

В. Л. МЕХТИЕВА

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ NITROSOMONAS EUROPAEA

(Представлено академиком В. Н. Шапошниковым 6 III 1954)

Изучение физиологии автотрофных нитрифицирующих бактерий представляет большой теоретический интерес. Этот вопрос, привлечший к себе внимание ученых еще свыше девяноста лет назад (1), до настоящего времени является объектом пристального изучения и многочисленных дискуссий.

Честь открытия автотрофных нитрифицирующих бактерий принадлежит С. Н. Виноградскому (2).

За истекшую половину двадцатого века вышло в свет громадное количество работ по нитрификации. Однако лишь очень немногим исследователям удалось добиться получения чистых культур нитрифицирующих бактерий, что является необходимым условием для изучения их физиологии. Изолирование нитрификаторов сопряжено с большими трудностями вследствие того, что они встречаются в природе всегда в сопровождении гетеротрофных форм, упорно сопутствующих автотрофам на всех жидких и плотных средах.

Существует несколько методов выделения нитритных микробов: выращивание колоний на плотных минеральных средах (кремнекислый гель, гипсово-магнезиальные блоки, фильтровальная бумага, пропитанная солевым раствором, и др.) с последующей их отливкой в жидкие среды, метод «отрицательных пластинок» Виноградского, выделение культур из одной клетки с помощью микроманипулятора, выделение при помощи микропипетки, метод разведения и др.

Одним из наиболее старых и простых способов выделения чистых культур является метод разведения. Он может быть с успехом применен для изолирования быстро растущих микроорганизмов. Однако лишь очень немногим (3, 4) удалось выделить нитрификаторов этим методом, так как количество гетеротрофных бактерий — спутников в накопительных культурах нитрификаторов во много раз превышает количество автотрофов. Так, по данным Нельсона (5), в накопительной культуре нитритного микроба на среде, приготовленной на дистиллированной воде и перекристаллизованных солях, на 1 клетку нитрификатора приходилось в среднем 1000 клеток посторонних видов.

Естественно, что при такой высокой концентрации сопутствующих форм получить чистую культуру при помощи разведения чрезвычайно трудно. Все исследователи, работавшие в этом направлении, старались приготовить очень высокие разведения и засеять максимальное количество колб. Степень разведения выбиралась при этом произвольно, так что иногда из 2—3 сотен засеянных колб лишь в нескольких удавалось обнаружить нитрификацию, да и то лишь по прошествии 6—9 месяцев. Очевидно, этот прием является весьма громоздким и дает мало надежды на успешные результаты. Вероятность успеха повышается при высокой концентрации изолируемых организмов и уменьшении числа их спутников.

Изучив динамику количества гетеротрофных бактерий-спутников в активной накопительной культуре почвенного нитритного микроба на среде В (среда Виноградского для I фазы нитрификации, приготовленная на дистиллированной воде и перекристаллизованных солях с добавкой микроэлементов), автор подметил, что количество гетеротрофных бактерий в среде возрастает в первые дни после посева, но по мере развития нитрификации заметно снижается. Определение производилось путем счета колоний на мясо-пептонном агаре. Непосредственно после посева число гетеротрофных форм в 1 мл среды было равно 2400; к 3-му дню оно достигло 14 150 000; к 5-му дню снизилось до 5 110 000, к 8-му — до 3 600 000. Через 13 дней в 1 мл накопительной культуры содержалось 3 000 000 клеток гетеротрофов.

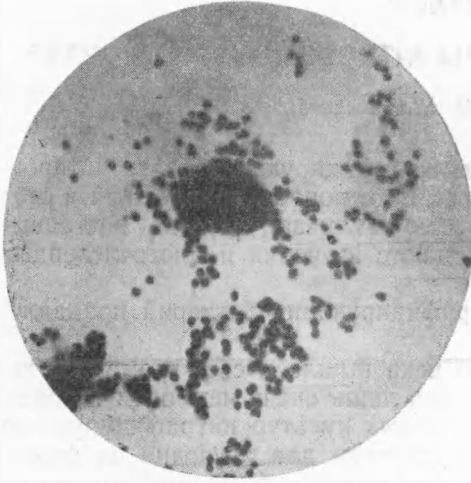


Рис. 1. Клетки *Nitrosomonas europaea* из чистой культуры на жидкой среде Виноградского. $\times 1440$

В старых культурах, окисливших несколько добавочных порций сернокислого аммония (добавлялось по 4 мл 2% раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 100 мл среды по мере исчезновения аммиака), количество спутников снижалось еще более резко. Так, через три недели после посева 1 мл культуры содержал 2 000 000 гетеротрофных бактерий, через полтора месяца — всего 570 000.

Повторное внесение раствора аммонийных солей применялось рядом исследователей с целью увеличения числа клеток нитритного микроба, однако до настоящего времени систематического учета

гетеротрофов по мере развития нитрификации не производилось.

Разумеется, нельзя ожидать, что вся гетеротрофная микрофлора культуры будет расти на мясо-пептонном агаре, но эта среда является наилучшей из всех известных нам плотных сред и подавляющее большинство сапрофитных форм хорошо на ней развивается.

Представлялось целесообразным использовать описываемое явление (уменьшение количества гетеротрофных форм по мере развития нитрификации) для выделения чистой культуры нитритного микроба. С этой целью была взята накопительная культура, окислившая до 3 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 1 литр. В 1 мл культуры содержалось около 500 000 клеток гетеротрофных бактерий. Из этой культуры была сделана болтушка в разведении 1 : 20 000 000 на стерильном физиологическом растворе, приготовленном на дистиллированной воде и перекристаллизованном NaCl. Болтушкой было засеяно 60 маленьких конических колбочек объемом в 50 мл, содержавших по 20 мл среды В; в каждую колбочку вносилось по 1 мл посевного материала.

Через месяц в 9 колбах была обнаружена интенсивная нитрификация. Две из них содержали чистую культуру нитритного микроба. Чистота культур проверялась многократно в 1, 2, 3 и 4-й генерациях посевами на различные питательные среды: мясо-пептонный агар, питательный агар Центрального института экспериментальной медицины, питательный агар с нитратом, мясо-пептонную желатину, мясо-пептонный бульон, мясную воду, крахмальную среду, среду Гильята, лакмусовое молоко, агаризованные бульонные среды с сахарозой, лактозой, глюкозой, мальтозой и маннитом. Посевы выдерживались в течение 15 суток при 26° , мясо-пеп-

тонная желатина — при комнатной температуре. Ни на одной из вышеупомянутых сред не отмечалось никаких признаков роста.

При микроскопическом исследовании культуры в осадке CaCO_3 на дне сосудов были обнаружены мелкие неподвижные овальные, порою почти кокковидные формы. Часть из них была представлена свободными клетками, часть объединена в зооглеи (рис. 1).

Чистота культур проверялась также микроскопическим анализом материала, полученного из всего объема культуры, выросшей в колбе (6).

С этой целью культуральная жидкость центрифугировалась при 3000 об/мин. в течение 45 мин., прозрачная жидкость декантировалась, осадок CaCO_3 обрабатывался слабой уксусной кислотой до растворения $1/3$ его объема, перемешивался и 0,1 мл суспензии переносилась на предметное стекло, после чего мазок просушивался, фиксировался спиртом и окрашивался.

Просмотр под микроскопом неизменно подтверждал абсолютную гомогенность культуры. Длина клеток изолированного микроба в среднем 0,7 μ , ширина 0,5 — 0,7 μ . Клетки с четкими контурами, сильно преломляют свет, хорошо окрашиваются метиленовой синькой, генцианвиолетом, эритрозином, фуксином, грам-отрицательны.

По своим морфологическим и культуральным признакам выделенный микроб сходен с *Nitrosomonas eurgoraea* и, по видимому, идентичен штамму, изолированному Виноградским из казанской почвы.

Чистая культура нитритного микроба отличалась меньшей активностью, чем накопительная. Так, если в накопительной культуре на среде В исчезновение аммиака из среды наблюдалось к 8—9-му дню, то в первой генерации чистой культуры оно произошло на 15-й день, во второй — на 20—27-й, в третьей процесс не закончился даже через $1\frac{1}{2}$ месяца. Аналогичные факты отмечались в свое время рядом исследователей (6-8). Причины их пока еще не выяснены. Подобного рода явления свойственны не только нитритным, но и другим бактериям (ацетоно-бутиловым, пектинразлагающим и др.).

Пользуясь случаем, выражаю благодарность проф. В. И. Калиненко за ценные методические указания и советы.

Институт океанологии
Академии наук СССР

Поступило
5 II 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Pasteur, C. R. Acad. Sci., 56, 265 (1862). ² С. Н. Виноградский, Микробиология почвы, 1952. ³ I. Heubült, Planta Arch. f. wiss. Bot., No. 8, 398 (1929). ⁴ H. Engel, S. Skallau, Zbl. Bakt., Abt. II, 12, 305 (1937). ⁵ D. H. Nelson, *ibid.*, 83, 280 (1931). ⁶ А. А. Имшенецкий, Е. Л. Рубан, ДАН, 86, № 1 (1952). ⁷ Russel, E. Bartow, Univ. Ill., Bull., 14, No. 5, Water Survey ser., No. 13 (1916). ⁸ W. M. Gibbs. Soil Sci., 8, 427 (1919).