

МИКРОБИОЛОГИЯ

М. В. ФЕДОРОВ и Т. А. УСПЕНСКАЯ

**ФИКСАЦИЯ АЗОТА АТМОСФЕРЫ ЧИСТЫМИ КУЛЬТУРАМИ
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ГОРОХА, СОИ И КЛЕВЕРА**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 20 XII 1954)

Было произведено много исследований для установления способности клубеньковых бактерий усваивать атмосферный азот в чистой культуре, однако разными авторами были получены весьма разноречивые результаты. Ряд исследователей обнаружил способность у этих бактерий в небольших количествах фиксировать атмосферный азот (^{1, 4, 6, 8, 9}), а ряд других, используя «меченый» азот (N¹⁵), показал, что эти формы за 10 дней опыта не дают прироста азота в культуре за счет его усвоения из атмо-

Таблица 1

Фиксация азота атмосферы чистыми культурами клубеньковых бактерий гороха, сои и клевера на 1% отваре люцернового сена

Источник углерода и испытывав- шийся штамм клубеньк. бактерий	Число бакте- рий в 1 мл среды в млн		Добавлено сахара на 100 мл среды в г	Потреблено сахара за время опыта в г	Содерж. азота в среде в мг		Фиксировано азота атмо- сферы в мг	
	в начале опыта	в конце опыта			в начале опыта	в конце опыта	всего	на 1 г использо- ван. сахара
Клубеньковая бактерия гороха								
Среда без добавл. источника углерода	0,053	83,2	0,0	0,0	7,0	7,69	0,59	
			0,0	0,0	7,2	7,83	0,73	
Глюкоза	0,053	270,5	1,8	1,13	7,0	10,27	3,17	2,79
			1,8	1,29	7,2	10,71	3,61	
Инвертный сахар	0,057	194,6	1,8	1,40	7,0	10,58	3,48	2,19
			1,8	1,35	7,2	9,69	2,59	
Клубеньковая бактерия клевера								
Среда без добавл. источника углерода	0,097	49,8	0,0	0,0	7,0	7,01	0,01	
			0,0	0,0	7,2	7,44	0,24	
Глюкоза	0,115	880,5	1,8	1,08	7,0	8,65	1,55	1,46
			1,8	1,15	7,2	8,82	1,72	
Инвертный сахар	0,099	1340,0	1,8	1,40	7,0	11,09	3,99	2,84
			1,8	1,50	7,2	11,35	4,25	
Клубеньковая бактерия сои								
Среда без добавл. источника углерода	0,081	5,09	0,0	0,0	7,0	7,40	0,40	
			0,0	0,0	7,2	7,09	-0,11	
Глюкоза	0,080	53,7	1,8	0,96	7,0	8,20	1,10	0,90
			1,8	0,74	7,2	7,91	0,71	
Инвертный сахар	0,080	90,5	1,8	1,05	7,0	8,85	1,85	1,85
			1,8	1,22	7,2	9,05	1,85	

сферы (7, 2, 3). Поэтому, учитывая, что вопрос о способности этих бактерий усваивать атмосферный азот в чистой культуре недостаточно выяснен, мы предприняли попытку провести наблюдения над азотфиксирующей способностью чистых культур клубеньковых бактерий гороха, сои и клевера, полученных из коллекции Московского отделения Всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии.

Для размножения указанных бактерий нами были использованы питательные среды, приготовленные на отварах бобовых растений, в соответствии с методикой, предложенной М. В. Федоровым и И. В. Богдановой (5). Отвары разбавлялись водопроводной водой таким образом, чтобы общее содержание азота в 100 мл среды не превышало 3—10 мг. В качестве источника углерода были использованы глюкоза и инвертный сахар в концентрации 0,1 моля (1,8 г на 100 мл среды). Питательная среда разливалась по 100 мл в конические колбы объемом на 300 мл и стерилизовалась в кипятильнике Коха при 100° 3 раза по 30 мин. через каждые 24 часа. Инфекция питательной среды осуществлялась 1 мл суспензии клубеньковых бактерий, смытых с косога агара. После инфекции колбы ставились в термостат с температурой 30° на 40 дней. До опыта и после опыта в среде определялись: 1) общий азот, 2) сахар и 3) число клеток клубеньковых бактерий (методом прямого счета под микроскопом). Полученные в ходе этих опытов результаты приводятся в табл. 1.

На 1% отваре люцернового сена все испытывавшиеся клубеньковые бактерии очень медленно росли и практически не фиксировали азота атмосферы. При добавлении же в среду глюкозы или инвертного сахара

Таблица 2

Фиксация азота атмосферы чистыми культурами клубеньковых бактерий гороха, клевера и сои на 2,5% отваре клеверного сена

Источник углерода и испытывав- шийся штамм клубеньковых бактерий	Число бактерий в 1 мл среды в млн.		Добавлено сахара на 100 мл среды в г	Потреблено саха- ра за время опы- та в г	Содерж. азота в среде в мг		Фиксировано азота атмосфе- ры в мг	
	в начале опыта	в конце опыта			в начале опыта	в конце опыта	всего	на 1 г использо- ван. сахара
Клубеньковая бактерия гороха								
Среда без добавл. источника углерода	0,050	43,8	0,0	0,0	3,22	3,75	0,53	2,25
			0,0	0,0	3,34	3,22	0,12	
Глюкоза	0,053	250,9	1,8	1,00	3,22	5,32	2,10	2,25
			1,80	1,09	3,34	5,97	2,63	
Клубеньковая бактерия клевера								
Среда без добавл. источника углерода	0,085	33,8	0,0	0,0	3,22	3,90	0,68	3,66
			0,0	0,0	3,34	3,65	0,31	
Инвертный сахар	0,079	1411,5	1,8	1,65	3,22	8,80	5,58	3,66
			1,8	1,43	3,34	8,92	5,58	
Клубеньковая бактерия сои								
Среда без добавл. источника углерода	0,087	0,97	0,0	0,0	3,22	3,27	0,0	2,23
			0,0	0,0	3,34	3,35	0,0	
Инвертный сахар	0,085	109,3	1,80	1,02	3,22	5,65	2,43	2,23
			1,80	0,90	3,34	5,22	1,88	
Глюкоза	0,081	161,9	1,80	1,30	3,22	5,94	2,72	2,02
			1,80	1,18	3,34	5,67	2,33	

Таблица 3

Фиксация азота атмосферы клубеньковыми бактериями гороха и клевера на безазотной питательной среде с добавленным в нее отваром люцернового сена

Испытывавшиеся штаммы бактерий и колич. отвара люцернового сена в мл на 100 мл среды	Содерж. сахара в 100 мл среды в г	Потреблено сахара за время опыта в г	Найдено азота в среде в мг		Фиксировано азота из атмосферы в мг	
			в начале опыта	в конце опыта	всего	на 1 г использов. сахара
Клубеньковая бактерия гороха						
Среда без добавл. сенного отвара	1,80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1,80	0,0	0,0	0,0	0,0	
5,0	1,80	0,63	2,66	3,62	0,96	1,58
	1,80	0,87	2,50	3,90	1,40	
10,0	1,80	0,96	5,53	7,81	2,48	2,42
	1,80	1,30	5,11	8,03	2,92	
30,0	1,80	1,65	15,50	16,03	0,53	0,79
	1,80	1,53	15,12	17,09	1,97	
Клубеньковая бактерия клевера						
Среда без добавл. сенного отвара	1,80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1,80	0,0	0,0	0,0	0,0	
5,0	1,80	0,70	2,66	4,44	1,78	2,29
	1,80	0,84	2,50	4,20	1,70	
10,0	1,80	1,12	5,33	8,44	3,11	2,87
	1,80	1,30	5,11	8,96	3,85	
30,0	1,80	1,52	15,50	16,90	1,40	1,08
	1,80	1,69	15,12	17,21	2,09	

их развитие сильно активировалось и в среде обнаруживалась прибыль азота, далеко превосходящая возможную ошибку определения. На инвертном сахаре, например, клубеньковые бактерии гороха дали прибыль азота 2,19 мг на 1 г использованного сахара. Близкие цифры получались и для клубеньковых бактерий клевера (2,84 мг) и сои (1,85 мг). Столь значительную прибавку азота в среде невозможно объяснить неточностью определения, а следует считать, что она связана с фиксацией этими бактериями азота из атмосферы.

Близкие результаты получились и при постановке опытов на 2,5% отваре клеверного сена с добавлением к нему в качестве источника углерода глюкозы или инвертного сахара. Результаты этого опыта приводятся в табл. 2.

Из этих данных также следует, что при добавлении к отвару клеверного сена глюкозы или инвертного сахара развитие клубеньковых бактерий гороха, клевера и сои чрезвычайно сильно ускоряется и в среде обнаруживается прибыль азота в пределах 2,02—3,66 мг на 1 г использованного сахара. Этот азот, как мы уже указывали выше, очевидно, фиксирован бактериями из атмосферы. Повидимому, небольшие количества связанного азота в среде, а также наличие в ней дополнительных факторов роста позволяют клубеньковым бактериям начать свое развитие и образовать известную массу бактериальных клеток. А затем, когда доступные формы азота из среды исчерпываются, развившаяся масса живых клеток начинает усваивать азот из атмосферы, но с небольшой интенсивностью. О такой возможности говорят не только эти данные, но и результаты нижеследующего опыта, в котором выращивание тех же клубеньковых бактерий производилось на синтетической питательной среде для азото-

бактера (модификация М. Федорова) с добавлением в нее различных количеств сенного отвара люцерны. Опыт ставился в конических колбах объемом на 300 мл. В каждую колбу наливалось по 100 мл среды с 1,8 г сахара. Среда после стерилизации при 0,5 атм. давления пара в автоклаве инфицировалась клубеньковыми бактериями и выдерживалась в термостате при 30° 2 мес. Результаты этого опыта приводятся в табл. 3.

В этом опыте прибыль азота в среде в вариантах с добавлением 5 и 10 мл отвара люцернового сена отвечала 1,58—2,87 мг и также не может быть объяснена ошибкой анализа. Аналогичные результаты были получены и при культуре клубеньковых бактерий гороха и клевера на той же синтетической среде с 1,8 г инвертного сахара, но с добавлением небольших количеств аспарагина (10,52—10,62 мг азота). В этом варианте опыта использование инвертного сахара из среды достигло 0,80—1,32 г, а фиксация азота атмосферы составляла 3,21—3,36 мг на 1 г использованного сахара.

Из всех этих опытов следует, что клубеньковые бактерии гороха, клевера и сои хорошо растут на сенных отварах с добавлением глюкозы или инвертного сахара. На таких средах, содержащих небольшие количества органического азота и дополнительные факторы роста, они довольно интенсивно потребляют сахар и в заметном количестве фиксируют азот из атмосферы. Поэтому следует считать, что и в условиях чистой культуры клубеньковые бактерии могут фиксировать небольшие количества атмосферного азота, если в среде имеются благоприятные для этого условия.

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

Поступило
16 XII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Вернер, А. Ковалев, ДАН, 4, № 7, 315 (1936). ² М. П. Корсакова, Г. В. Лопатина, Микробиология, 3, 2, 204 (1939). ³ И. Л. Работнова, Микробиология, 8, 9—10, 1151 (1939). ⁴ М. Ф. Федоров, Сborn. Пути повышения активности клубеньковых бактерий, М., 1948, стр. 17. ⁵ М. В. Федоров, И. В. Богданова, Тр. научн. конфер. Моск. с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева, в. 1, 65 (1945). ⁶ M. W. Beijerinck, Verslag Akad. Wetensch. Amsterd., ser. 3, No. 8, 460 (1891). ⁷ R. Burris, F. Eppling et al., J. Biol. Chem., 148, No. 2, 349 (1943). ⁸ E. Fred. A. Whiting, E. Hastings, Wisc. Agric. Exp. Stat. Research Bull., 72, 1 (1926). ⁹ M. Maze, Ann. Inst. Pasteur, 11, 44 (1897).