

ՄԱՆՐԷԱԲԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

ՈւՏԴ 579.841.31+ 579.232

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

**Պալարաբակտերիաների ադիեզիոն ունակության մասին**

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

**Առանցքային բառեր՝** *պալարաբակտերիաներ, ադիեզիա, 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 ադիեզիայի 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 ադիեզիան կախված է շտամային առանձնահատկություններից, մշակաբույսերի տեսակից և սորտից [1]: Առաջնային խնդիրը, որը պետք է լուծել, կաչողականությունը պայմանավորող բակտերիայի և բույսի մակերեսային բաղադրամասերի իդենտիֆիկացիան է, որը կրերի բակտերիայի և բույսի ցանկալի ասոցիացիաների ստեղծման [2]:

Զանազան կենսապարարտանյութերի ստացման ժամանակ օգտագործվում են բազմաթիվ նյութեր՝ մելաս, բենտոնիտ, տորֆ, ցելլիտ և այլն [3,4], որոնք բարձրացնում են նրանց կաչողականությունը: Ադիեզիոն հատկության շնորհիվ միկրոօրգանիզմներն ավելի հեշտությամբ են հարմարվում շրջակա միջավայրին՝ գոյատևելով տարբեր էկոտիպերում և անբարենպաստ պայմաններում [5,6]: Մակայն 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 ադիեզիոն հատկություններով:

Միկրոօրգանիզմների ադիեզիան պայմանավորված է բջիջների աճման փուլերով: Ադիեզիան 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 ադիեզիոն հատկություններով օժտված շտամներ՝ հողը ազոտով հարստացնող կենսապարարության 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 ադիեզիան ուսումնասիրվել է սովորական և կվարցի ապակիների, ինչպես նաև համապատասխան թիթեռնածաղկավոր բույսերի արմատածիլերի մակերեսներին: Կիրառվել են ջրի մեջ ողողելու և կենտրոնախույս ուժով ներգործելու մեթոդները: Ադիեզիան բնութագրվել է ադիեզիոն 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՝  $Y_F = \frac{N \cdot 100}{N_0}$  [8]: Փորձի համար օգտագործվել են ոսպի,

ոլոռի, կորնգանի և սիսեռի 2սմ երկարություն և հաստություն ունեցող, հավասար արմատամազիկներով ծիլեր, որոնք ընկղմվել են պալարաբակտերիաների սուսպենզիաների մեջ, ապա կատարվել է պալարաբակտերիաների դետորբցիա **ԸԲՐ-1** ցենտրիֆուգայով: Ադսորբցված բջիջների քանակը որոշվել է տրորված արմատածիլերի սուսպենզիաներում աստիճանական նոսրացումների և լուսային միկրոսկոպով ուղղակի հաշվելու մեթոդներով:

Պալարաբակտերիաների ադիեզիան 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 թիթեոնաձաղկավոր բույսերի և նրանց պալարիկների նմուշներում, նախապես:

**Արդյունքներ և քննարկում:** Ուսումնասիրվել է ոլոռի, ոսպի և կորնզանի 26 շտամի ադիեզիան սովորական ապակու մակերեսին ջրում ողողելու մեթոդով: Անկախ տեսակային պատկանելությունից և ազոտֆիքսացիայի ակտիվությունից, բոլոր շտամներն էլ որոշակի չափերով ադսորբցվել են ապակու մակերեսին (ադյուսակ1): Ըստ որում ավելի ինտենսիվորեն ադսորբցվել են ոլոռի պալարաբակտերիաները. 1 սմ<sup>2</sup> մակերեսի վրա ադսորբցված բջիջների թիվը կազմել է 0.16-2.6մլն: Կորնզանի և ոսպի պալարաբակտերիաների դեպքում՝ համապատասխանաբար 0.6-1.9 և 0.45-1.8մլն բջիջ:

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

### Աղյուսակ 1

#### Պալարաբակտերիաների ադիեզիան ապակու մակերեսին ջրում ողողելու մեթոդով (մլն/սմ<sup>2</sup>)

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	կորնզան	5922,5863	ակտիվ
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<sup>2</sup> 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 ադիեզիայի մեծության մասին: Ավելի ճշգրիտ տվյալներ բջիջների և մակերեսների ամուր կապի մասին տալիս է ‘Y<sub>F</sub> մեծությունը, այսինքն՝ ադիեզիոն թիվը: Ոսպի շտամ 6020-ի ադիեզիոն թիվը հավասար է 52.2% -ի, շտամ 6009-ի մոտ՝ 50.0%: Ադիեզիայի ուժը, որը պահում է ոսպի պալարաբակտերիաները կվարցի ապակու

մակերեսին, ինչպես երևում է աղյուսակի տվյալներից, ունի շտամային առանձնահատկություն: Ապակուն աղսորբցված շտամ 6020-ի բջիջների թիվն ավելի քիչ է շտամ 6009-ի համեմատությամբ, իսկ ադիեզիոն թիվն ավելի բարձր է:

## Աղյուսակ 2

### Ոսպի պալարաբակտերիաների ադիեզիան կվարցի ապակու մակերեսին կենտրոնախույս ուժով ներգործելու մեթոդով (մլն բջիջ/սմ<sup>2</sup>)

Շտամներ	Աճման տևողությունը, ժամ	Աղսորբցված բջիջների թիվը, N <sub>0</sub>	Դետրբցիայից հետո մնացած բջիջների թիվը, N	Ադիեզիոն թիվը, Y <sub>F</sub> %
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 ադիեզիոն ունակությամբ օժտված շտամների ընտրությունն է, ուստի, մեր կարծիքով, ավելի հավանական տվյալներ կատարվեն, եթե պալարաբակտերիաների ադիեզիան ուսումնասիրվի համապատասխան թիթեոնաձաղկավոր բույսերի արմատածիլերի մակերեսներին: Կիրառելով կենտրոնախույս ուժի տարբեր մեծություններ՝ ուսումնասիրվել է ոլոռի շտամ 5609-ի և կորնգանի շտամ 5881-ի աղսորբցիան 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<sub>F</sub>): Ըստ որում առավել բարձր ադիեզիա 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 կաշռականության ամրության և շփման մակերեսի վրա ազդող ուժի մեծության որոշման համար ուսումնասիրվել է ոլոռի շտամ 5609-ի ադիեզիան աղսորբենտի հետ 5, 10, 20, 30, 60, 120 րոպե շփման և 9000g, 14000g և 20 000g ազդող ուժի պայմաններում: Պարզվել է, որ աղսորբենտի հետ 30 րոպե շփման և կենտրոնախույս ուժի կիրառված 9000g մեծության դեպքում ուսումնասիրված շտամի ադիեզիոն թիվն ամենաբարձրն է՝ 53.0%:

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

**Աղյուսակ 3**

**Ոլոռի և կորնզանի պալարաբակտերիաների ադիեզիան տեր-բույսերի արմատածիլերի մակերեսին միկրոօրգանիզմների աճի դինամիկայում (մլն բջիջ/ սմ<sup>2</sup>)**

Աճման տևողությունը, ժամ	Ադսորբցված բջիջների թիվը, N <sub>0</sub>	Դետորբցիայից հետո մնացած բջիջների թիվը, N	Ադիեզիոն թիվը, Y <sub>F</sub> %
	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 ադիեզիան տեր-բույսերի արմատածիլերի մակերեսներին միկրոօրգանիզմների 48-ժամյա աճի և 30 րոպե շփման պայմաններում (մլն բջիջ/ սմ<sup>2</sup>)**

Պալարաբակտերիաների տեսակները	Տեր-բույսեր	Շտամներ	Ագոսֆիքսացիայի ակտիվությունը	Ադսորբցված բջիջների թիվը, N <sub>0</sub>	Դետորբցիայից հետո մնացած բջիջների թիվը, N	Ադիեզիոն թիվը, Y <sub>F</sub> %
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	կորնզան	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 ադիեզիոն ունակությամբ, մեր փորձի սահմաններում, ոլոռի պալարաբակտերիաներն առաջնային տեղ են զբաղում, նրանք առանձնանում են պալարաբակտերիաների մյուս տեսակներից իրենց բարձր ադիեզիոն թվով, որը կազմում է 56.1-57.1%, կորնզանի պալարաբակտերիաները նույնպես օժտված են բարձր ադիեզիոն ունակությամբ՝ 50.0-56.0%: Ոսպի պալարաբակտերիաների մոտ ադիեզիոն 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 ադիեզիայի 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 տերբույսերի 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 ադիեզիոն 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 տերբույսերի արմատների վրա կապված չէ նրանց վիրուլենտության հետ [1, 9]:

Կատարված աշխատանքի արդյունքում ընտրվել են բարձր ադիեզիոն 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 ադիեզիոն ունակության մասին**

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

**Փ. Ս. 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 земледобрильного препарата "Нитрагин" использованы штаммы *Rhizobium leguminosarum* и *Rh. simplex*, обладающие высокой адгезивной способностью.

**F. S. Matevosyan, T. H. Stepanyan, S. H. Harutyunyan, 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. *Авакумова 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., Saghyan 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.