

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

О ХИМИЗМЕ НИТРИФИКАЦИИ

Более шестидесяти лет отделяет нас от выдающегося открытия, сделанного С. Н. Виноградским. В 1890 г. появилось его первое сообщение (1) о бактериях, вызывающих процесс нитрификации, и в последующие годы было опубликовано большое число работ, посвященных методам выделения культур, распространению, физиологии и экологии нитрифицирующих бактерий. Эти исследования обогатили наши представления о биологии бактерий, но химизм самого процесса нитрификации оставался совершенно неясным. Как происходит окисление аммиака в нитриты? Существуют ли ферментные системы, осуществляющие это окисление? Возможна ли бесклеточная нитрификация? На эти вопросы мы ответить не можем. В противоположность этому, химизм ряда других биохимических процессов, в частности некоторые брожения, изучен в достаточной мере детально.

В исследованиях, результаты которых приведены в данной статье, была сделана попытка осуществить нитрификацию при помощи фильтратов культуры *Nitrosomonas*, полностью освобожденных от клеток. Работа в этом направлении облегчалась тем, что нами были найдены методы получения чистых культур нитрифицирующих бактерий (2), а также способы их выращивания в больших объемах жидкости. Последнее обстоятельство давало возможность получать необходимое количество клеток *Nitrosomonas*.

Методика

Выращивание *Nitrosomonas* производилось в больших стеклянных бутылках емкостью в 15 л. В бутылки наливалась питательная среда в количестве 3 л. Состав среды был следующий: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 г, K_2HPO_4 1,0 г, MgSO_4 0,5 г, NaCl 2,0 г, FeSO_4 0,4 г, CaCO_3 0,33 г, вода дистиллированная 1000,0 мл.

Через каучуковую пробку, которой закрывались бутылки, была пропущена стеклянная трубка, нижний конец которой на 3—4 мм не достигал дна бутылки. Через трубку нагнетался воздух, который аэрировал все время культуру нитрифицирующих бактерий. Культивирование бактерий производилось при 20—24° в течение 8—10 дней. В качестве посевного материала служили культуры *Nitrosomonas*, выросшие на среде вышеуказанного состава, налитой тонким слоем в плоскодонные конические колбы. Во время культивирования бактерий в бутылки периодически добавлялся 0,1% раствор сернокислого аммония. После окончания выращивания содержимое бутылки фильтровалось через большую воронку Зейтца с мембранным фильтром. Осадок многократно промывался стерильной дистиллированной водой до исчезновения качественных реакций на аммиак и нитриты. Далее осадок снимался с фильтра, переносился в агатовую ступку и тщательно, в течение 30 мин., растирался с измельченным стеклом. Затем растертые клетки переносились из ступки в колбу, содержащую 10 мл стерильной водопроводной воды.

С целью получить автолиз клеток колбы выдерживались в течение 24 час. при 40°. По истечении этого срока автолизат фильтровался через воронку Зейтца с асбестовым фильтром СФ и затем в фильтрате определялись аммиак и нитриты. Определение аммиака производилось отгонкой при 30° в условиях вакуума (20 мм), создаваемого водоструйным насосом. Количество нитритов в автолизате устанавливалось колориметрически после добавления реактива Грисса. В одной серии опытов фильтрат автолизата помещался в колбы, последние выдерживались в течение 5 дней при 30°, а затем в фильтрате автолизата снова производилось количественное определение аммиака и нитритов. В другой серии опытов к фильтрату добавлялся 0,1% раствор сернокислого аммония с таким расчетом, чтобы в фильтрат дополнительно было добавлено 10 или 20 мг NH₃ на литр. В этой серии опытов количество аммиака и нитритов в автолизате определялось непосредственно после добавления сернокислого аммония и после 5-дневной выдержки фильтрата автолизата в термостате. Отсутствие нитрифицирующих и гетеротрофных бактерий в фильтрате доказывалось путем посевов фильтратов автолизата в минеральную среду для нитрифицирующих бактерий, а также на мясопептонный бульон. Химическим анализам подвергались только стерильные фильтраты.

С целью доказать, что аммиак в условиях опыта не улетучивается, производилась отгонка аммиака из контрольной колбы, содержавшей воду и то же количество раствора сернокислого аммония, что и в опыте. Эти определения доказали, что количество аммиака в этих условиях в течение 5 дней не изменяется. В фильтрате автолизата как непосредственно после фильтрации, так и через 5 дней производилось определение общего количества азота по Кьельдалю.

Экспериментальные данные

Определение аммиака в фильтратах автолизата, полученного из клеток *Nitrosomonas*, показало, что непосредственно после фильтрации автолизат содержит аммиак и нитриты. В табл. 1 приведены цифры, полученные в 15 опытах. Мы видим, что в среднем после фильтрации в автолизате содержится 26,39 мг N₂ аммиака в 1 л. Через 5 дней количество

Таблица 1

Опыты с фильтратами автолизатов клеток *Nitrosomonas* без прибавления (NH₄)₂SO₄ (продолжительность опыта 5 суток)

№№ опытов	Начальн. кол-во в мг N ₂ /л		Конечн. кол-во в мг N ₂ /л		Уменьшилось NH ₃ в мг N ₂ /л	Образовалось NO ₂ в мг N ₂ /л
	NH ₃	NO ₂	NH ₃	NO ₂		
1	31,3	1,2	28,8	2,7	2,5	1,5
2	20,6	0,06	12,1	0,1	8,5	0,0
3	2,5	0,23	0,1	0,8	2,4	0,6
4	13,3	0,3	8,0	0,6	5,3	0,3
5	14,5	0,3	8,0	0,7	6,5	0,03
6	23,0	0,23	0,1	0,26	22,9	0,06
7	23,0	0,3	0,1	0,3	22,9	0,1
8	3,0	2,5	1,5	3,8	1,5	1,3
9	37,2	0,2	21,9	0,3	6,3	0,1
10	0,7	1,3	0,1	1,8	0,6	0,5
11	45,2	0,7	26,6	1,1	18,6	0,4
12	42,7	0,2	0,1	1,5	50,9	1,3
13	0,9	0,6	0,8	1,6	0,1	1,0
14	89,6	3,0	3,3	3,3	86,3	0,3
15	48,4	3,0	0,03	3,3	48,37	0,3
Средн.	26,39	0,94	7,43	1,4	18,49	0,54

аммиака в фильтратах закономерно уменьшается в среднем до 7,43 мг N₂. Абсолютные количества аммиака в различных опытах варьируют, но всюду наблюдается одна и та же общая закономерность — содержание NH₃ в фильтрате падает. Количество нитритов после 5-дневной выдержки автолизата в термостате, наоборот, возрастает с 0,9 до 1,48 (в миллиграммах N₂ в 1 л).

Таблица 2

Опыты с фильтратами автолизатов клеток *Nitrosomonas* с добавлением (NH₄)₂SO₄ (продолжительность опыта 5 суток)

№№ опытов	Добавлено NH ₃ в мг	Начальн. кол-во в мг N ₂ /л		Конечн. кол-во в мг N ₂ /л		Уменьшилось NH ₃ в мг N ₂	Увеличилось NO ₂ в мг N ₂
		NH ₃	NO ₂	NH ₃	NO ₂		
1	16,0	47,7	0,33	46,2	0,8	1,50	0,47
2	16,0	29,8	0,33	13,2	0,78	1,66	0,45
3	16,0	49,3	0,21	28,0	0,64	11,3	0,43
4	18,0	36,9	0,30	28,8	0,37	1,9	0,07
5	18,0	25,5	0,40	14,0	1,30	11,5	0,90
Средн.		37,8	0,31	26,04	0,77	5,57	0,46

Во второй серии опытов к фильтрату автолизата добавлялся сернокислый аммоний. Результаты этих опытов приведены в табл. 2. В этих опытах также происходит уменьшение количества аммиака в автолизате и нарастание нитритов. Абсолютное содержание аммиака в автолизате в результате дополнительного внесения сернокислого аммония здесь выше и вероятно поэтому его количество через 5 дней уменьшается не столь значительно, как в предыдущих опытах, где аммонийная соль не добавлялась.

Исчезновение аммиака не может быть объяснено улетучиванием, так как общее количество азота в начале и в конце опыта, как это видно из данных, приведенных в табл. 3, остается одним и тем же.

Таким образом, в двух сериях опытов было установлено падение количества аммиака, содержащегося в фильтрате автолизата клеток *Nitrosomonas*. Эти изменения в составе характерны для автолизата клеток *Nitrosomonas*. В качестве контроля были произведены аналогичные исследования с автолизатом клеток гетеротрофных микроорганизмов (дрожжи, микобактерии, неспороносные бактерии). Во всех случаях при выдерживании фильтратов автолизата наблюдалось не уменьшение, а значительное увеличение количества аммиака, о чем более подробно будет сообщено в дальнейшем. Обращает на себя внимание, что в фильтратах автолизата клеток *Nitrosomonas* количество образующихся нитритов невелико по сравнению с количеством исчезающего аммиака. Так, при уменьшении аммиака 18,9 мг (по N₂) образовалось 10,5 мг нитритов

Таблица 3

Количество общего азота в фильтратах автолизатов культур *Nitrosomonas* и гетеротрофных микроорганизмов (в мг/л)

Микроорганизмы	Начальн. кол-во	Конечн. кол-во
<i>Nitrosomonas</i> *	98,35	98,86
Гетеротрофы **	100,07	100,25

* Среднее из 6 опытов.

** Среднее из 4 опытов.

(по N_2 , см. табл. 1). Можно высказать предположение, что процесс нитрификации протекает в несколько этапов. Вначале аммиак, окисляясь под влиянием фермента, который мы предлагаем назвать аммоноксидазой, образует промежуточные продукты, возможно амины или другие азотистые соединения, которые затем окисляются до нитритов. Вполне вероятно, что отдельные этапы этого процесса осуществляются определенными ферментными системами, причем условия, необходимые для функционирования этих систем, различны. В экспериментах, описанных выше, легко осуществляется превращение аммиака в промежуточные продукты, тогда как для их дальнейшего окисления, повидимому, необходимы иные условия.

Выводы

1. Разработаны методы выращивания чистых культур *Nitrosomonas* в больших объемах среды, что позволило накапливать необходимое количество клеток нитрифицирующих бактерий.

2. Автолизаты клеток *Nitrosomonas*, профильтрованные через бактериальные фильтры, содержат аммиак и нитриты. При выдерживании стерильных, не содержащих клеток нитрифицирующих бактерий автолизатов при 30° в течение 5 дней наблюдается значительное уменьшение содержания аммиака и увеличение количества нитритов.

3. При дополнительном внесении в фильтраты автолизатов раствора сернокислого аммония и их выдерживания так же происходит падение количества аммиака и нарастание нитритов.

4. Общее количество содержащегося в автолизатах азота за весь срок опыта не изменяется.

5. Можно предполагать, что процесс нитрификации протекает в результате последовательных этапов окисления, осуществляемых особыми ферментными системами.

Институт микробиологии
Академии наук СССР

Поступило
14 I 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Виноградский, Микробиология почвы, М., 1952. ² А. Имшенецкий, Е. Рубан, Микробиология, 22, 376 (1953).