

МИКРОБИОЛОГИЯ

А. ИМШЕНЕЦКИЙ

К СИСТЕМАТИКЕ НИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

(Представлено академиком В. Л. Комаровым 3 II 1945)

В 1933 г. я изучал целлюлозные бактерии, выделенные из почв За-волжья, и нашел среди них типичные миксобактерии, хорошо разла-гавшие целлюлозу. Этот факт привлек мое внимание к *Muxobacteria-les*, и дальнейшее изучение биологии этих организмов выяснило, что среди миксобактерий встречаются виды, весьма различные по своей физиологии. Можно было предполагать, что благодаря дивергенции в от-ряде *Muxobacteriales* возникли формы, участвующие в различных пре-вращениях углерода и азота.

Морфология и систематика миксобактерий мало известна широким кругам микробиологов, и поэтому я обратился к уже существующим опи-саниям микробов, стремясь найти среди них виды, принадлежащие к миксобактериям и ошибочно отнесенные к другим систематическим группам. В этом отношении особенный интерес представляли бактерии, описанные как новые возбудители процесса нитрификации.

Как известно, вопрос о биологическом окислении аммиака был бле-стяще решен в 1890 г. нашим соотечественником Виноградским (1). Он изолировал чистую культуру бактерии, окисляющую аммиак в азоти-стую кислоту, и назвал ее *Nitrosomonas*.

На протяжении сорока лет *Nitrosomonas* был единственным хемо-трофным организмом, способность которого к нитрификации считалась общепризнанной. Попытки доказать, что наряду с ним существуют гетеротрофные или миксотрофные нитрифицирующие бактерии, не вы-держали экспериментальной проверки и теперь имеют только истори-ческий интерес.

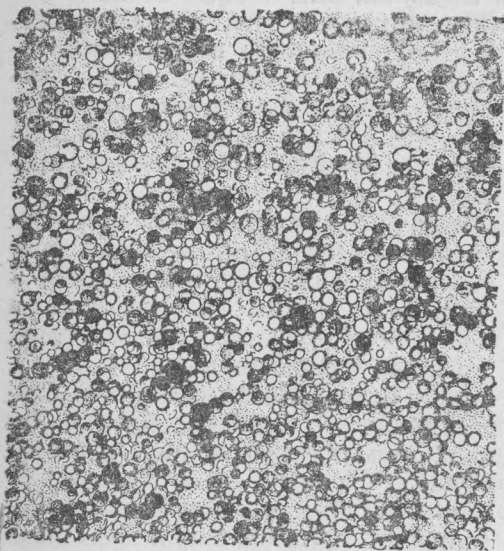
Так обстояло дело до 1928 г., когда шведский исследователь Romell (2), работая в лаборатории Виноградского, обнаружил в лесных почвах особые нитрифицирующие бактерии, дающие зооглейный рост и крупные шаровидные образования (цисты). Затем аналогичные мик-роорганизмы были изолированы из почвы Виноградским, который, желая подчеркнуть способность бактерий давать цисты, назвал их *Nitrosocystis*. Исследуя образец почвы, взятый проф. Б. Л. Исаченко на Новой Земле, Виноградский обнаружил также нитрозобактерий, на-поминающих по своей форме спирохет. Он выделил их в отдельный род *Nitrosospira*. В дальнейшем, изучая нитрификаторов, содержащихся в активных илах, Е. Виноградская обнаружила ряд новых нитрифика-торов. Некоторые из них она отнесла к *Nitrosocystis*, тогда как другие виды, также растущие в виде слизистых зооглей, были объединены ею в новый род *Nitrosogloea*.

Таким образом, в этих исследованиях сообщается о существовании довольно большого числа новых нитрификаторов, резко отличающихся по своей биологии от давно известного *Nitrosomonas*.

Описане морфологии новых нитрифицирующих бактерий, приведенное в работах, а также приложенные фотографии убедили меня в том, что эти авторы имели культуры миксобактерий. Это побудило меня выделить такие же микроорганизмы и окончательно установить их систематическое положение.

Исследования были проведены с помощью методики, применявшейся Виноградским. На поверхность кремнекислого геля, застывшего в чашках Петри, наливалось 2 см³ среды следующего состава: K₂HPO₄ 0,5 г; MgSO₄ 0,3 г; NaCl 0,3 г; FeSO₄ 0,02 г; MnSO₄ 0,02 г; водопроводной воды 200,0 г. Чашки подсушивались и на гель наливался 1 см³ 5% раствора (NH₄)₂SO₄, и чашки снова сушились. Затем на гель наносилась болтушка из мела. После подсушивания чашек на белую поверхность гелевой пластинки раскладывались комочки почвы, и чашки помещались в термостат при 25°C.

В одном из опытов через три недели вокруг комочков почвы появились зоны растворения мела. Это были посевы почвы, привезенной из Киргизии и взятой там в карагачевой роще (г. Фрунзе). Зоны достигали 0,5—1 см в диаметре и имели резко очерченные края. Поверхность обнаженного геля была покрыта слегка слизистым скудным налетом желтовато-коричневого цвета. При небольшом увеличении в зонах растворения мела были отчетливо видны бледножелтые плодовые тела округлой формы, как это изображено на рисунке.



Плодовые тела миксобактерии *Sorangium symbioticum* в зонах нитрификации, $\times 95$

Обычно шаровидные образования вблизи комочков почвы имеют более крупные размеры, тогда как ближе в краю зоны они мельче. Величина плодовых тел колеблется от 18 до 40 μ . Тела состоят из цист округлой или полигональной формы, которые тесно прилегают друг к другу, и поэтому плодовое тело имеет форму тутовой ягоды. Цисты,

в свою очередь, состоят из более мелких цист величиною 3—4 μ , имеющих многоугольную, овальную или шаровидную форму. Плодовые тела не имеют плотной оболочки, легко раздавливаются покровным стеклом, и тогда выясняется, что мелкие цисты состоят из скоплений коротких бактериальных клеток палочковидной формы.

Кусочки геля, взятые из зон растворения мела, давали резко положительную реакцию на нитриты (реактив Тромсдорфа). Образование нитритов и исчезновение аммиака, наблюдавшееся при длительном культивировании описываемого микроорганизма, — все это говорило об идущей нитрификации.

Морфология плодовых тел и строение самих цист не оставляли никаких сомнений в том, что организмы, развивающиеся на геле, относятся к миксобактериям и именно к роду *Sorangium*. По своему внешнему виду этот вид был весьма близок к нитрифицирующим бактериям, описанным Romell и Виноградским.

Растворение мела на гелевых пластинках, пропитанных солями, т. е. на среде, лишенной органических веществ, было веским доводом в поль-

зу того, чтобы считать миксобактерию нитрификатором. Но один этот факт не мог решить вопроса, и поэтому я приступил к посевам, которые должны были привести к выделению чистой культуры *Sorangium*, либо доказать, что этот вид — хемотроф и не растет на обычных средах. Для этого налет, взятый из зон растворения мела, был посеян на серию чашек со средой, обычно применяемой для культивирования миксобактерий. Ее состав следующий: 20% картофельного отвара 100 см³, пептона 0,5 г, агар-агара 2,0 г.

Посевы на эту среду выяснили, что *Sorangium* образует на ней круглые блестящие желтые колонии. Они слегка слизистые, выпуклые, гладкие и имеют ровные края. Уже через 5—6 дней после посева в колониях обнаруживается группировка клеток и начинается образование цист, которые затем, соединяясь, дают шаровидные плодовые тела. Особенно много плодовых тел и цист в старых гигантских колониях *Sorangium*, возраст которых достигает 45—50 дней.

Окраска, размеры и структура плодовых тел, а также обильный рост этого вида, наблюдающийся при посевах из зон нитрификации, не оставляет сомнений в том, что *Sorangium*, развивающийся на геле и вырастающий на чашках с картофельным агаром, один и тот же вид.

Таким образом возможность существования хемотрофной миксобактерии отпала. Осталось предположение, что вырастающий на геле *Sorangium* представляет собой миксотрофный организм.

Чистая культура *Sorangium* была выделена из одной клетки и затем изучена. Оказалось, что в 24—48-часовых культурах на плотных средах вегетативные клетки *Sorangium* имеют форму палочки величиной 0,5 × 2,5 μ, иногда слегка дугообразно изогнутой. Клетки обильно подвижны, но жгутики не могли быть обнаружены ни с помощью электронной микроскопии, ни путем окраски по Лефлеру. Подвижность при отсутствии жгутиков — характерная особенность миксобактерий и она носит, повидимому, реактивный характер. Вегетативные клетки *Sorangium* с возрастом культуры постепенно сжимаются и укорачиваются, одновременно несколько утолщаясь. В 5—6-дневных культурах их величина 1,0 × 1,2 μ. Сократившиеся палочки, группируясь, образуют цисты, которые в свою очередь составляют плодовые тела, о которых говорилось выше.

Изолированный *Sorangium* хорошо растет на обычных питательных средах: мясопептонном бульоне, мясопептонном агаре, сусло-агаре, сусле и картофеле. Развиваясь на мясопептонной и картофельной желатине он не разжижает желатины. При посеве на минеральную среду с глюкозой и различными источниками азота он дал рост только на среде с пептоном. На средах с альбумином (NH₄)₂SO₄, KNO₃ или NaNO₂ развития не было. Таким образом, по своим физиологическим признакам выделенный *Sorangium* мало отличается от ряда других миксобактерий.

Выяснение способности *Sorangium* нитрифицировать имело принципиальное значение. Поэтому эта способность устанавливалась различными методами. В одной серии опытов культура *Sorangium* с картофельного агара была перенесена на поверхность гелевой пластинки, пропитанной средой для нитрификаторов, и посевы выдерживались в течение двух месяцев при 25°. В другой серии посевы миксобактерий были произведены в ряд колб, содержащих жидкую среду для нитрификаторов. Наконец, в третьей серии были проведены «острые» опыты по нитрификации. Для этого густая взвесь клеток *Sorangium*, смытая с поверхности плотной среды, вносилась в жидкую среду для нитрифицирующих бактерий.

Все эти опыты дали отрицательный результат. Клетки не размножались, зон растворения мела на пластинках геля не появлялось, аммиак не окислялся и нитриты нигде не были обнаружены. Следова-

тельно, изолированная миксобактерия не обладает способностью к нитрификации и относится к типичным гетеротрофам.

Естественно возникал вопрос: чем объяснить, что *Sorangium* развивается на кремнекислом геле и обнаруживается в зонах растворения мела. Ответ на этот вопрос дает микроскопия участков мела, окружающих зоны нитрификации. В препаратах, приготовленных из этих участков гелевой пластинки, постоянно обнаруживаются клетки классического возбудителя нитрификации — *Nitrosomonas*. Это круглые, преломляющие свет кокки, лежащие совершенно изолированно и интенсивно окрашивающиеся основными красками. У самого края зоны нитрификации уже встречаются бледно окрашенные скопления клеток миксобактерий, в которые как бы вкраплены клетки нитрификатора. Таким образом *Nitrosomonas*, как хемотроф, начинает первый развиваться на пластинках геля и все время продвигается вперед, оставляя позади бактериальную массу, т. е. готовое органическое вещество. За хемотрофом начинает развиваться миксобактерия *Sorangium*, использующая клетки *Nitrosomonas* в качестве источника питания. Возможно, что автолиз клеток нитрификаторов способствует развитию миксобактерий. Пространственные взаимоотношения между двумя организмами таковы, что *Nitrosomonas* можно назвать «авангардным» организмом, тогда как *Sorangium* следует за ним.

В обогащенных культурах нитрифицирующих бактерий постоянно присутствуют посторонние виды, но это все случайные спутники. В противоположность этому между хемотрофным *Nitrosomonas* и гетеротрофным *Sorangium* установились стойкие симбиотические взаимоотношения, которые сохраняются в многочисленных посевах. Нитрификаторы дают органическое вещество, необходимое для роста миксобактерий, но вполне вероятно, что в свою очередь слизистые скопления миксобактерий предохраняют клетки *Nitrosomonas* от высушивания и действия внешних факторов. В связи с этим я присваиваю изолированному виду миксобактерии название *Sorangium symbioticum*.

Результаты моих исследований могут быть резюмированы следующим образом.

При посеве комочков почвы на пластинки кремнекислого геля, пропитанного средой для нитрифицирующих бактерий, были получены зоны растворения мела и констатировано накопление нитритов. В этих зонах обнаружены шаровидные образования (цисты), характерные для новых видов нитрифицирующих бактерий, описанных Romell, Виноградским и Е. Виноградской под именем *Nitrosocystis*, но не выделенных ими в чистой культуре. Морфологический анализ выяснил, что шаровидные образования представляют собой плодовые тела миксобактерий из рода *Sorangium*. Чистая культура *Sorangium* оказалась гетеротрофной и не обладала способностью нитрифицировать. Развитие миксобактерий на средах для нитрификаторов объясняется их симбиозом с настоящим нитрификатором — *Nitrosomonas*, который постоянно может быть обнаружен в такой культуре. Нитрифицирующие бактерии синтезируют органическое вещество — миксобактерии его используют.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР

Поступило
23 XII 1944

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Winogradsky, Ann. Inst. Past., 4, 213 (1890). ² L. Romell, Svensk. Bot. Tidskr., 26, 303 (1932). ³ S. Winogradsky, Helène Winogradsky, Ann. Inst. Past., 53, 350 (1933). ⁴ H. Winogradsky, Ann. Inst. Past., 53, 326 (1937).