N 27, с. 13-18, 1974.
18. *Шлегель Г.* Общая микробиология. М., Мир, с. 344-346, 1972.
19. *Яблоков А.* Игра против вредителей. Правда, N 299, с. 3, 26 октября, 1987.
20. *Werner D., Newton W.E.* Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and environment. Published by Springer, p. 347, 2005.
21. *Young Y.M., Park D.C.* Probably synonymy of the nitrogen fixing genus *Azotobacter* and genus *Pseudomonas* //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, p. 2894-2901, 2007.
22. *Zimna J.* Influence of certain species of meadow plants on the abundance of *Clostridium* and *Azotobacter* in their rhizospheres. Ekol. Polska., B. 8, 2, p. 165-171, 1962.

Ստացվել է 11.08.2020