

Член-корреспондент АН СССР А. ИМШЕНЕЦКИЙ и Е. РУБАН

О ВЫДЕЛЕНИИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР НИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Открытие хемосинтеза С. Н. Виноградским — одна из наиболее блестящих страниц в истории отечественной микробиологии. На протяжении 60 лет многие иностранные ученые пытались разрушить стройное здание хемосинтеза и доказать гетеротрофность бактерий, получающих энергию путем окисления неорганических веществ, но обычно их исследования были основаны на изучении нечистых культур нитрификаторов. Теория хемосинтеза выдержала испытание временем и попрежнему привлекает внимание физиологов. В последние годы в связи с усилением экологического направления в микробиологии иногда недооценивают тот факт, что убедительные данные о физиологии и истории развития микроба могут быть получены только при изучении чистых культур. Развитие экологии микроорганизмов не исключает исследований с чистыми культурами — последние входят в качестве необходимого раздела в экологические работы.

Большинство видов микробов сравнительно легко выделить в чистой культуре, но существует несколько физиологических групп микробов, получение чистых культур которых довольно сложно. Это касается бактерий, сбраживающих целлюлозу, десульфуризирующих и особенно нитрифицирующих бактерий. За 60 лет, прошедших после открытия нитрификаторов, были опубликованы лишь единичные работы, проведенные с их чистыми культурами. Метода, который позволил бы систематически с гарантией выделить такие культуры, не существует. Между тем, дальнейшие исследования в области хемосинтеза невозможны с обогащенными грязными культурами. Данное исследование было предпринято с целью дать сравнительную оценку способов получения чистых культур нитрифицирующих бактерий, т. е. *Nitrosomonas*.

Исходным материалом для получения накопительных культур были оранжерейная почва и почва из-под ольхового леса. Для получения накопительных культур 1 г почвы вносился в 50 мл среды Виноградского, налитой в конические колбы и имеющей следующий состав (в г): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0; K_2HPO_4 1,0; MgSO_4 0,5; NaCl 2,0; FeSO_4 0,4; $(\text{MgCO}_3$ по 0,5 г на колбу), дистиллированной воды 1000,0 мл. Колбы с посевами помещались в термостат при 28° . Процесс нитрификации начинался на 4—5-е сутки и протекал очень интенсивно. После 4—5 пассажей на этой же среде производилось выделение чистых культур нитрификаторов. Для краткости мы не будем останавливаться на описании всех проверявшихся методов выделения, а остановимся только на двух, давших положительные результаты. Первый из них основан на пространственной изоляции в плотном субстрате, т. е. на получении отдельных колоний *Nitrosomonas*.

В этом случае 1 мл накопительной культуры *Nitrosomonas* вносился

в 10 мл 0,75% стерильного раствора NaCl, и через жидкость в течение 20 мин. пропускаться ток углекислоты, промытой дистиллированной водой, чем достигалось растворение мела, благодаря его переходу в бикарбонат кальция и освобождение приставших к нему клеток *Nitrosomonas*.

После осветления 1 мл взвеси микроорганизмов в 0,75% NaCl вносился в стерильную чашку Петри, содержащую 1 мл стерильной среды следующего состава (в %): NaCl 2; MgSO₄ 0,5; Na₂HPO₄ 12; KH₂PO₄ 4; FeSO₄ 0,01; MnSO₄ 0,01; NaHCO₃ 1 и 1 мл 5% раствора (NH₄)₂SO₄, и все это смешивалось с 10 мл стерильного геля. Гель приготавливался путем смешения равных объемов раствора кремнекислого натрия уд. веса 1,10 и соляной кислоты уд. веса 1,09. Смесь наливалась в коллодиевые мешки и диализировалась проточной водой в течение 2 суток или сменой дистиллированной воды 6—7 раз в сутки, в течение 2 суток. Диализированный гель стерилизовался текучим паром 60 мин.

В чашках с прозрачной плотной средой уже на 6-й день можно было видеть глубинные микроколонии нитрозных бактерий, плотные, круглые, желтоватого цвета с резкими контурами; позднее они становились менее плотными, увеличивались в размерах и слабо преломляли свет. Микроскопия материала, взятого из колонии, позволила обнаружить однородные типичные клетки *Nitrosomonas*. Из колоний под контролем микроскопа тонкой иглой или волосным капилляром производились пересевы в жидкую среду следующего состава (в г): NaCl 0,3; MgSO₄ 0,14; FeSO₄ 0,03; (NH₄)₂SO₄ 0,66; KH₂PO₄ 0,1 и 1 мл смеси следов микроэлементов (LiSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, H₃PO₄, Al₂(SO₄)₃, SnCl, MnCl₂, NiCl₂, CoSO₄, TiCl₄, KJ, KBr) на 1 л дистиллированной воды. На этой среде развитие наступало в накопительных культурах на 2—3-й день и в чистых культурах на 5—6-й день, но при этом нужно было по мере развития микроорганизмов добавлять (NH₄)₂SO₄. Пользуясь этим методом, мы выделили 2 чистых культуры из оранжерейной земли (64 и 198).

В качестве второго метода был применен метод, предложенный для получения чистых культур бактерий⁽³⁾. 1 мл жидкой накопительной культуры *Nitrosomonas* осветлялся вышеуказанным способом, а затем из пробирки специальной микропипеткой с капиллярным просветом и отшлифованным концом на стерильное предметное стекло наносились мелкие капли диаметром 0,2—0,3 мм. Капли как можно быстрее снимались со стекла небольшими стерильными кусочками фильтровальной бумаги и тотчас же вносились в колбочку с 5 мл жидкой среды для нитрификаторов, состав которой был указан выше.

Выделение с помощью микропипетки, несмотря на свою кажущуюся громоздкость, осуществляется скорее, чем получение чистых культур из микроколоний, так как здесь исключается стадия работы с кремнекислым гелем, приготовление которого, а также последующий рост на нем нитрификаторов требуют много времени. Этим методом также было выделено 2 культуры.

Таким образом, нами с помощью двух методов были получены 4 культуры *Nitrosomonas*. Далее следовало доказать чистоту культур. Проверка культур во всех случаях производилась не только путем микроскопии жидких культур, но и микроскопическим анализом материала, полученного из всего объема культуры, выросшей в колбе. Для этого магnezия в культуральной жидкости растворялась слабой соляной или уксусной кислотой, затем жидкость центрифугировалась при 10 000 об/мин. Большая часть жидкости декантировалась, осадок тщательно размешивался, выливался на предметное стекло, высушивался, фиксировался и окрашивался, как обычно. Во всех случаях была характерная для чистой культуры *Nitrosomonas* картина. Посторонних бактерий не было совершенно.

Кроме того, чистота культур проверялась посевами на различные питательные среды: МПА, МПЖ, МПБ + 1% глюкозы, МПБ + 1%

дрожжевого автолизата, картофельный агар, картофельную крошку, среду Эшби для азотобактера, почвенный агар с 1% глюкозы. Для обнаружения анаэробов посев производился в МПА и в картофельный агар в трубках Виньяля. Отсутствие роста на этих средах в течение 10 суток при температуре от 30 до 37° считалось достаточным для установления чистоты культуры.

При выделении чистых культур обращал на себя внимание следующий факт. Исключительно активные обогащенные культуры после выделения их в чистой культуре становились гораздо менее активными. Следовательно, в условиях симбиоза нитрификаторы имеют возможность окислять аммиак интенсивнее. Это лишний раз указывает на недостаточную изученность физиологии нитрификаторов, так как сущность благоприятного влияния бактерий симбионтов остается неясной.

Резюмируем результаты исследований.

1. Проведена сравнительная оценка различных методов получения чистых культур.

2. Хорошие результаты дал метод выращивания изолированных глубинных колоний в толще кремнекислого геля, находящегося в чашке Петри, и выделение капельным методом с помощью микропипетки.

3. Получены чистые культуры *Nitrosomonas* и доказана их чистота.

4. Обнаружено, что процесс нитрификации в чистых культурах даже на среде с микроэлементами протекает менее интенсивно, чем в смешанных обогащенных культурах.

Институт микробиологии
Академии наук СССР

Поступило
8 VII 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Н. Виноградский, *Арх. Биол. наук*, **1**, в. 1 (1892). ² J. Meikljohn, *J. of. Gen. Microbiol.*, **4**, No. 2 (1950). ³ Л. И. Комарова, *Микробиология*, **18**, в. 4 (1949).