ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՀԱԿՈԲՅԱՆ ԱՆՈՒՇ ԳՐԻԳՈՐԻ

ԿՈՄՊՈՍՏԻ ՄԻԿՐՈՖԼՈՐԱՅԻՑ ՍՊՈՐԱՎՈՐ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ, ՆՈՒՅՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ *AGARICUS BISPORUS* ՈՒՏԵԼԻ ՄՆԿԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ՎՐԱ

Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան 2014

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

АКОПЯН АНУШ ГРИГОРЬЕВНА

ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ИЗ МИКРОФЛОРЫ КОМПОСТА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА РАЗВИТИЕ СЪЕДОБНОГО ГРИБА *AGARICUS BISPORUS*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.07 - «Микробиология»

Ереван 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մանրէների ավանդադրման հանրապետական կենտրոնում (ներկայումս ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ):
Գիտական ղեկավար՝ կ. գ. դ., պրոֆեսոր Հ.Գ. Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կ. գ.. դ., պրոֆեսոր Յու. Գ. Պոպով
կ. գ. թ. Ա. Խ. Չախալյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2014թ. հուլիսի 15-ին, ժամը 16^{00}-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:
Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 80

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:
Սեղմագիրը առաքված է 2014թ. հունիսի 14-ին:

Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, կ. գ. թ. Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в Республиканском центре депонирования микробов НАН РА (ныне НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА).
Научный руководитель: д. б. н., профессор Г.Г. Оганесян

Официальные оппоненты: д. б. н., профессор Ю. Г. Попов
к. б. н. А. Х. Чахалян
Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 15 июля 2014г. в 16^{00} часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА
Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/ факс (374 10) 65 41 80.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.
Автореферат разослан 14 июня 2014г.

Ученый секретарь специализированного совета, к. б. н. Г.Е. Аветисова

Աշխատանքի ընդհանուր բնութագիրը

Խնդրի արդիականությունը: *Basidiomycotina* դասին պատկանող *Agaricus bisporus*–ը (շամպինյոն) ուտելի սնկերից ամենատարածվածն է, որի արտադրությունն աշխարհում անցնում է 12. 000.000 տոննայից, մոտ 32 միլիարդ ԱՄՆ դոլար արժեքով, որից 11 միլիարդը (30%) բաժին է ընկնում դեղագործությանը: Ուտելի սնկերի արտադրությունը հաճախ կոչում են ոչ կանաչ հեղափոխություն: Սնկերը պարունակում են սպիտակուցներ, որոնք իրենց ամինաթթվային կազմով շատ մոտ են կենդանականին: Շամպինյոնի պտղամարմինը պարունակում է բարձր որակի 7,5-8% սպիտակուց, որը պարունակում է անփոխարինելի ամինաթթուների ամբողջ կոմպլեքսը, հատկապես շատ հարուստ են լիզինով և լեյցինով՝ մոտ 19-35%, որոնց քանակը հացահատիկային կուլտուրանորում շատ ցածր է: Նրանք հարուստ են նաև ածխաջրերով, ճարպերով, վիտամիններով՝ A, B_1, B_2, D, C, PP, հանքային միացություններով և միկրոտարրերով: Նրանց կողմից սինթեզված կենսաբանական ակտիվ միացություններն օժտված են հակամանրէական, հակասնկային, հակավիրուսային, հակաուռուցքային, հակաբորբոքային, իմունոմոդուլյատոր, թրոմբոլիտիկ և այլ հատկություններով: *Agaricus bisporus* սնկում առկա ֆերմենտները նպաստում են մարսողությանը, թիրոզինազաները իջեցնում են արյան ճնշումը, իսկ պոլիսախարիդներն օժտված են հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ [Бадалян, 1998; Wani et al., 2010]:

Սնկերի արտադրությունը էկոլոգիապես մաքուր է, այն իրականացվում է ամբողջ տարին՝ անկախ եղանակային պայմաններից: Նրանք աճեցվում են ցելյուլոզ-լիգնին պարունակող կենդանական և բուսական թափոնների մանրէաբանական ֆերմենտացիայի արգասիք հանդիսացող այսպես կոչված կոմպոստի վրա, որը սնկերի աճեցումից հետո օգտագործվում է գյուղատնտեսության մեջ, որպես օրգանական միացություններով հարուստ պարարտանյութ: Հարյուրամյակների ընթացքում կոմպոստը պատրաստվել է ցորենի ծղոտից և ձիու գոմաղբից, սակայն վերջինը դարձել է դժվար հասանելի ձիերի գլխաքանակի կտրուկ անկման, ինչպես նաև սնկագործության բուռն զարգացման պատճառով: Վերջին տասնամյակներում մշակվել են սուբստրատի պատրաստման տարբեր բաղադրատոմսեր, որտեղ ձիու գոմաղբը մասամբ կամ ամբողջապես փոխարինվել է խոշոր եղջերավոր կենդանիների, խոզերի, ոչխարների գոմաղբով ինչպես նաև թռչնաղբով [Ранчева, 1990]: Ներկայումս աշխատանքներ են տարվում այլընտրանքային սուբստրատների որակական հատկանիշների բարձրացման ուղղությամբ: Որակյալ կոմպոստի ձևավորման գործում մեծ դեր են խաղում գոմաղբում և ծղոտի վրա առկա միկրոօրգանիզմների տեսակային կազմը և քանակությունը [Pardo et al., 2002]:

Հայտնի է, որ կենդանական և բուսական ծագման սուբստրատները հարուստ են մեզոֆիլ և թերմոֆիլ միկրոօրգանիզմներով, սակայն դրանց տեսակային պատկանելիությունը և մորֆո-ֆիզիոլոգիական առանձնահատկությունների դեռևս լիովին ուսումնասիրված չեն: Կոմպոստում, մանրէաբանական գործընթացների արդյունքում անջատվող ջերմության ազդեցության տակ առաջին մի քանի օրերում զարգացող մեզոֆիլ միկոֆլորան փոխարինվում է թերմոֆիլ միկրոֆլորայով, որը ավարտին հասցնելով կոմպոստի ֆերմենտացիան հարստացնում է այն սնկերի բազմացման համար հասանելի սննդանյութերով և աճի խթանիչներով:

Կոմպոստի միկրոօրգանիզմների փոխհարաբերություններն ուտելի սնկերի հետ քիչ է ուսումնասիրված: Այդ տեսակետից բազիդիոմիցետների և միկրոօրգանիզմների փոխհարաբերությունների օրինաչափությունների ուսումնասիրությունները կարող են հիմք հանդիսանալ որակյալ կոմպոստի պատրաստման և բերքատվության բարձրացման համար:

Միկրոօրգանիզմները կարևոր դեր են խաղում նաև սնկերի պրիմորդիների առաջացման և պտղամարմինների զարգացման գործում: Սակայն կոմպոստի պաստերիզացման և միցելիումի ձևավորումից հետո նրա անցումը վեգետատիվից ռեգեներատիվ փուլի խթանող ծածկահողի ախտահանման պատճառով նրանցում գտնվող միկրոօրգանիզմների քանկը կտրուկ նվազում է, ինչն, անդրադառնում է միցելիումի բերքատվության վրա: Նման դեպքերում միկրոօրգանիզմների օգտակար տեսակներով կոմպոստի և ծածկահողի արհեստականորեն հարստացումը կարող է խթան հանդիսանալ սնկերի աճի և բերքատվության բարձրացման համար [Rainey et al.,1990]:

Ուտելի սնկերի որակի և բերքատվության վրա բացասական ազդեցություն են թողնում սնկային վարակները, ինչպես նաև սնկանոցներում հաճախ հանդիպող վնասատու միջատները, որոնք ճնշում են ինչպես պրիմորդիումների զարգացումը, այնպես էլ ուղղակիորեն վնասում են պտղամարմինը: Նրանց դեմ պայքարի քիմիական միջոցները բացասական են ազդում շրջակա միջավայրի և մարդու առողջության վրա: Այս տեսանկյունից կարևորվում է պայքարի արդյունավետ կենսամեթոդի մշակումն անմիջապես կոմպոստից անջատված միկրոօրգանիզմների կիրառմամբ:

<u>Հետազոտության նպատակը:</u> Կոմպոստի հասունացման տարբեր փուլերում անջատվել և նույնականացվել են ֆերմենտացիան իրականացնող հիմնական միկրոօրգանիզմները, ընտրվել են նրանց և *Agaricus bisporus* սնկերի միջև սիմբիոզի տեսակները, դրանք կիրառվել են սնկարտադրության մեջ բերքատվության բարձրացման, ինչպես նաև սնկերի վնասատուների դեմ պայքարի կենսամեթոդի մշակման համար:

Այդ նպատակի իրականացման համար դրվել են հետևյալ խնդիրները.

- կոմպոստի ֆերմենտացիայի տարբեր փուլերում գերիշխող մեզոֆիլ և թերմոֆիլ միկրոօրգանիզմների մաքուր կուլտուրաների անջատումը,

- անջատված միկրոօրգանիզմների կուլտուրալ, մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկությունների ուսումնասիրումը և նրանց նույնականացումը,
- բազիդիոմիցետների և անջատված միկրոօրգանիզմների փոխհարաբերությունների ուսումնասիրությունը՝ լաբորատոր պայմաններում,
- շամպինյոնի նկատմամբ սիմբիոտիկ կուլտուրաների փորձարկումը, կիսաարտադրական պայմաններում, ուտելի սնկերի բերքատվության վրա
- անջատված կուլտուրաների հիման վրա ուտելի սնկերի վարակների և վնասատու միջատների դեմ կանխարգելիչ կենսաբանական մեթոդի մշակումը:

<u>Գիտական նորույթը:</u> Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է Հայաստանի ելանյութերից կազմված բազիդիոմիցետային կոմպոստի միկրոֆլորան: Հայտնաբերվել է, որ այն հիմնականում ներկայացված է սպորավոր մեզոֆիլ և թերմոֆիլ բակտերիաներով 4/1 հարաբերությամբ, ինչպես նաև որոշ թերմոֆիլ ակտինոմիցետներով: Կոմպոստի հասունացման տարբեր փուլերում անջատվել ու նկարագրվել են սպորավոր մեզոֆիլ և թերմոֆիլ բակտերիաներ: Մորֆոլոգիական, կուլտուրալ, ֆիզիոլոգիական, կենսաքիմիական բազմակողմանի ուսունասիրությունների արդյունքում անջատված միկրոօրգանիզմները դասվել են են 7 տեսակների և 15 ենթատեսակների՝ *Bacillus circulans* (4 ենթատեսակ), *B. macerans* (6 ենթատեսակ), *B. stearothermophilus* (2 ենթատեսակ), *B. sphaericus* (3 ենթատեսակ), *B. megaterium* և *Bacillus sp.* (2 տեսակ):

Կոմպոստից անջատված բակտերիաների և բազիդոմիցետների փոխազդեցության լաբորատոր ուսումնասիրությունների արդյունքում ի հայտ են բերվել բակտերիաների նոր սիմբիոտիկ տեսակներ, որոնց ներմուծումը միցելյալ կոմպոստ և ծածկահող նպաստում է սնկերի վեգետատիվ փուլից գեներատիվ փուլի անցմանը: Ցույց է տրվել, որ կոմպոստից անջատված միկրոօրգանիզմներն ընդունակ են պաշտպանել ուտելի սնկերը վարակներից, միջատներից և թրթուրներից:

Կիսաարտադրական պայմաններում փորձարկվել են կոմպոստից անջատված *B. stearothermophilus* AH122, *B. sphaericus* AH9, *B. sphaericus* AH11 և *B. megaterium* AH102 շտամները, որոնք հետագայում ավանդադրվել են Մանրէների ավանդադրման կենտրոն հիմնարկում (ՄԱԿ) և ստացել են համապատասխանաբար ՄԱԿ-ի շիֆր և համարներ՝ MDC 11848, MDC 11849, MDC 11850 և MDC 11851:

<u>Գործնական նշանակությունը:</u> Կոմպոստից անջատված մեզոֆիլ սպորավոր բակտերիաները կարելի է կիրառել ուտելի սնկերի բերքատվության բարձրացման և անտագոնիստ ու մրցակից միկրոօրգանիզմների ճնշման նպատակներով: Թերմոֆիլ և մեզոֆիլ բակտերիաների համակեցության կիրառումը կոմպոստացման գործընթացում կապահովի որակյալ սուբստրատի ստացումը: Էնտոմոպաթոգեն բակտերիաների $\approx 10^7$ ԳԱՄ/մլ կախույթների

պարբերաբար ներմուծումը միցելյալ կոմպոստ և ծածկահող երաշխավորում է շամպինյոնի որակյալ բարձր բերքի ստացումը՝ կանխելով սնկային հիվանդությունները, ինչպես նաև պրիմորդիաների և պտղամարմինների վնասումը միջատների և նրանց թրթուրների կողմից:

Կապը գիտական թեմաների հետ: Աշխատանքը իրագործվել է Մանրէների ավանդադրման կենտրոնի, ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի և մանրէների ավանդադրման կենտրոնի, այնուհետև ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի բազային և 0321 թեմատիկ ֆինանսավորման թեմաների շրջանակներում:

Հեղինակի անձնական ներդրումը: Սնկային միցելիումի պատրաստումը, կոմպոստից միկրոօրգանիզմների անջատումը, նույնականացումը և փորձարկումը լաբորատոր և արտադրական պայմաններում: Ստացված արդյունքների վիճակագրական վերլուծությունը: Թեմայի վերաբերյալ գիտական գրականության ամփոփումը և համակարգումը: Ինքնուրույն և համահեղինակների հետ միասին գիտական հոդվածների և թեզիսների ձևակերպումը: Ղեկավարի հետ ստացված արդյունքների քննարկումը, ատենախոսության, սեղմագրի և եզրակացությունների ձևակերպումը:

Աշխատանքի քննարկումը: Ատենախոսությունն ամբողջությամբ քննարկվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդի նիստերում և զեկուցվել է «Contribution of the Young Generation in the Development of Biothecnology» խորագրով երիտասարդ գիտնականների 2-րդ միջազգային գիտաժողովում (Երևան, 2013):

Տպագրված աշխատանքները: Ատենախոսության հիմնական դրույթները շարադրված են 5 գիտական աշխատանքներում՝ 4-ը հոդվածներ տեղական գիտական հանդեսներում, 1 թեզիս միջազգային գիտաժողովի ժողովածուում:

Աշխատանքի իրականացման վայրը: Աշխատանքը իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Մանրէների ավանդադրման կենտրոն հիմնարկում:

Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը: Աշխատանքը կազմված է 103 էջից, 3 գլխից, պարունակում է 16 աղյուսակ, 21 նկար և 142 գրական հղում:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գիտական ակնարկը նվիրված է ուտելի սնկերի արտադրությունում օգտագործվող սուբստրատի՝ կոմպոստի և ծածկահողի միկրոֆլորայի ուսումնասիրությունների հետ առնչվող, ինչպես նաև սնկերի հիվանդությունների ու վնասատուների կենսաբանական պայքարին նվիրված տպագիր և համացանցում առկա գիտական աշխատանքների վերլուծմանը:

ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Բակտերիաները և ուտելի սնկերը: Կոմպոստից մեր կողմից մեկուսացված 32 թերմոֆիլ և մեզոֆիլ բակտերիաների բնութագրերը ներկայացված են սույն աշխատանքում. *Bacillus thuringiensis* ՝ MDC 2477, MDC 1125 *B. sphaericus* MDC 2633 շտամները և *Agaricus bisporus* MDC 10757(20), *A. bisporus* MDC 10762(3712), կուլտուրաները, ստացվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Մանրէների ավանդադրման կենտրոն հիմնարկից:

Մանրէաբանական միջավայրերի բաղադրությունները ներկայացված են ատենախոսությունում:

Կոմպոստից նմուշառումը և բացիլների մեկուսացումը: Սպորավոր բացիլների անջատման նպատակով կոմպոստի 30 սմ խորությունից վերցված 1,0 գ նմուշը տեղադրվել է փորձանոթում և վրան ավելացվել 10 մլ ստերիլ ջուր: 10 րոպե խառնելուց և 5 րոպե դադարից ու նստվածքի անջատումից հետո ստացված կախույթը 10 րոպե 80°C -ում պաստերիզացվել է և տասնապատիկ նոսրացումներից կատարվել է ցանքս ագարային սննդամիջավայրերի վրա, ինկուբացիան համապատասխանաբար 28°C և 56°C ջերմաստիճաններում: Կոմպոստի ընդհանուր միկրոֆլորայի նկարագրման համար կատարվել է ցանքս՝ նախկան պաստերիզացիան:

Բացիլների մորֆոլոգիական ուսումնասիրությունը: Ագարային սննդամիջավայրերի վրա առաջացած գաղութները բնութագրվել են ըստ մեծության, ձևի, կառուցվածքի, ռելիեֆի, և գույնի: Բջիջների և սպորների մորֆոլոգիան ուսումնասիրվել է МБИ-3 լուսային մանրադիտակի տակ ֆազային կոնտրաստի օգտագործմամբ:

Բացիլների ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հասկություններից ուսումնասիրվել են՝ կախվածությունն աճի գործոններից (շաքարներից, ամինաթթուներից, վիտամիններից), թթվածնից, ջերմաստիճանից, ինչպես նաև ացետիլմեթիլկարբինոլի առաջացումը, նիտրատները նիտրիտների վերականգնելու կարողությունը ($NO_3 \rightarrow NO_2$), դեհիդրոքսիացետոնի առաջացումը, ամիլոլիտիկ ակտիվությունը, ժելատինազային ակտիվությունը, կատալազային ակտիվությունը, թիրոզինի քայքայումը, կիտրոնաթթվի և պրոպիոնաթթվի յուրացումը, հիպուրատի հիդրոլիզը, աճը pH 5,7 - ում, գլյուկոզից գազ առաջացնելու ունակությունը, շաքարներից թթվի առաջացումը:

Միցելիումը պատրաստվել է ցորենի հատիկների վրա՝ դասական եղանակով [Lemke, 1972]:

Կոմպոստի պատրաստումը: Ցորենի ծղոտը և ոչխարի գոմաղբը խառնվել են 1:1 հարաբերությամբ և ավելացվել (կգ/տ)՝ գիպս-62, գաջ-62, սելիտրա-37, սուպերֆոսֆատ–25, կարբամիդ-1 մինչև 80% խոնավությամբ: Թրջումից 5 օր անց, ծղոտին խառնվել է գոմաղբ, և հավելումները, այսպես ձևավորվել է բուրտը (1.8մ x 1.8 մx 1.8 մ): Մոտ մեկ ամիս տևող պարբերաբար խառնումներից

հետո հասունացված կոմպոստը պաստերիզացվել է 60°C –ում 36 ժամվա ընթացքում:

Կոմպոստի ցանքսը: 100 գ հատիկավոր միցելիումն ավելացվել է 65% խոնավությամբ 10 կգ կոմպոստին, լավ խառնվել է և լցվել է պոլիէթիլենային պարկի մեջ մոտ 30 սմ բարձրությամբ: Մնկանոցում մինչև պտղաբերումը պահպանվում է 24-26°C, օդափոխությունը կատարվում է ըստ անհրաժեշտության, միցելիումի աճի շրջանում ածխաթթու գազի կոնցենտրացիան օդում պետք է լինի 3-4%-ի սահմաններում:

Ծածկահողի ավելացումը: Միցելիումի ձևավորումից հետո կոմպոստը ծածկվել է ֆորմալինի 2 %-ոց լուծույթով մշակված կարմիր ավազի և սնահողի խառնուրդի (pH 7,0-7,4) 3-4 սմ հարթ շերտով: Ծածկող շերտի ավելացումից 2-3 շաբաթ հետո շամպինյոնի պտղաբերման սկզբում, սնկանոցում ջերմաստիճանն իջեցվել է մինչև 18-16°C և պահպանվել է մինչև պտղաբերման ավարտը:

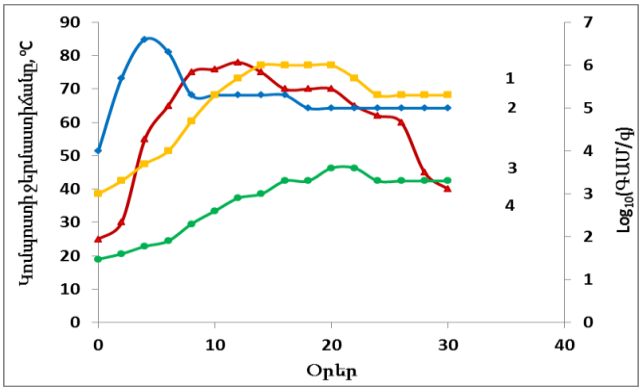
Բակտերիաների ներմուծում միցելիաբ կոմպոստ և ծածկահող: Թեք ագարի վրա աճեցված բակտերիահաների 10 մլ կախույթները՝ 10^7 ԳԱՄ/մլ, ավելացվել է պուլվերիզատորի միջոցով միցոլիումի աճի և պտղամարմինների գոյացման ընթացքում:

Բակտերիաների փոխազդեցությունը բարձրակարգ սնկերի հետ ուսումնասիրվել է համատեղ աճեցման պայմաններում հեղուկ և ագարային միջավայրերում: Սնկերն աճեցվել են 7 օր 24°C- ում, որից հետո ավելացվել են թեստ բակտերիաները և ինկուբացվել են 24°C-ի պայմաններում ևս 7 օր:

ԳԼՈՒԽ 3. ՍՏԱՑՎԱԾ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ

3.1. Կոմպոստից սպորավոր բակտերիաների անջատումը և բնութագրումը

Կոմպոստից հասունացման տարբեր փուլերում վերցված նմուշները պաստերիզացվել են այնուհետև համապատասխան նոսրացումներից ցանվել են սելեկտիվ ագարի վրա և զուգահեռաբար աճեցվել են 28 ու 56°C՝ մեզոֆիլ և թերմոֆիլ բակտերիաները տարանջատելու նպատակով: Կոմպոստի ջերմային պրոֆիլը, մեզոֆիլ և թերմոֆիլ բակտերիաներ աճի դինամիկան ներկայացված են նկ. 1-ում:



Նկ. 1. Կոմպոստի ֆերմենտացիայի ընթացքում միկրոօրգանիզմների աճի դինամիկան և ջերմային պրոֆիլը՝ 1-թերմոֆիլ բակտերիաները, 2-մեզոֆիլ բակտերիաները, 3-ակտինոմիցետները, 4- կոմպոստի ջերմային պրոֆիլը

Ինչպես երևում է նկարից կոմպոստում, մանրէաբանական գործընթացների արդյունքում անջատվող ջերմության ազդեցության տակ սկզբնական շրջանում մի քանի օրերում զարգանում են մեզոֆիլ միկրոօրգանիզմները, որոնց տիտրը հասնում է մինչև $8x10^6$ ԳԱՄ/գ, այնուհետև աճը դադարում է, երբ կոմպոստում ջերմաստիճանը հասնում է 50-55°C: Հետագայում թերմոֆիլ միկրոօրգանիզմների աճով պայմանավորված բարձր, մինչև 78°C ջերմաստիճանի ազդեցության տակ մեզոֆիլ միկրոօրգանիզմների մեծ մասն ոչնչանում է, չհասցնելով սպորուլացվել: Սկսած 14-րդ օրվանից, կոմպոստում հասանելի սննդի աղբյուրների սպառման պատճառով, դադարում է նաև թերմոֆիլ միկրոօրգանիզմների աճը, բերելով կոմպոստի ջերմաստիճանի աստիճանական նվազման մինչև 35°C: Կոմպոստում բազմացող մեզոֆիլ և թերմոֆիլ միկրոօրգանիզմների առավելագույն քանակների հարաբերակցությունը կազմում է 4:1: Կոմպոստացման ամբողջ ընթացքում անջատվել են նաև ոչ մեծ քանակության (գրամում 10-1000), ակտինոմիցետներ:

3.2. Կոմպոստից անջատված բակտերիաների կուլտուրալ-մորֆոլոգիական հատկությունների բնութագիրը

Կոմպոստի նմուշներից տարբեր ջերմաստիճանային պայմաններում աճեցված գաղութներից անջատվել են բացիլային գրամդրական մաքուր կուլտուրաներ, որոնց մոտ ուսումնասիրվել են մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիա-կենսաքիմիական, կուլտուրալ հատկությունները: Կատարվել է նախնական նույնականացում ըստ Բերգիի որոշիչի և համընդհանուր ճանաչում ունեցող

սկզբնաղբյուրների [Логинова и др., 1966; Gordon et al., 1973; Bergey's Manual, 1986]:

Գաղութների մորֆոլոգիան ուսումնասիրելու նպատակով բացիլների թերմոֆիլ և մեզոֆիլ կուլտուրաներն աճեցվել են համապատասխան ագարային միջավայրերի վրա, և ուսումնասիրվել է բջիջների մորֆոլոգիական հատկանիշները: Սպորոգենեզն ուսումնասիրվել է թեք ագարային միջավայրի վրա՝ կուլտուրաների աճի 4-րդ օր: Մորֆոլոգիական հատկանիշներից առանձնացվել են վեգետատիվ բջիջների ձևը, շարժունակությունը, չափերը, սպորների տեսքը և տեղադրվածությունը: Անջատված կուլտուրաների մեծամասնությունը ձևավորում են դեղնասպիտակ, փայլուն, ուռուցիկ, հարթ եզրերերով գաղութներ: Սպորները միջինը 0.4-0.5 x 4-5 μ չափի են, օվալաձև, ծայրային կամ ենթածայրային դասավորությամբ, սպորանգիումը մի մասը ուռչեցնում են՝ մի մասը ոչ:

Մեկուսացված կուլտուրաների կողմից շաքարների յուրացման ուսումնասիրությունը կատարվել է աուքսոնոգրաֆիական մեթոդով՝ ագարային սինթետիկ միջավայրի վրա [Knight and Proom, 1950; Proom and Knight, 1955]: Անջատված 32 բակտերիալ շտամների կողմից 15 տարբեր շաքարների յուրացուման տվյալները բերված են աղյուսակ 1 - ում:

Ինչպես երևում է աղյուսակից կուլտուրաների մեծ մասը յուրացնում են սախարոզը, D–մելիբիոզը, D-մալթոզը, D-ռաֆինոզը, D-ֆրուկտոզը, D-մելիզիտոզը, ցելիբիոզը, D-մաննոզը, տրեգալոզը, D-գլյուկոզը, L-արաբինոզը, D-գալակտոզը: Միևնույն ժամանակ վատ են յուրացնում սորբիտոզը, L-ռամնոզը և D-քսիլոզը, որը բնորոշ է գրամ դրական սպորավոր բակտերիաներին:

Աղյուսակ 1

Շաքարների յուրացումը

Շտամը	սախարոզ	D -մելիբիոզ	D-մալտոզ	D-ռաֆինոզ	D-ֆրուկտոզ	D-մելիզիտոզ	ցելիբիոզ	D-մանոզ	սորբիտոզ	տրեհալոզ	D գլյուկոզ	L-արաբինոզ	D-գալակտոզ	L-ռամնոզ	D-քսիլոզ
AH 1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
AH 12	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
AH 2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AH 32	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
AH 33	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
AH 34	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
AH 41	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
AH 42	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
AH 43	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
AH 44	+	3-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
AH 51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
AH 52	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
AH 53	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
AH 71	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
AH 72	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
AH 73	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
AH 81	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
AH 83	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
AH 84	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
AH 9	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
AH 102	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
AH 11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
AH 122	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
AH 15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
AH 16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
AH 17	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
AH 19	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
AH 212	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
AH 22	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
AH 23	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AH 24	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
AH 251	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
AH 26	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
AH 29	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
AH 30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

Ազոտական միացությունների յուրացումը: Որպես ազոտի միակ աղբյուրներ փորձարկվել են NH_4NO_3, $NaNO_3$, KNO_3, NH_4Cl և ասպարագինը ագարային միջավայրում: Համաձայն ստացված տվյալների բոլոր կուլտուրաները բացի AH 9-ից յուրացնում են ամոնիակի երկու տեսակի աղերը: Ուսումնասիրված 32 շտամներից միայն ութը չեն յուրացնում ասպարագինը: Նիտրատները յուրացվում են շտամների ավելի քան կեսի կողմից:

Կուլտուրաների պահանջն ածի գործոնների նկատմամբ: Վիտամինների և ամինաթթուների նկատմամբ պահանջն ուսումնասիրվել է աուքսինոգրաֆիկ մեթոդով [Knight and Proom, 1950; Proom and Knight, 1955]: Որպես ամինաթթուների աղբյուր օգտագործվել է կազեինի հիդրոլիզատը: Փորձերի արդյունքում պարզվել է, որ կուլտուրաների ճնշող մեծամասնությունը չունի կախվածություն ամինաթթուներից կամ վիտամիններից:

Մեկուսացված կուլտուրաների ըստ վերը բերված մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական, մետաբոլիկ և կուլտուրալ հատկությունների ուսումնասիրման հիման վրա ըստ Բերգիի որոշիչի դասվել են 7 տեսակների (աղ. 2):

Աղյուսակ 2

Կոմպոստից անջատված կուլտուրաների տեսակային պտկանելիությունը

Տեսակը	Քանակը	Կուլտուրաները
Bacillus circulans	12	AH1, AH12, AH2, AH32, AH34, AH41, AH42, AH44, H81, AH83, AH84, H242
Bacillus macerans	9	AH33, AH43, AH51, AH15, AH17, AH222, AH251, AH26, AH29
Bacillus stearothermophilus	2	AH73, AH122
Bacillus sphaericus	6	AH9, AH11, AH16, AH19, AH212, AH23
Bacillus megaterium	1	AH102
Bacillus sp.	2	AH71, AH30

3.3. Անջատված կուլտուրաների ներտեսակային բազմազանության ուսումնասիրությունը

Անջատված կուլտուրաների տեսակային խմբերի մոտ ուսումնասիրվել են բջիջների շարժողականությունը, կատալազային ակտիվությունը, կախվածությունը թթվածնից, ածի ջերմաստիճանից, ինչպես նաև

ացետիլմեթիլկարբինոլի առաջացումը, նիտրատները նիտրիտների վերականգնելու կարողությունը ($NO_3 \rightarrow NO_2$), դեհիդրոքսիացետոնի առաջացումը, ամիլոլիտիկ ակտիվությունը, ժելատինազային ակտիվությունը, կատալազային ակտիվությունը, թիրոզինի քայքայումը, կիտրոնաթթվի և պրոպիոնաթթվի յուրացումը, հիպուրատի հիդրոլիզը, աճը pH 5,7- ում, գլյուկոզից գազ առաջացնելու հատկությունը, շաքարներից թթվի առաջացումը:

Bacillus circulans տեսակին պատկանող շտամների առանձնահատկությունները:

Անջատված *B. circulans* տեսակին պատկանող շտամներից երեքի մոտ հայտնաբերվել են թույլ արտահայտված կատալազային ակտիվություն՝ AH83, AH84, AH242: Աճի առավելագույն ջերմաստիճանը տատանվել է 65–75°C տիրույթում: Բացառությամբ AH242-ի մյուսները հիդրոլիզում են օսլան: Կազեինը հիդրոլիզում են միայն AH81, AH83 շտամները: AH44, AH12, AH242 շտամները նիտրատը չեն վերածում նիտրիտի: Ստուգումների արդյունքում ընդհանուր առմամբ հայտնաբերվել են չորս ենթատեսակ:

Bacillus macerans տեսակին պատկանող շտամների առանձնահատկությունները:

B. macerans տեսակին պատկանող շտամներից AH33 չունի կատալազային ակտիվություն իսկ AH51 մոտ այն թույլ է արտահայտված: Աճի առավելագույն ջերմաստիճանը տատանվում է 65–75°C տիրույթում: Օսլան չի հիդրոլիզում միայն AH26 շտամը: Կազեինը հիդրոլիզում են բոլորը բացառությամբ՝ AH17, AH251 և AH26 շտամների: Ժելատինը հիդրոլիզում են միայն AH33, AH43 և AH51 շտամները: AH43 չի աճում pH 5,7–ում: Ստուգումների արդյունքում ընդհանուր առմամբ հայտնաբերվել են վեց ենթատեսակ:

Bacillus stearothermophilus տեսակին պատկանող շտամների առանձնահատկությունները.

B. stearothermophilus տեսակին պատկանող շտամների մոտ հայտնաբերվել է արտահայտված կատալազային ակտիվություն:

Աճի մաքսիմալ ջերմաստիճանը տատանվում է 60–65°C տիրույթում: Շտամները տարբերվում են միմյանցից ժելատինի, կազեինի, օսլաի և թիրոզինի հիդրոլիզի ունակությամբ: Այս տեսակի մոտ առկա է երկու ենթատեսակ:

Bacillus sphaericus տեսակին պատկանող շտամների առանձնահատկությունները:

B. sphaericus-ին պատկանող շտամների մեծ մասի աճի առավելագույն ջերմաստիճանը գտնվում է 65–70°C տիրույթում: AH9 և AH11 շտամների աճի առավելագույն ջերմաստիճանը 45°C է: Շտամներից ոչ մեկը չի հիդրոլիզում ժելատինը, կազեինը օսլան և թիրոզինը: AH212 շտամը նիտրատը չի վերածում նիտրիտի: Այս տեսակի մոտ առկա է երեք ենթատեսակ:

Bacillus megaterium տեսակին պատկանող շտամների առանձնահատկությունները.

B. megaterium շտամը չունի կատալազային ակտիվություն, աճի առավելագույն ջերմաստիճանը 45°C, չի հիդրոլիզում ժելատինը, կազեինը, օսլան, թիրոզինը:

Bacillus sp. տեսակին պատկանող շտամների առանձնահատկությունները

Bacillus sp. տեսակին պատկանող շտամներից միայն մեկն է հիդրոլիզում օսլան, աճի առավելագույն ջերմաստիճանը 65-70°C: Անջատված շտամները աննշան տարբերվում են միայն pH-ի հանդեպ ունեցած զգայունությամբ:

Հետագա ուսումնասիրությունների համար լաբորատոր և արտադրական պայմաններում տարբեր տեսակների պատկանող միկրոօրգանիզմներից ընտրվել են ուտելի սնկերի աճի համար անհրաժեշտ սննդանյութերի հանդեպ առավել քիչ պահանջարկ ունեցող և կոմպոստի ջերմային ռեժիմի հանդեպ կայուն շտամներ:

3.4. Կոմպոստից անջատված սպորավոր բակտերիաների փոխազդեցությունը *Agaricus bisporus*-ի հետ

Լաբորատորիայում՝ հեղուկ և ագարային սննդամիջավայրերում համատեղ աճի պայմաններում ուսումնասիրվել է կոմպոստից անջատված սպորավոր բակտերիաների փոխազդեցությունը *Agaricus bisporus*-ի հետ:

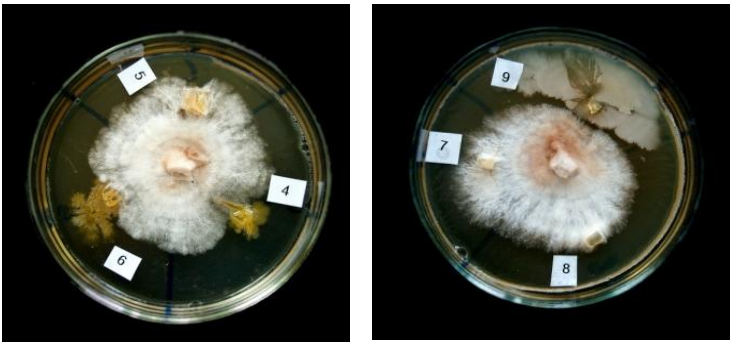
3.4.1. Կոմպոստից անջատված սպորավոր բակտերիաների փոխազդեցությունը *Agaricus bisporus*-ի 20 (MDC 10757) և 3712 (MDC 10762) արտադրական շտամների հետ՝ հեղուկ սննդամիջավայրում

Agaricus bisporus-ի երկու տարբեր MDC 10757 և MDC 10762 արտադրական շտամների և բակտերիաների փոխազդեցությունը հեղուկ սննդամիջավայրում: Փորձանոթում լցված տրիպտոզային միջավայրը ինոկուլացվել է կոմպոստից անջատված *Bacillus sphaericus* - AH9, *B. sphaericus* - AH11, *B. megaterium* -AH102, *B. stearothermophilus*-AH122 և էնտոմոպաթոգեն *B. thuringiensis* 1125, *B. thuringiensis* 2477, *B. sphaericus* 2633, ինչպես նաև *Pseudomonas sp., Bacillus sp.* WS1 բակտերիաների գաղութներից օղասեղով վերցված նմուշներով և սնկի ագարային միցելիումից կտրված խորանարդիկով և աճեցվել 20-30°C-ում թեք դիրքում, 14 օր 24 °C –ում:

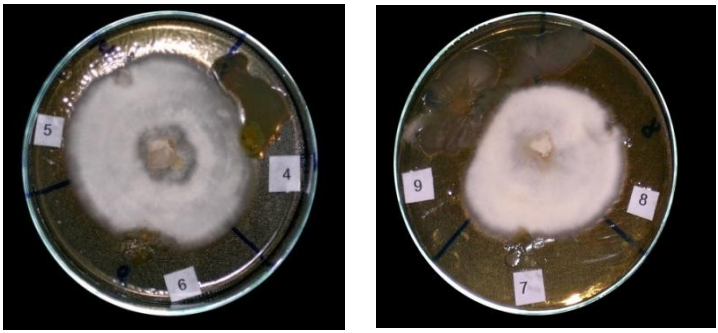
Փորձի արդյունքում պարզվել է, որ *A. bisporus*-ի 3712 շտամը հեղուկ միջավայրում բակտերիաների նկատմամբ ավելի մրցունակ է, հատկապես մակերեսային աճի ժամանակ: Չնայած բակտերիաների անհամեմատ արագ բազմացմանը նրանց կողմից խիստ արտահայտված անտագոնիզմ ուտելի սնկերի հանդեպ չի նկատվել:

3.4.2. *Agaricus bisporus*-ի և սպորավոր բակտերիաների փոխազդեցությունն ագարային սննդամիջավայրում

Սուսլո-ագար սննդամիջավայրի վրա, որտեղ ուտելի սնկերը և սպորավոր բակտերիաները հավասարաչափ լավ են աճում, *A. bisporus*-ի և սպորավոր բակտերիաների փոխազդեցությունն առավել ցայտուն է արտահայտված նկարներ 2-ում և 3-ում:



Նկ. 2- *A. bisprus* 20



Նկ. 3 - *A. bisprus* 3712

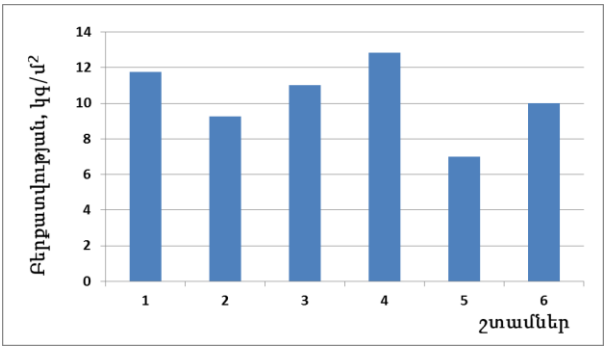
Նկ. 2-3. Կոմպոստից անջատված սպորավոր բակտերիաների փոխազդեցությունը *A.bisprus* 20 և 3712 շտամների հետ ագարային միջավայրում: *Pseudomonas sp.* (4), *B. sphaericus* AH9(5), *B. sphaericus* AH11(6), *B. megaterium* AH102(7), *B. stearothermophilus* AH122(8), *Bacillus sp.*WS1(9):

Ինչպես երևում է նկարներից, կոմպոստից անջատված AH9, AH11, AH122 կուլտուրաները սնկերի հետ գտնվում են սիմբիոզի վիճակում՝ չցուցաբերելով

անտագոնիզմ: *B. megaterium* տեսակին պատկանող AH102 շտամը և *Pseudomonas sp.* շտամները՝ համակեցության վիճակում:

3.5. Կոմպոստից անջատված միկրոօրգանիզմների փորձարկումը շամպինյոնի փոքրածավալ արտադրությունում

Բակտերիաները կարևոր դեր են խաղում ուտելի սնկերի զարգացման տարբեր փուլերում: Հատկապես մեծ է նրանց դերը բուծվող սնկերի պտղամարմինների առաջացման գործում, քանի որ մակրոմիցետների մեծ մասը չեն կարողանում պտղաբերել մանրէազերծված պայմաններում: Հատկանշական է, որ բակտերիալ սուսպենզիայի ավելացումը մանրէազերծված ծածկահողին ճնշում է սնկի միցելիումի աճը, բայց միևնույն ժամանակ խթանում է պրիմորդիների զարգացումը և պտղամարմնի ձևավորումը [Reddy et al.,1990]: Մեր կողմից բացի ծածկահողից ուսումնասիրվել է նաև բակտերիալ ներմուծումների ազդեցությունը կոմպոստի մեջ միցելիումի ձևավորման տարբեր փուլերում: Փորձի իրականացման ժամանակ բակտերիալ կուլտուրաները սփռվել են յուրաքանչյուր պարկի մակերեսին 1-ին և 14-րդ օրը, երբ միցելիումի աճը հասել է 60-70%: Այնուհետև երկու օր անց պարկերը ծածկվել են հողի բարակ շերտով: Բակտերիաների երրորդ ներմուծումը կատարվել է ծածկահող, ինկուբացիայի 21-րդ օրը, երբ սնկային միցելիումը ներաճած է լինում նրա մեջ: Բակտերիալ ներմուծումների ազդեցությունն ուտելի սնկերի պտղաբերության վրա բոլոր ալիքներում միասին վերցված, հիստոգրի տեսքով ներկայացված է նկար 4 – ում:



Նկ. 4. Կոմպոստից անջատված բակտերիաների ազդեցությունը *Agaricus bisporus* 3712 և 20 շտամների միջին բերքատվության վրա, կգ/մ²՝ 1- *B. sphaericus* AH9, 2 - *B.megaterium* AH102, 3 - *B. sphaericus* AH11, 4 - *B. stearothermophilus* AH122, 5 - *Bacillus sp.* WS1, 6 - Ստուգիչ

Ինչպես երևում է ներկայացված հիստոգրից, կոմպոստից անջատված *B. sphaericus* - AH9, *B. sphaericus* - AH11 և *B. stearothermophilus*-AH122

կուլտուրաները բարձրացնում են բերքատվությունը 10-20%-ով: Մյուս կուլտուրաները, ընդհանուր առմամբ, ազդեցություն չեն թողնում սնկային միցելիումի աճի և պտղամարմինների ձևավորման վրա: Պարկերը, որոնցում միցելիումը վարակված է եղել *Bacillus sp.* WS1 անտագոնիստ կուլտուրայի կախույթով, ձևավորել են մեծ քանակությամբ պրիմորդիներ, որոնք հատագայում չեն հասունացել: Ուտելի սնկերի բերքատվության վրա ազդեցություն ունեցած կուլտուրաներն ըստ նվազման կարգի կարելի է դասավորել հետևյալ շարքով. *B. stearothermophilus* AH122 > *B. sphaericus* AH9 > *B. sphaericus* AH11 > *B. megaterium* AH102 > *Bacillus sp* . WS1:

3.6. Կենսամեթոդի կիրառումը սնկային վարակների և վնասատու միջատների դեմ պայքարում

Սնկարտադրության մեջ կենսամեթոդը կիրառվում է երկու տարբերակով՝ առաջինն ուղղված է սնկային վարակների դեմ, իսկ երկրորդը՝ վնասատու միջատների և նրանց թրթուրների դեմ:

3.6.1. Կոմպոստից անջատված բակտերիաների փորձարկումը սնկայի հիվանդությունների հարուցիչների դեմ կենսաբանական պայքարում

Համաձայն գրական տվյալների սնկային հիվանդությունների դեմ պայքարում օգտագործվում է հիմնականում *Pseudomonas* տեսակին պատկանող բակտերիաները, որոնց համար թիրախ է հանդիսանում ուտելի սնկերի «չոր փտում» կոչվող հիվանդության հարուցիչ *Lecanicillium fungicola*-ն: Բացի *Pseudomonas*-ից մեր կողմից հետազոտվել է կոմպոստից մեկուսացված սպորավոր բակտորիաների դերը սնկանոցում ուտելի սնկերի տարբեր հիվանդությունների վարակների առաջացման գործում: Արտադրական պայմաններում մոտ երկու տարվա փորձերի արդյունքում չի արձանագրվել սնկային հիվանդությունների վարակի որևիցե դեպք, որը հիմնականում պայմանավորված է մշակված կոմպոստի էնդոգեն և էկզոգեն՝ կոմպոստից անջատված սպորավոր և *Pseudomonas* տեսակին պատկանող միկրոօրգանիզմների ներմուծուներով: Հայտնի է, որ բիոկանտրոլը երբեմն կրում է տարերային բնույթ, ինքնաբերաբար իրագործվում է կոմպոստում և/կամ ծածկահողում առկա մեկ կամ մի քանի տեսակի միկրոօրգանիզմների միջոցով:

3.6.2. Կոմպոստից անջատված բակտերիաների փորձարկումը սնկանոցում միջատների և նրանց թրթուրների դեմ կենսաբանական պայքարում

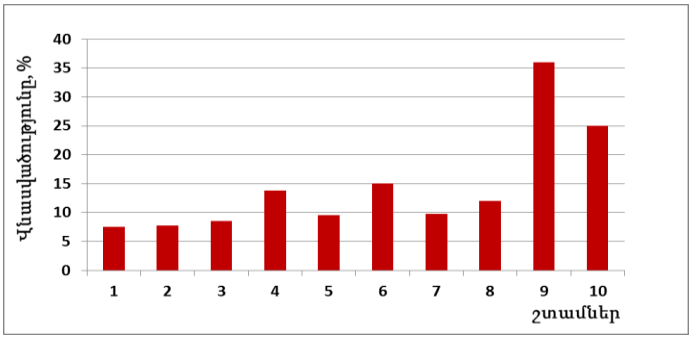
Միջատները հանդիսանում են այնպիսի հիվանդությունների հարուցիչների սպորների փոխանցողներ, ինչպիսիք են չոր և թաց փտումը, սարդոստայնակերպ բորբոսը, տրիխոդերման: Բացի այդ նրանց թրթուրները ուղղակիորեն վնասում են պտղամարմինները [Мокроусова и др. 2005; Сафрай,

2006]: Սնկանոցների վնասատու միջատների դեմ պայքարում, տարբեր հեղինակների կողմից ցույց է տրվել, որ *B. thuringiensis subsp. Israilensis*-ի (BTI) և բակտերիալ լարվիցիդային պատրաստուկների (ԲԼՊ) կիրառումը նվազեցնում է սնկերի վնասվածությունը [Меликсетян, Орманян, 1989; Chang, Miles, 2004]:

Սնկանոցում միջատների դեմ պայքարում մեր կողմից փորձարկվել են կոմպոստից անջատված, իսկ որպես ստուգիչ ՄԱԿ-ի հավաքածուից *B. sphaericus* 2633, *B. thuringiensis subsp. israilensis*–2477 և *B. thuringiensis subsp. israilensis* –1125 էնտոմոպաթոգեն շտամները: Նախապես լաբորատոր պայմաններում ուսումնասիրվել է նշված բակտերիաների ազդեցությունը *A. bisporus*-ի երկու արտադրական շտամների վրա հեղուկ և ագարային միջավայրերում համատեղ աճի ընթացքում: Փորձը ցույց է տվել, որ փորձարկման համար նախատեսված էնտոմոպաթոգեն բակտերիաներն ուտելի սնկերի վրա բացասական ազդեցություն չեն թողնում:

3.6.3. Էնտոմոպաթոգեն և կոմպոստից անջատված բակտերիաների ազդեցությունը *Agaricus bisporus*-ի վրա կիսաարտադրական պայմաններում

Մեր կողմից ուսումնասիրվել է միջատասպան բակտերիաների ազդեցությունը շամպինյոնի ապրանքային որակի վրա: Այդ նպատակով կոմպոստի 10 կգ-ոց պարկերում աճեցված բազիդիոմիցետների միցելիումի առաջին ցողումը բակտերիաների կախույթով կատարվել է ինկուբացիայի 1-ին և 14-րդ օրը միցելիումի աճի 60-70% առկայության դեպքում, երբ միջատները գտնվել են զարգացման թրթուրային փուլում: Այնուհետև երկու օր անց պարկերը ծածկվել են հողի բարակ շերտով: Բակտերիաների երրորդ ներմուծումը կատարվել է ինկուբացիայի 21-րդ օրը, երբ սնկային միցելիումը ներաճած է եղել հողի ծածկող շերտում: Փորձնական պարկերի սնկերի բերքատվությունը համեմատվել է ստուգիչ պարկի հետ:



Նկ. 4. Պտղամարմինների վնասվածության տոկոսը
1-*B. sphaericus* 2633, 2 - *B. thuringiensis* 1125, 3 - *B. thuringiensis* 2477,

4-Pseudomonas sp., **5 - *B. sphaericus* AH9, 6 - *B. megaterium* AH102, 7-*B. Sphaericus* AH11, 8 - *B. stearothermophilus* AH122, 9 - *Bacillus sp.* WS1, 10 - Ստուգիչ**

Առողջ պտղամարմինների առաջացման վրա դրական ազդեցություն են թողնում օժտված կոմպոստից անջատված *B. sphaericus* շտամները, որոնք հայտնի միջատասպան *B. thuringiensis* և ֆունգիցիդ *Pseudomonas sp.* կուլտուրաներին հավասար իջեցրել են պտղամարմինների վնասվածությունը 3-4 անգամ: Համաձայն մեր դիտարկումներին պարկերը, որտեղ ավելացված են եղել նշված բակտերիաների կախույթները, թրթուրներ և մլակներ չեն զարգացել:

ԵԶՐԱԿՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1.Կոմպոստի ֆերմենտացիան ուղեկցվում է ջերմատիճանի բարձրացմամբ միչև 65-75°C, որի պատճառով սկզբնական մեզոֆիլ միկրոֆլորան փոխարիվում է թերմոֆիլ միկրոֆլորայով: Կոմպոստացման սկզբնական փուլում կուլտիվացվող մեզոֆիլ (*B. sphearicus, B. emgaterium, Bacillus spp.*) և թերմոֆիլ բակտերիաների (*B. srtearothermophilus, B. circulans, B. macerans*) հարաբերակցությունը 5:1 է, որը նրա ավարտին դառնում է 2:4: Ամբողջ կոմպոստացման ընթացքում հանդիպում են ակտինոմիցետներ, որոնք սուբստրատում բազմանում են շատ դանդաղ և էական ազդեցություն չեն թողնում կոմպոստի հասունացման վրա:

2. Մորֆոլոգիական, կուլտուրալ, ֆիզիոլոգակենսաքիմիական լայնածավալ հետազոտությունների արդյունքում համաձայն կոմպոստից մեկուսացված միկրոօրգանիզմները դասակարգվել են 7 տեսակների և 15 ենթատեսակների՝ *B. circulans* (4 ենթատեսակ), *B. macerans* (6 ենթատեսակ), *B. stearothermophilus* (2 ենթատեսակ), *B. sphaericus* (3 ենթատեսակ), *B. megaterium* և *Bacillus sp.* (2 տեսակ):

3. Մանր եղջերավոր կենդանիների գոմաղբն իր էնդեմիկ միկրոֆլորայի կազմով էականորեն չի տարբերվում ձիու գոմաղբից և որպես այլընտրանքային սուբստրատ կարող է ապահովել սնկաբուծության համար բարձր տաքացման որակյալ կոմպոստի ստացումը:

4. Կոմպոստից մեկուսացված միկրոօրգանիզմների ուտելի սնկերի հետ ագարային և հեղուկ սննդամիջավայրերում համատեղ կուլտիվացման ընթացքում ի հայտ են բերվել սիմբիոզի և համակեցության տարբեր ձևեր:

5. Արտադրական պայմաններում սիմբիոտիկ միկրոօրգանիզմների պարբերաբար ներմուծումը կոմպոստ և այնուհետև ծածկահող նպաստում է

պտղամարմինների գոյացմանը և հետագա զարգացմանը, ավելացնելով միցելիումի բերքատվությունը 20-30%-ով:

6. Կոմպոստի էնդոգեն և էկզոգեն սպորավոր ու *Pseudomonas* տեսակին պատկանող միկրոօրգանիզմների կարող են հիմք հանդիսանալ շամպինյոնի սնկային հիվանդությունների պայքարի արդյունավետ կենսամեթոդի մշակման համար:

7. Արտադրական պայմաններում մեր կողմից անջատված շտամների կիրառումը վնասատու միջատների և նրանց թրթուրների դեմ պայքարում բերում են ուտելի սնկերի միցելիումի և պտղամարմինների վնասվածության կտրուկ նվազման և բերքի որակական ու քանակական ցուցանիշների բարձրացման:

Ատենախոսության հիմնական արդյունքները տպագրված են հետևյալ աշխատանքներում

1. Հակոբյան Ա.Գ. Բազիդիոմիցետների և սպորավոր բակտերիաների փոխազդեցության վերաբերյալ // Հայաստանի կենսաբ. հանդես.-2004.- Հ. 3-4(56).- Էջ. 272-275:
2. Հակոբյան Ա.Գ., Հովհաննիսյան Հ.Գ. Կոմպոստից մեկուսացված բակտերիաների ազդեցությունը *Agaricus bisporus* աճի վրա լաբորատոր և փորձաարտադրական պայմաններում // Հայաստանի կենսաբ. հանդես.-2013.-Հ. 3(65).- Էջ.125-129:
3. Акопян А.Г. Читчян К.В., Хачатурян А.А. Характеристика термофильных бацилл компостов для грибоводства // Биолог. журн. Армении.-2007.-Т. 1-2 (59) .- С. 84-90.
4. Акопян А.Г. Об использовании спорообразующих бактерий при выращивании съедобных грибов // Биолог. журн. Армении.-2007.-Т.3-4 (59).- С . 317-320.
5. Hakobyan A.G., Hovhannisyan H.G. Bacillar microflora of compost and its impact on the production of edible mushrooms // “Contribution of the Young Generation in the Development of Biotechnology”: 2nd International Scientific Conference of Young Researchers.- Yerevan, 2013.-P.3.

АКОПЯН АНУШ ГРИГОРЬЕВНА

ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ИЗ МИКРОФЛОРЫ КОМПОСТА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАЗВИТИЕ СЪЕДОБНОГО ГРИБА *AGARICUS BISPORUS*

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: *A. bisporus*, компост, компостные бактерии, идентификация, полупромышленное испытанне, биоконтроль

Поскольку базидиомицеты не имеют хлорофилла, они получают все питательные вещества из органического субстрата, так называемого компоста. Компостирование является биологическим превращением твердого органического сырья (например, конского навоза, соломы) в полезный для выращивания грибов субстрат. Независимо от продукта, активным компонентом для биодеградации и преобразования в процессе компостирования является резидентное микробное сообщество. Таким образом, оптимизация качества компоста напрямую связана с составом и преемственностью микробных сообществ в процессе компостирования. С другой стороны, эти организмы, взаимодействуя со съедобными грибами, могут стимулировать их морфогенез и развитие. В связи этим, существует настоятельная необходимость мониторинга и характеристики микробных сообществ впроцессе компостирования для установления связи микробных сообществ качеством компоста. Изучение закономерностей взаимодействия микроорганизмов компоста с базидиомицетами может служить основой для искусственного обогащения полезными видами микроорганизмов мицелиального компоста и покровного слоя, способных поднять урожайность и улучшить качество грибов.

Целью данного исследования было выделение и характеристика основных видов микроорганизмов в течение всего процесса компостирования, подготовленного из альтернативных субстратов (овечьего навоза, пшеничной соломы) и исследование их влияния на рост *A.bisporus* в лабораторных и полупромышленных условиях для разработки соответствующих микробных препаратов, способных стимулировать рост грибов и осуществить биоконтроль патогенных грибов, насекомых/червей.

Для приготовления субстрата компостные ингредиенты (овечий навоз и пшеничная солома) поливали водой и оставляли на открытой платформе на ночь, а на следующий день из них формировали бурт. Бурт оставляли

нетронутым, пока температура внутри не достигнет 45-55°С и производили первое перемешивание, а последующие производили каждые три дня. В результате после 28 до 30 дней компостирования с одной тонны сухого основного материала мы получили от 1,5 до 1,6 тонн компоста. Ежедневно измеряли температуру компоста, отбирали пробы из 30 см глубиныи делали засевы на соответствующих селективных температурах и питательных средах.

На ранних стадиях компостирования доминировали мезофильные бациллы, а при высоких температурах в основном присутствовали термофильные и термотолерантные бациллы и актиномицеты. Из подвергнутых пастеризации проб были отобраны 32 чистых культур спорообразующих бактерий, которые по своим культуральным, морфологическим, физиологическим и биохимических характеристикам были разделены на 7 видовых групп: *B. circulans, B. macerans, B. stearothermophilus, B. sphaericus, B. megaterium и Bacillus sp.*, которые после дополнительных анализов в свою очередь были разделены на 15 подвидов.

Взаимодействие *A. bisporus* и микроорганизмов выделенных из компоста, изучали при их совместном выращивании на агаризованной питательной среде. Между ними было обнаружено проявление как симбиоза, так и толерантности. Наиболее активные симбиотические штаммы из каждого вида были выделены для дальнейшего полупромышленного испытания.

Действие выделенных из компоста микроорганизмов *A. bisporus* в полупромышленных условиях было исследовано распылением бактериальных суспензий 10^7 КОЕ/мл на поверхность компоста после роста мицелия на 14-й день и на покровную почву в первый день нанесения и 7-й день после врастания мицелия. Было обнаружено, что штаммы *B. sphaericus* АН9*, B. sphaericus* АН11 и *B. stearothermophilus* АН122 способствуют ускорению вегетативного роста, морфогенеза иповышаютурожай грибов до 20%, по сравнению с контролем.

Внесение выделенных из компоста бактерий, особенно *B. sphaericus* АН11, в компост и покровную почву, защищая мицелий и плодовые тела *A. bisporus* от вредносного влияния насекомых/червей и патогенных грибов, способствуют повышению качества урожая грибов.

Таким образом было установлено, что компост, сделанный из альтернативных ингредиентов, по температурному профилю, питательным свойствам, а также качественному и количественному составу микрофлоры не уступает компосту, изготовленному из традиционных материалов. А выделенные из него микроорганизмы могут применяться в качестве стимуляторов роста и агентов биоконтроля в грибном производстве.

HAKOBYAN ANUSH G.

THE ISOLATION, IDENTIFICATION OF SPOREFORMING BACTERIA FROM COMPOST MICROFLORA AND THEIR INFLUENCE ON EDIBLE *AGARICUS BISPORUS* MUSHROOM DEVELOPMENT

SUMMARY

Key words: *A. bisporus*, compost, composting bacteria, identification, semiindustrial trial, biocontrol

Because the basidiomycetes have no chlorophyll, they must get all nutrients from organic matter in their growing medium called compost. Composting is the biological conversion of solid organic raw materials (e.g. horse manure, straw or hey) into usable substrate for mushroom production. Regardless of the product, the active component mediating the biodegradation and conversion processes during composting is the resident microbial community. Therefore, optimization of compost quality is directly linked to the composition and succession of microbial communities in the composting process. On the other hand, these organisms by interacting with edible mushrooms can stimulate their morphogenesis and development. This means that there is an urgent need to monitor and characterize microbial communities during the composting processes and to relate microbial communities to compost quality. The study of the patterns of interaction of compost's microorganisms with basidiomycetes can serve as a basis for enrichment of spawn compost and casing soil by artificial useful types of microorganisms that can improve the productivity and quality of mushrooms.

The aim of this study was isolation and characterization of key microbial species during the commercial composting process prepared with alternative substrates (sheep manure, wheat straw and additives) and investigation their influence on *Agaricus bisporus* growth in laboratory and semiindustrial conditions for designing appropriate microbial amendments for stimulation of the mushroom growth and biological control against fungal pathogens and insects/worms.

For substrate preparation the composting ingredients, sheep manure and wheat straw were watered on an open platform overnight with stacking done the next day. The stack allowed to stay undisturbed till the temperature inside reaches 45-55°C and the first turn is made, then subsequent turns are made depending upon heating in stack. From a ton dry base material, we obtained 1.5 to 1.6 ton compost after 28 to 30 days of composting.Every day temperature control and sampling from compost were done from 30 cm depth.The microorganisms from samples are plated on appropriate media and temperatures.

These include mesophilic bacilli associated with the early stages of composting and thermophilic and thermotolerant bacilli and actinomycetes present during peak heating. Pure cultures of 32 sporeforming bacilli were identified according to the cultural, morphological, metabolic, physiological and biochemical data divided in 7 species groups: *B. circulans*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. sphaericus*, *B. megaterium and Bacillus sp.*, these in turn was subdivided in 15 subspecies.

The interaction of *A. bisporus* and microorganisms obtained from compost was studied by joint cultivation on agar nutrient medium and both symbiosis and tolerance were revealed between them.The most active symbiotic strains from each species were isolated for further semiindustrial trial.

The action of obtained microorganisms isolated from compost on the vegetative growth and morphogenesis of *A. bisporus* in the semiindustrial conditions investigated by spraying of bacterial suspensions 10^7 CFU/ml on composts surface at the 14th day after spawning and on casing soil at the first and 7th day. It is revealed that introduction of *B. sphaericus* AH9, *B. sphaericus* AH11 and *B. stearothermophilus* AH122 cultures increased the yield of mushrooms up to 20 %, comparedthis with entreated control.

Application of bacteria from compost, especially *B. sphaericus* AH11, to compost and casing soil protect *A. bisporus* mycellium, primordial and fruit bodies from spoiling and damaging by carrying out of biological control insects/worms and pathogen fungi.

Thus, it was revealed that compost made from alternative ingredients by temperature profile, quality and amount of microorganisms and nourishing and nourishing quality is not yield to compost made from traditional ingredients. And the isolated microorganisms can be used as growth stimulators and biological control in mushroom production.