

2. Вартанян Н.С., Каравайко Г.И., Пивоварова Т.А. Микробиология, 59, 3, 411-417, 1990.
3. Вартанян Н.С., Пивоварова Т.А., Цаплина И.А., Пысенко А.М., Каравайко Г.И. Микробиология, 57, 2, 268-274, 1988.
4. Маркосян Г.Е. Биолог. журн. Армении, 25, 2, 26-29, 1972.
5. Маркосян Г.Е. Докл. АН СССР, 211, 5, 1205-1208, 1973.
6. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод М., 1970.
7. Валлэт J., Эвард D.K., Хушес M.H., Пуолс R.K. J. Inorg. Biochem., 43, 2-3, 484, 1991.
8. Espejo R.T., Escobar B., Jedlicki E., Uribe P., Ohlbaum R.B. Appl. Envir. Microbiol., 54, 7, 164-169, 1988.
9. Hutchins S.R., Brierley J.A., Brierley C.L. Mining Eng. USA, 40, 4, 249-254, 1988.

Поступила 11.X.1994

Биолог. журн. Армении, 1 (48), 1995

УДК 576. 851. 5

ОБ ЭКОЛОГИИ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ФОРМ БАЦИЛЛ В ОСНОВНЫХ ТИПАХ ПОЧВ АРМЕНИИ

А.А. ХАЧАТУРЯН, Н.Л. КАЗАНЧЯН, Н.С. ХАЧАТУРЯН, М.О. АДАМЯН, Л.А. ХАЧИКЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510 г. Абовян

Установлено, что факультативно термофильные и алкалофильные формы бацилл распространены в разной степени во всех основных типах почв Армении. Обязательные термофилы вида *Bacillus stearothermophilus* встречаются в черноземных, горно-каштановых, лугово-бурых орошаемых почвах и в мелиорированных солончаках. Обязательные алкалофильные штаммы бацилл - *B. alcalophilus* и *B. alcalophilus "subsp. halodurans"* обнаруживаются в каштановых, бурых и особенно в солончаковых почвах. Термо-ацидофильные штаммы выделяются из лесных почв и черноземов. Галофилы определяются в карбонатных черноземах, бурых и солончаковых почвах.

Հաստատված է, որ Հայաստանի բոլոր հիմնական հողատիպերում բացիլների ֆակտուալապես ջերմասեր և հիմնասեր ձևերը տարածված են տարբեր բանակուրքում: Օբլիգատ ջերմասեր *Bacillus stearothermophilus* տեսակի բացիլները հասնելու են սևահողերում, միխրացված աղուտ-ալկալի հողերում: Օբլիգատ հիմնասեր *B. alcalophilus* և *B. alcalophilus "subsp. halodurans"* տեսակների շտամները հայտնաբերվում են շագանակագույն, գորշ և, հատկապես, աղուտ-ալկալի հողերում:

Ջերմաբքիլասեր բացիլների շտամները մեկատեսցվում են անտառային և շագանակագույն հողերից:

Աղասեր բացիլները որոշվում են կարբոնատային սևահողերում, գորշ և աղուտ-ալկալի հողերում:

The distribution of various quantity of facultative thermophilic and alkalophilic forms of bacilli in all main types of soils of Armenia was revealed. The obligative thermophiles of species *Bacillus stearothermophilus* appeared in the chernozems, mountain-chesnut, meadow-brown irrigated and in meliorated salted soils. The obligative alkalophilic strains of bacilli *B. alcalophilus* and *B. alcalophilus "subsp. halodurans"* are found in chesnut, brown and especially in salted soils. The thermoeidophilic strains are distinguished in forest soils and chernozems. The halophiles are determined in carbonate chernozems, brown and salted soils.

Почвы - микрофлора, - бациллы - алкалофилы - термофилы - термо-
ацидофилы - галофилы.

Своеобразные особенности метаболизма экстремофильных микроорганизмов и способность противостоять экстремальным воздействиям могут быть использованы в производстве. Амилолитические, протеолитические и другие ценные ферменты этих микробов широко исследуются и находят свое применение в микробиологической промышленности [3, 4, 20]. Установлена приуроченность экстремофильных форм микроорганизмов к разнообразным естественным местам обитания с особыми условиями окружающей среды [1, 6, 7, 17].

Из специфических субстратов выделены и изучены штаммы бацилл, диагностированные как *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. macerans*, *B. laterosporus*, *B. brevis*, *B. sphaericus*, способные расти в диапазоне температур от 35° до 75°, и истинно термофильный вид *B. stearothermophilus* с температурным оптимумом роста 50-65° и максимумом 75° [1, 4, 7]. Среди бацилл обнаружено несколько организмов, устойчивых к щелочной и кислой средам с рН, приближающимся к 10 или к 3,5 - 4,0 [7, 14, 18]. Выделены и изучены штаммы *B. cereus* и *B. circulans*, устойчивые к щелочным условиям [4]. Из горячих и кислых горячих источников выделена гетеротрофная бактерия *B. acidocaldarius* с оптимумом рН среды роста от 2 до 6 и температурой от 45° до 75°. Выявлены штаммы *B. coagulans*, которые имеют оптимум рН среды роста от 3 до 4 и температурный оптимум 37-60° [14]. Известно, что бациллярные штаммы либо галотолерантны, то есть выдерживают присутствие высоких концентраций солей, либо умеренные галофилы, хорошо растущие в средах, содержащих 0,5 - 2,5 М хлористого натрия [1, 19].

В почвах Армении изучено лишь распространение алкалофилов и термофилов в солончаках [3, 6]. Между тем большое разнообразие эколого-географических условий Армении с ее выраженной вертикальной зональностью [5, 8] и значительная бациллярная заселенность разных почв [2, 9, 10] могут служить основой для экологических исследований в направлении изучения почв как мест обитания экстремофильных бацилл и источников выделения этих организмов.

Материал и методика. Выделение штаммов экстремофильных форм бацилл осуществляли методами накопительных культур и прямого высева разведения навески образца на питательные среды. Образцы почв брали с глубины 0-25 см. Условия культивирования и среды соответствовали требованиям выделяемой экстремофильной формы бацилл - для термофилов использовали пептон-крахмально-кукурузно-дрожжевую среду (рН 7,0-7,2), культивирование проводили при 56-60° в течение 24-48 ч. для алкалофилов использовали питательную среду Хорикоши [7] с рН среды 9-10,0 и с выращиванием при 30-37° в течение двух-пяти суток; для термо-ацидофилов применяли среду Брока [15] с инкубацией при 56-60° в течение 24-48ч. Мезофильные и термоустойчивые бациллы выделяли на мясо-пептонном агаре (МПА) и МПА с сусло (1:1). Монокультуры сохраняли на специфических для каждой формы питательных средах.

Тестирование признаков для диагностики культур осуществляли согласно методам [15] с корректировкой условий в зависимости от потребностей изучаемой экстремофильной формы бацилл. Штаммы идентифицировали до вида с помощью диагностических ключей определителя Берге [12] и с учетом характеристик этих бактерий в первоисточниках [7, 13, 14, 17].

Результаты и обсуждение. Поскольку в специальных работах детали о описаны все эколого-географические зоны и типы почв Армении [5, 7], считаем возможным непосредственно перейти к характеристике бациллярной микрофлоры изученных нами основных типов почв.

В результате проведенных работ из анализируемых почвенных образцов выделены экстремофильные формы аэробных спорообразующих бактерий, относящихся к термофилам (255 штаммов), термо-ацидофилам (25 штаммов), алкалофилам (235 штаммов) и галофилам (37 штаммов). Штаммы тестированы, идентифицированы до вида и включены в коллекцию культур микробов Института микробиологии НАН РА (ИНМИА). Кроме того, для сопоставления численности и видового состава во всех образцах определены также мезофильные бациллы.

В таблице обобщены средние показатели количества разных форм бацилл, изолированных из почвенных образцов.

Микрофлора горно-луговых и черноземовидных почв довольно скудная, отличается средней активностью [9]. Как видно из табл., мезофильные бациллы определяются в пределах до 12,8-14,7 млн/г почвы. На этом фоне термофильные и алкалофильные формы бацилл (факультативы) выделяются также в небольшом количестве: от 0,2 до 1,2 тыс/г почвы - термофилы и от 0,5 до 12,4 тыс/г почвы - алкалофилы. На жизнедеятельность микроорганизмов в этих почвах неблагоприятно влияют холодный климат, реакция среды почвы и солнечные лучи.

В видовом отношении в этих почвах вместе с мезофильными видами *B. pumilus* и *B. circulans* определяются штаммы видов *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. mycoides* и *B. circulans* со сравнительно более высокими температурными пределами роста (+30° - +60°-факультативы) и штаммы видов *B. megaterium* и *B. cereus* - с алкалофильными признаками (рН роста 9,0).

Таблица. Распространение экстремофильных форм бацилл в основных типах почв Армении.

Типы почв	Число образцов	рН	М-бациллы, млн/г почвы	Экстремофилы тыс/г почвы			
				Т*	АК	ГФ	Т-АЦ
Горно-луговые	15	5,5-5,5	12,8	0,2	5,0	0	0
Черноземовидные	7	6,5-7,0	14,7	1,2	12,4	0	0
Горно-лесные							
бурые	12	5,6	15,7	16,2	3,4	0	0
коричневые	20	6,6	22,0	20,3	23,5	0	0,4
Черноземы							
выщелоченные							
целина	7	5,3	34,4	11,2	22,0	0	0
пашни	8	5,8	31,2	11,8	26,0	0	0,2
Типичные							
целина	11	6,0	27,6	21,2	44,0	0	0
пашня	14	6,2	23,9	20,2	45,0	0,2	0
Карбонатные							
целина	10	6,9	24,5	12,5	54,0	4,0	0
пашни	18	8,0	23,6	13,3	60,0	10,0	0
Каштановые							
целина	10	7,5	15,0	16,0	10,0	0	0
пашни	20	7,5	18,4	20,0	24,5	0,4	0
Бурые, целина	6	7,2	2,8	12,0	20,3	2,0	0
пашня	6	7,5	4,7	14,0	33,0	4,4	0,2
Лугово-бурые							
орошаемые	10	8,2-9,0	15,8	14,0	30,0	37,0	0
Солонцы-солончаки							
целина	21	8,6-10,1	1,0	0,4	100	5,2	0
мелиорированные	25	7,8	6,4	0,8	100	10,0	0

*Условные обозначения: М-мезофилы, Т-термофилы, АК-алкалофилы, ГФ-галофилы, Т-АЦ-термо-ацидофилы.

Численность мезофильных бацилл в лесных бурых почвах горной лесной зоны Армении доходит до 15,7 млн/г почвы, количество термофилов и алкалофилов равно 16,2 и 3,4 тыс/г почвы соответственно.

Горные коричневые лесные почвы характеризуются гумусированностью в верхних горизонтах. Эти почвы обладают высокой биологической активностью [10, 11]. В них число аэробных

бацилл доходит до 22,0 млн/г почвы. Количество экстремофильных бацилл также сравнительно высоко: термофилов - 20, алкалофилов - 23,5 тыс/г почвы.

Выделенные из горно-лесных бурых и коричневых почв бациллы диагностированы как *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. circulans* и "*B. agglomeratus*". Факультативно термофильные формы из этих почв отнесены к *B. licheniformis* и *B. circulans*, а алкалофильные - к *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. megaterium* и *B. circulans*.

Черноземы Армении представлены выщелоченными, типичными и карбонатными подтипами. Исследования почвенных образцов черноземов для выявления экстремофильных форм бацилл показали, что на фоне высокого содержания мезофильных бацилл, что объясняется большим количеством органических веществ, эти почвы населены также термофильными и алкалофильными штаммами. При этом последних значительно больше в карбонатных черноземах. Аналогичная картина наблюдается в горно-каштановых и бурых (особенно орошаемых) почвах.

В черноземных почвах наряду с мезофильными видами *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. polymyxa* встречаются и алкалофильные формы этих же бацилл. Там же обнаруживается наличие штаммов облигатно-термофильного вида *B. stearothermophilus* и вида *B. circulans* с высокими температурными пределами роста (37-65°).

Горно-каштановые почвы, содержащие довольно большое количество органического вещества (до 15-18% гумуса), являются источником получения разных форм экстремофильных бацилл. Из образцов этого типа почв выделяются штаммы термофильного вида *B. stearothermophilus* и алкалофила - *B. alcalophilus* "*subsp. halodurans*".

В бурых и лугово-бурых орошаемых почвах наравне с мезофильными *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, "*B. idosus*" и *Bacillus sp.* ("*mesentericus*") определяются факультативные термофилы: вида *B. licheniformis* и алкалофилы видов *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, а также облигатный алкалофил вида *B. alcalophilus*.

Солончаковые почвы Армении отличаются очень низкой биологической активностью, что обусловлено высоким содержанием солей и щелочной реакцией среды. В этих условиях среди мезофилов преобладают термостабильные, преимущественно черных и бурых цветов бациллярные формы ("*B. mesentericus*"). Их численность в

мелиорированных солончаках равна 6,4 млн/г почвы. Число алкалофильных бактерий как в содовых, так и в мелиорированных солончаках достигает 100,0 тыс/г почвы. Число термофилов в этих почвах невелико (0,4-0,8 тыс/г почвы).

Солончаковые почвы богаты облигатными алкалофильными формами бактерий видов *B. alkalophilus* и *B. alkalophilus "subsp. halodurans"*. А мелиорированные почвы, обогащенные органическими веществами и расположенные в Араратской равнине с жарким климатом, являются источником специфического облигатно термофильного вида *B. stearothermophilus*, там же нередко обнаруживаются облигатно термофильные штаммы вида *B. circulans*.

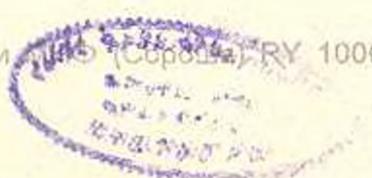
Галофильные штаммы бактерий, требующие для своего роста до 15-17 % NaCl в среде, также выявляются в солончаковых, бурых и каштановых почвах. По своим свойствам они приближаются к видам *B. sphaericus* и *B. fastidiosus*, однако для уточнения диагноза нуждаются в дальнейшем исследовании.

Термо-ацидофильные бактерии встречаются, но в небольшом количестве в лесных коричневых, выщелоченных черноземах и бурых почвах в условиях кислых или нейтральных pH почв. Изолируемые из этих почв термо-ацидофильные штаммы сходны по своим свойствам с видом *B. acidocaldarius*.

Таким образом, результаты исследований позволяют заключить, что факультативные термофильные и алкалофильные штаммы бактерий распространены в разной степени во всех изученных типах почв Армении. Облигатные термофилы определяются в черноземах, горно-каштановых лугово-бурых оршаемых и мелиорированных солончаках. Наиболее богатым источником алкалофильных и галофильных штаммов бактерий могут служить солончаковые почвы, как целинные, так и мелиорированные. В количественном отношении термофилов выделяется меньше, чем алкалофилов, что, вероятно, можно объяснить резко континентальным климатом Армении.

Одни и те же таксономические единицы могут проявлять различное отношение к температурам роста и pH среды.

Работа финансировалась грантами ЮНЕСКО (Сороса) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.



Авторы выражают искреннюю благодарность К.В. Читчан за активное участие в выделении штаммов из почвенных образцов и их тестировании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Археобактерии. Сборник научных трудов. Пушино, 163, 1968
2. Африкян Э.К. Тр. Сектора микробиол. АН Арм. ССР, 21-35, 1953
3. Биология термофильных микроорганизмов, 271, М., 1986
4. Квиннер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях, 520, М., 1981
5. Клопотовский Б.А. Изв. АН Арм. ССР, 7, 3-28, 1947
6. Кузнецова Е.И., Аколян Л.О., Африкян Э.Г. Биолог. журн. Армении, 29, 7, 89-90, 1976.
7. Логинова Л.Г., Головачева Р.С., Егорова Л.А. Жизнь микроорганизмов при высоких температурах, 285, М., 1966
8. Почвы Армянской ССР (Краткая характеристика) Ереван, 383, 1975
9. Хачикян Л.А., Авунджян Э.С., Галстян А.Ш., Оганесян Н.А. Тр. НИИ почвоведения и агрохимии МСХ Арм. ССР, 143-150, 1974
10. Хачикян Л.А. Изв. с-х наук МСХ Арм. ССР, 4, 65-88, 1984
11. Хачикян Л.А., Саркисян Р.В. Тр. НИИ почвоведения и агрохимии, 21, 137-142, 1986
12. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2 Eds. Sneath P. H. A. Mau N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1104-1139, 1986
13. Boyer E. W., Ingle M. B., Mercer G. D. Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 3, 238-242, 1973
14. Darkland G., Brock T. D. J. Gen. Microbiol., 67, 9-15, 1971
15. Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C. H. W. The Genus Bacillus. Agricult. Handbook 1427, Washington D. C., 283, 1973
16. Gould G. W., Carry J. E. L. Microbial growth and survival in extremes of environment. AP, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 265, 1980
17. Horikoshi K., Akiba T. Alkalophilic microorganisms - a new microbial world. Tokyo, Berlin, Heilderberg, New York, Springer Verlag, 213, 1982
18. Rogers H. J., McConnel M., Burdett I. D. J. Gen. Microbiol., 61, 155-171, 1970
19. Torsvic T., Dundas J. In: Methods in Enzymology. NY-L. AP, 88, 380-389, 1982
20. Zeikus J. G. Enzyme Microb. Technol., 1, 10, 243-252, 1979

Поступила 20.XI 1994