

А. В. Киракосян, Ж. С. Мелконян,
Э. А. Овсепян, М. М. Мкртчян

ВИДОВОЙ СОСТАВ И ХАРАКТЕРИСТИКА АЗОТОБАКТЕРА В ПОЧВАХ АРМЯНСКОЙ ССР

Работ по распространенности отдельных видов азотобактера в различных типах почв в литературе почти не имеется. Известно, что наиболее характерным и широко распространенным видом азотобактера во всех изученных почвенно-климатических зонах Советского Союза является *Az. chroococcum*. Почвы Армении оказались своеобразным хранилищем культур разных видов и разновидностей азотобактера.

Изучение распространения азотобактера в почвах Армянской ССР было начато в середине 30-х годов и продолжалось в последующие годы на большом материале (Петросян и др., 1936; Паносян, 1948; Киракосян и др., 1955).

Целью наших исследований являлось изучение распространения азотобактера в различных почвенно-климатических условиях Армянской ССР. Проведенные исследования позволили выделить многочисленные штаммы азотобактера и создать большую коллекцию, состоящую из видов *Az. chroococcum* (пигментированные и бесцветные штаммы), его разновидности *Az. beijerinckii*, *Az. nigricans* и *Az. agilis* с разновидностью *Az. vitreus*.

В настоящей статье дается описание культуральных и морфо-физиологических особенностей видов *Az. nigricans*, *Az. chroococcum* и его разновидности *Az. beijerinckii*. Ранее нами описаны виды *Az. agilis* v. *armeniacus* и *Az. vitreus* v. *armeniacus* (Киракосян, Мелконян, 1964). Для характерис-

тики штаммов и их идентификации, наряду с морфо-физиологическими и культуральными особенностями, изучались способность биосинтеза физиологически активных веществ (Кирахосян и др., 1969), строение жгутикового аппарата (Мелконян, 1973), образование флуоресцирующего пигмента (Мелконян и др., 1966) и другие признаки. Среди выделенных штаммов оказались активные продуценты антибиотических и физиологически активных веществ, которые могут быть использованы для повышения урожайности, а также в борьбе с возбудителями болезней сельскохозяйственных растений.

Материал и методика исследований

Распространение азотобактера изучалось в различных типах почв Армянской ССР — бурых, каштановых, черноземах, горно-лесных и горно-луговых. Было отобрано 280 почвенных образцов из 19 районов. Образцы исследованных почв брались в основном из окультуренных участков с глубины 0–20 см.

Для изучения распространения культур азотобактера в почвах и их выделения применялся метод раскладывания почвенных комочков на поверхности агаризованной среды Эшби, а в отдельных случаях — метод почвенных пластинок по Виноградскому.

Из числа выделенных нами культур было отобрано 49 наиболее характерных штаммов *Az. chroococcum*, *Az. beijerinckii*, *Az. nigricans* для изучения их культуральных и морфо-физиологических особенностей. Морфо-физиологические и культуральные особенности штаммов изучались на средах: Эшби-агаре с разными источниками углерода (сахароза, глюкоза, маннит, этиловый спирт, бензойнокислый натрий, молочнокислый кальций), жидкой среде Эшби, Эшби-желатине, МПА, МПБ, сусло-агаре, картофеле и молоке. Морфология клеток изучалась в динамике развития в окрашенных фуксином мазках и живых препаратах. Идентификация выделенных культур проводилась по определителям Красильникова (1949) и Берге (Berge et al., 1957). Азотофиксирующая активность культур изучалась на жидкой среде Федорова с сахарозой (2%). Азот определялся микрометодом Кьельдаля, остаточный сахар в среде — методом Шорля (Черевитинов, 1938).

Результаты исследований

Из данных табл. 1 следует, что существует определенная

Таблица 1
Распространение азотобактера в различных типах почв
Армянской ССР (обращение почвенных комочков на среде Эшби, %)

Почвенные зоны	Типы почв	Всего исследо- вано образ- цов почв	Обнаружено <i>Az. christensenii</i>				<i>Az. agilis</i>				образцание почвенных комочков I-85	
			почвенные образцы		образцание почвенных комочков		почвенные образцы		образцание почвенных комочков			
			Кол-во	%	I	x/ I 85	Кол-во	%	I	x/ I 85		
Полупустынная Предгорная Горно-степная Горно-лесная	бурые каштановые черноземные лесные, черно- земные	83 71 64 16	83 57 23 5	100 80 36 31	61,7±65,5 35,4±38,6 32,8±37,6 7,0±13,0	8 32 5 0	8 45 7,8 0	9,6 10,4±17,2 47,8±52,6 2,2±5,8	9 0 0 0	10,8 0 0 0	52,4±67,6 0 0 0	
	Горно-луговая	46	3	6,5	0,9±3,3	0	0	0	0	0	0	0

x/I - относительный вероятный интервал с вероятностью 95 %.

закономерность в распространении отдельных видов азотобактера в различных типах почв. Так культуры *Az. chroococcum* в больших количествах обнаруживаются во всех образцах бурых почв, сравнительно меньше их в каштановых почвах и черноземах, а в горно-лесных и горно-луговых количество культур резко снижается. *Az. nigricans* чаще и в больших количествах встречается в каштановых, редко - в бурых и черноземах, а в горно-лесных и горно-луговых почвах отсутствует. Культуры *Az. agilis* выделены только из бурых почв Арташатского района с высокостоящими грунтовыми водами. В других почвах даже с высокостоящими грунтовыми водами, этот вид не удалось обнаружить.

Исследования по распространению азотобактера в почвах Армении показали, что в зависимости от смены почвенно-климатических зон значительно меняется не только качественный, но и количественный состав азотобактера.

В процессе этих исследований было выделено большое количество штаммов азотобактера, описание которых дается по отдельным видам. Сводные данные по сравнительному описанию культуральных особенностей видов азотобактера, распространенных в почвах Армянской ССР, приводятся в табл. 2.

Azotobacter chroococcum Beijerinck, 1901

Наряду с широко известными пигментированными культурами нами были выделены слабоокрашенные (светло-желтые) и бесцветные формы *Az. chroococcum* некоторые из них в старых культурах окрашиваются в светло-коричневый цвет. Для исследований было отобрано 25 пигментированных и слабоокрашенных штаммов *Az. chroococcum*, в том числе и коллекционный штамм №53 (ВНИИ с.-х. микробиологии).

В односуточной культуре клетки *Az. chroococcum* представлены подвижными гомогенными палочками. На 3-4 сутки клетки зернистые, крупные овальные (2,8 - 4,8 x 2,0-2,8 мк) и кокковидные (1,8-3,2 мк в диаметре), расположены одиночно, парно, в пакетах, цепочкой и в виде тетракокков (рис. 1). Часто встречаются и капсулированные клетки. На 7-10 сутки клетки инцистируются, а через 1-1,5 месяцев цисты уменьшаются и принимают неправильную форму (рис. 2). Цистообразование у слабоокрашенных и бесцветных штаммов наступает позже, чем у пигментированных. У штаммов с сухой поверхностью колоний цикл развития, форма клеток не отличаются от слизистых, только размеры клеток сравнительно меньше, зернистость

Таблица 2

Сравнительная характеристика культуральных видов азотобактера

Az. agilis	Az. vitreus	Az. chroococcum	Az. beijerinckii	Az. nigricans
Интенсивность роста и характеристика пигмента				
Эшби - агар	+++ хромоларный от светло-бурого до темно-бурого или черного с фиолетовым оттенком	+++ хромоларный бесцветный, желтый, коричнево-бурый или черный желтый	+++ хромоларный	+++ хромоларный от коричнево-бурого до черного с фиолетовым оттенком
Эшби - желатина	+++ колонии - бесцветные, среда - розовая	+++ колонии и среда - бесцветные	+++ колонии бесцветные, среда - розовая	+++ колонии бесцветные, среда - розовая
Эшби - агар с бензойнокислым натрием	нет роста	+	++ хромоларный	нет роста
МПБ	+++	++	++	нет роста
Сусло - агар	нет роста	++	+++	++

Примечание: интенсивность роста обозначена по пятибалльной системе

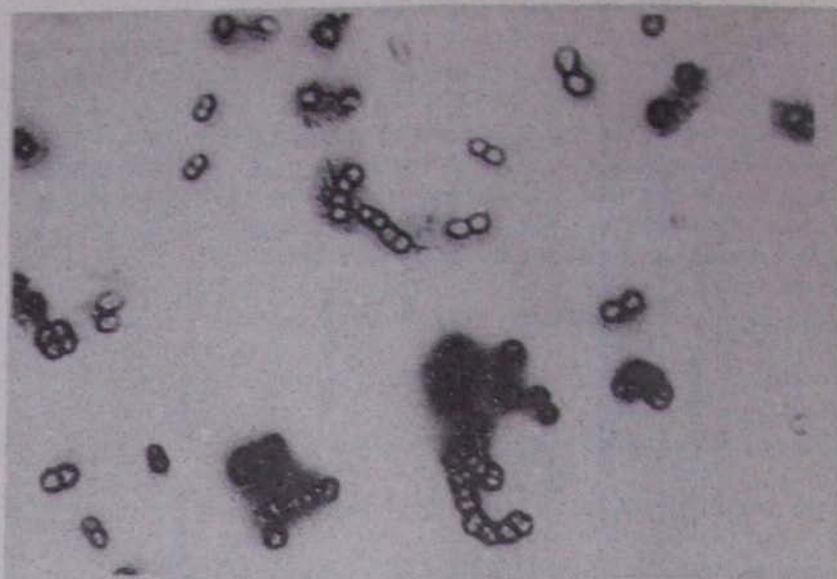


Рис. 1. *Az. chroococcum*, шт. 159 (4-суточная культура). Зернистые кокки, диплококки, пакеты, цепочки, тетракокки. Увеличение в 850 раз.

нежнее и оболочки тонко очерчены. Колонии культур выпуклые гладкие или морщинистые, слизистые или сухие, стекающие или компактные (пастообразные). Пигмент хромоформный (не диффундирует в среду) от светло-коричневого до темно-бурого цвета, за исключением слабоокрашенных штаммов.

Культуры хорошо растут на сахарозе, глюкозе, этиловом спирте; некоторые не развиваются на манните, молочнокислом кальции, бензойнокислом натрия. Штаммы, растущие на бензойнокислом натрия, в том числе и бесцветные, образуют диффундирующий в среду бурый пигмент. Слабо развиваются на МПА МПБ и сусло-агаре; на ломтиках картофеля не растут, желатину не разжижают, растут слабо, пигмент не образуют; молоко не пептонизируют. Клетки на МПА, МПБ, сусло-агаре и молоке сильно деформируются. Фиксируют 10-15 мг азота на 1 г усвоенной сахарозы.

Как показали исследования, местные штаммы *Az. chroococcum* являются типичными представителями данного вида.

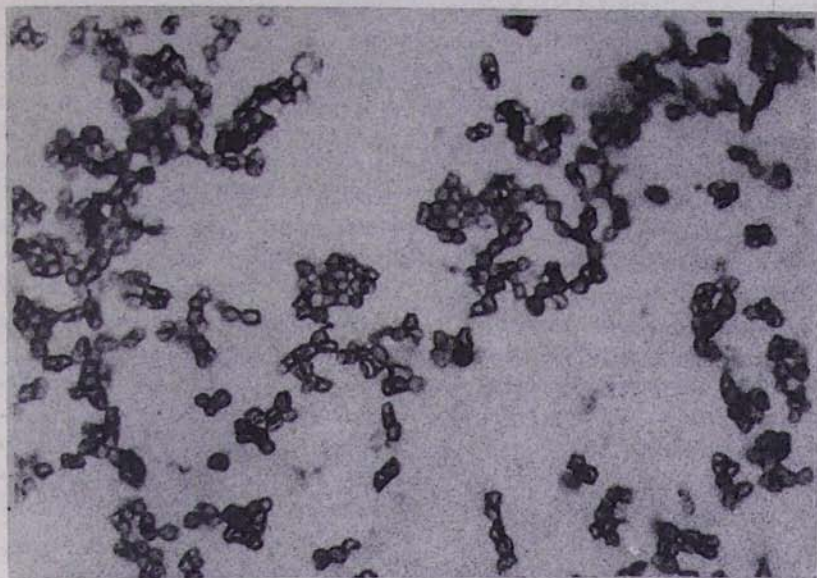


Рис. 2. *Az. chroococcum*, шт. 171 (30-суточная культура). Индистигированные клетки неправильной формы. Увеличение в 850 раз.

Azotobacter beijerinckii Lipmann, 1906

Штаммы *Az. beijerinckii* в почвах Армении обнаруживаются редко и были выделены нами из бурых почв Еревана и Октемберянского района. Они являются наиболее малочисленными из имеющихся в нашей коллекции видов азотобактера. Исследовано всего 6 штаммов.

В суточной культуре клетки в виде гомогенных подвижных палочек и неподвижных кокков. В последующем клетки зернистые овальные (4,3 x 3 мк) и кокковидные (2,7-3,2 мк в диаметре), расположены одиночно, попарно, редко цепочкой. На 6-7 сутки зернистость становится менее четкой, оболочки уплотняются, клетки уменьшаются в размерах, но цист не образуют. Встречаются колонии двух типов: сухие, бугристые, пигментация желтая, и слизистые штаммы, хорошо растущие, колонии выпуклые, стекающие, гладкие, белые или светло-желтые, последние с возрастом окрашиваются в светло-коричневый цвет.

Хорошо растут на сахарозе, глюкозе, манните, этиловом спирте, слабо - на МПА, МПБ, сусло-агаре, молочнокислом кальции, желатине и бензойнокислом натрии. На последнем два штамма не развиваются, а выросшие культуры образуют хромопарный (диффундирующий в среду) бурый пигмент. Не развиваются на помтиках картофеля, три штамма не растут на манните. Молоко не пептонизируют, желатину не разжижают. При культивировании на средах с молочнокислым кальцием и этиловым спиртом обнаруживаются инцистированные клетки.

Таким образом, штаммы *Az. beijerinckii* отличаются от слабопигментированных штаммов *Az. chroococcum* только отсутствием цист на основных средах. Хотя, как уже отмечалось, у последних цистообразование наступает позже, чем у пигментированных форм *Az. chroococcum*. На сходство непигментированных штаммов *Az. chroococcum* с *Az. beijerinckii* указывали Ленис и Смит (Lohnis, Smith, 1923). Ряд авторов объединил *Az. beijerinckii* с *Az. chroococcum* по сходству некоторых признаков, рассматривая его как разновидность *Az. chroococcum* (Красильников, 1949; Рубенчик, 1960; Lohnis, Smith, 1923; Breed et al., 1957 и др.). Другие авторы выделили их в отдельный вид (Виноградский, 1952; Вэрс, Делекен, 1966; Jensen, 1954, и др.).

В результате исследований мы, как и большинство авторов, считаем целесообразным рассматривать *Az. beijerinckii* как разновидность *Az. chroococcum*. Исследованные нами штаммы *Az. beijerinckii* идентичны с описанными в литературе культурами, с тем различием, что клетки местных штаммов по размерам несколько меньше и более активно фиксируют азот атмосферы - 14-16 мг/г усвоенного сахара.

Azotobakter nigricans Krassilnikov, 1949

Впервые *Az. nigricans* выделен из почв Средней Азии и описан Красильниковым (1949). Из многочисленной коллекции штаммов *Az. nigricans* нами исследовано 18 культур, выделенных в основном из каштановых почв Аштаракского и Абовянского и только некоторые из бурых почв Арташатского и Октемберянского районов.

В суточной культуре клетки *Az. nigricans* представлены сла-

бо подвижными гомогенными крупными палочками, иногда с 1-2 сильно преломляющими свет зернышками. На 3-5 сутки преобладают овальные и продолговатые зернистые клетки размером 4,0-5,2 x 2,2-2,5 мк и более мелкие - 2,8-3,2 x 1,3-1,7 мк. Реже встречаются кокки величиной 2,0-2,9 мк в диаметре. Клетки в основном расположены в скоплениях (рис. 3). В дальнейшем размеры клеток уменьшаются, зернистость становится менее заметной, преобладающей формой становится кокковидная. Оформленные цисты появляются на 10-12 сутки. Через 1-1,5 месяцев инцистированные клетки, подобно цистам *Az. chroococcum* (рис. 2), принимают неправильную форму.

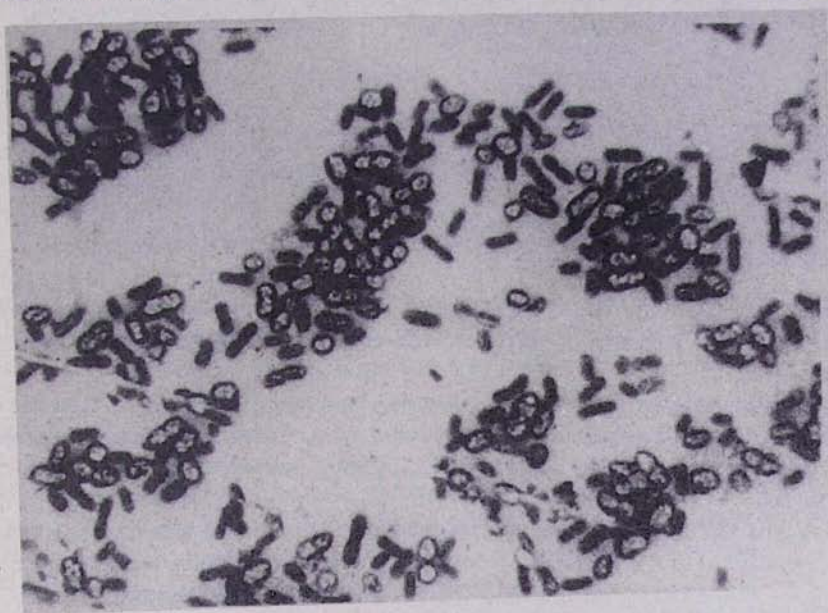


Рис. 3. *Az. nigricans*, шт. 133 (5-суточная культура). Гомогенные палочки, зернистые овальные, продолговатые и кокковидные клетки в скоплениях. Увеличение в 850 раз.

Штаммы *Az. nigricans* с сухими колониями сходны со слизистыми по форме клеток, их расположению в скоплениях и фазам развития. Только клетки этих культур, как и клетки *Az. chroococcum* с сухой поверхностью колоний, несколько мельче, оболочки тонко очерчены и зернистость нежнее (рис. 4). Рост культур по сравнению с *Az. chroococcum* менее интенсивный. Колонии гладкие или слегка бугристые; консистенция слизис-



Рис. 4. *Az. nigricans*, шт. 17 с (3-суточная культура). Клетки культур с сухой поверхностью колоний. Увеличение в 850 раз.

тая, в основном стекающая, иногда кашицеобразная, у колоний с сухой поверхностью — сухая, сыпучая. Пигмент хромопарный от коричнево-бурого до черного цвета, часто с фиолетовым оттенком.

Штаммы этого вида хорошо развиваются на сахарозе, глюкозе, слабо — на этиловом спирте, молочнокислом кальции, сусло-агаре, желатине; не растут на бензойнокислом натрии, МПА, МПБ, ломтиках картофеля, а некоторые штаммы — на манните. Молоко не пептонизируют, желатину не разжижают. Клетки изученных штаммов сильно полиморфные при культивировании на сусло-агаре и молоке. Фиксируют 9–13 мг азота на 1 г усвоенной сахарозы.

По характеру роста, а также по форме и расположению клеток в скоплениях, штаммы *Az. nigricans* близки к культурам IУ группы *Az. agilis* (Киракосян, Мелконян, 1964). Отмечаются также некоторые общие признаки со всеми группами *Az. agilis* — характер образования пигмента, рост на Эшби-желатине, отсутствие роста на бензойнокислом натрии (табл. 2).

Это указывает на родство названных двух видов, и по-видимому, культуры IUG группы являются связующим переходным звеном между этими систематическими категориями.

Некоторые исследователи ошибочно принимают *Az. nigricans* за разновидность *Az. chroococcum*. Наши повседневные наблюдения показали, что по морфологическим особенностям этот вид значительно отличается от *Az. chroococcum* — зернистость более ярко выражена, клетки в основном продолговатые и овальные, расположены в скоплениях и более склонны к деформации. Характер роста колоний на агаровых пластинках и косяках Эшби, проникновение пигмента в среду также отличают культуры *Az. nigricans* от *Az. chroococcum*. В молодой культуре (до образования пигмента) колонии *Az. nigricans* густо-белого цвета (молочные), компактные, нестекающие, одинаковой величины. Имеются отличия и в отношении к питательным средам. В противоположность *Az. chroococcum* штаммы *Az. nigricans* не растут на бензойнокислом натрии, МПА, МПБ; на этиловом спирте развиваются слабо.

Полученные результаты показали, что местные штаммы *Az. nigricans* по морфологическим особенностям и азотофиксирующей активности отличаются от культуры, описанной Красильниковым, поэтому отнесены к указанному виду как его разновидность и названы *Az. nigricans* v. *armeniacus*.

Выводы

1. Азотобактер широко распространен в бурых и каштановых почвах Армянской ССР, в сравнительно меньшем количестве встречаются в типичных черноземах, а в горно-лесных и горно-луговых обнаруживается редко.

2. Выявлена определенная закономерность распространения отдельных видов азотобактера в различных типах почв. *Az. chroococcum* больше распространен в бурых, сравнительно меньше в каштановых почвах и черноземах; *Az. nigricans* в больших количествах обнаруживается в каштановых почвах, значительно меньше в бурых и черноземах, в горно-лесных и горно-луговых отсутствует; *Az. agilis* и *Az. vitreus* выделялись только из бурых почв Арташатского района с высокостоящими грунтовыми водами.

3. На основании изучения выделенных культур азотобактера, относящихся к *Az. chroococcum*, *Az. beijerinckii*, *Az.*

agilis, Az. vitreus և Az. nigricans, описаны новые разновидности некоторых видов — Az. agilis v. armeniacus, Az. vitreus v. armeniacus և Az. nigricans v. armeniacus. Указанные разновидности отличаются от типичных культур соответствующих видов азотобактера некоторыми культуральными и морфо-физиологическими особенностями.

Ա. Վ. Կիրակոսյան, Ժ. Ս. Մելիքյան, Է. Ա. Հովսեփյան
Մ. Մ. Մկրտչյան

ԱՋՈՏԱԲԱԿՏԵՐԻ ՏԵՍԱԿԱՅԻՆ ԿԱԶՄԸ ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ՀՈՂԵՐՈՒՄ
ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Հայկական ՍՍՀ տարրեր հողակլիմայական գոտիներում ուսումնասիրվել է բացահայտվել է ազոտաբակտերի տարրեր տեսակների տարածվածության օրինաչափությունը:

Հիմնվելով այդ հողերից մեկուսացված Az. chroococcum, Az. beijerinckii, Az. nigricans, Az. agilis և Az. vitreus տեսակների մորֆո-ֆիզիոլոգիական առանձնահատկությունների վրա նրանք դասակարգվել են որպես առանձին տարատեսակներ, ինչպիսին են՝ Az. agilis v. armeniacus, Az. vitreus v. armeniacus և Az. nigricans v. armeniacus.

ЛИТЕРАТУРА

Вэтс Д. П., Дедекен М. 1966. В сб.: IX Международный микробиол. конгресс. М.

Виноградский С. Н. 1952. Микробиология почвы. Изд. АН СССР.

Киракосян А. В., Зубиетян П. А., Каримян Р. С. 1955. В сб.: Вопр. с.-х. и промышл. микробиол. Изд. АН Арм. ССР, в. П(УШ)

Киракосян А. В., Мелконян Ж. С. 1964. Известия АН Арм. ССР, биол. науки, 17, 4.

Киракосян А. В., Мелконян Ж. С., Карапетян М. М., Саркисян М. Б., Овсепян Э. А., Тапалцян С. Х. 1969. В сб.: Вопр. микробиол. Изд. АН Арм. ССР в. 4 (14).

Красильников Н. А. 1949. Определитель бактерий и актиномицетов. М.-Л.

Мелконян Ж. С. 1973. В сб.: Вопр. микробиол. (Биологическая фиксация атмосферного азота), в.6 (16). Изд. АН Арм. ССР.

Мелконян Ж. С. Киракосян А. В., Карапетян М. М. 1966. Биол. журнал Армении, 19, №6.

Паносян А. К. 1948. Микробиологическая характеристика солончаков Армянской ССР в связи с вопросами их освоения. Ереван, Изд. АН Арм. ССР.

Петросян А., Киракосян А., Мирзабекян Р., Меграбян А. 1936. Микробиология, 5,5.

Рубенчик Л. И. 1960. Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. Киев, Изд. АН УССР.

Церевитинов Ф. В. 1938. Химия плодов и овощей. Сельхозгиз. 19 .

Breed R. S., Murray E. G., Smith N. R. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th edition. Williams & Wilkins Co., Baltimore .

JENSEN H. L. 1954. Bacteriol. Revs., 18, N 4,

LOHNIS F., SMITH N. R. J. 1923. J. Agr. Resear., 23.