Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 1

МИКРОБИОЛОГИЯ

Е. Л. РУБАН и Г. А. ЗАВАРЗИН

ОСТАТОЧНАЯ НИТРИФИКАЦИЯ У NITROSOMONAS

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 IV 1955)

Изучение физиологии нитрифицирующих организмов при помощи манометрической методики привело к установлению двух противоречивых фактов: Мейергоф ([6], [7]) и Гофман и Лиз ([4]) установили, что весь кислород, потребленный нитрификаторами, точно соответствует кислороду образовавшихся нитритов (нитратов). С другой стороны Бёмеке ([3]) нашел, а Гофман и Лиз ([5]) подтвердили, что в отсутствие аммиака отмытые суспензии клеток нитрификаторов поглощают небольшое количество кислорода. Последнее расценивалось как доказательство существования у нитрификаторов гетеротрофного обмена. Однако кислород может использоваться на различные процессы, и результаты исследований Бёмеке совершенно недостаточны для опровержения принципа Виноградского, согласно которому нитрификация есть единственный энергетический процесс у Nitrosomonas.

В работе А. А. Имшенецкого и Е. Л. Рубан ([1]) установлено, что автолизаты отмытых клеток Nitrosomonas содержат значительные количества аммиака. В связи с этим возник вопрос о возможности у Nitrosomonas остаточной нитрификации. Необходимо было показать, что отмытые клетки Nitrosomonas способны выделять нитриты, не получая аммиака извне. Наиболее удачным из ряда проведенных опытов оказался следующий вариант. В колбе с 500 мл среды (K_2HPO_4 0,1 г, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 г, $MgSO_4$ 0,5 г, NaCl 0,2 г, мел 0,5 г, 1 л водопроводной воды) выращивалась культура Nitrosomonas. Критерием чистоты культуры была однородная морфология клеток под микроскопом и отсутствие роста на картофельном и мясопептонном агаре, мясопептонном бульоне и пивном сусле в течение 10 дней ([2]).

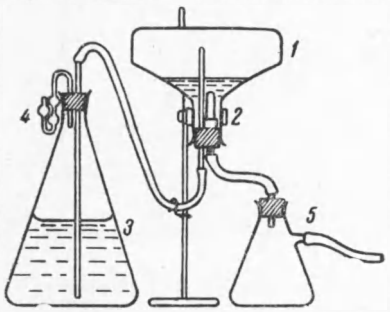


Рис. 1. Схема прибора. *1* — колба Виноградского с культурой Nitrosomonas, *2* — фильтр Беркефельда, *3* — колба с 2 л промывной среды, *4* — затвор с серной кислотой, *5* — колба Бунзена

Культура, образовавшая достаточное количество нитритов, служила для обнаружения нитрификации в отсутствие аммиака в специально смонтированном приборе (рис. 1). Колба *1* с культурой закрывалась специальной резиновой пробкой с фильтратом Беркефельда и стеклянной трубкой *2* для подачи среды, для промывания переворачивалась и укреплялась в штативе; стеклянная трубка резиновым шлангом с винтовым зажимом соединялась с 3-литровой колбой *3* с промывной средой. Для промывания употреблялась стерильная среда без $(NH_4)_2SO_4$, приготовленная на дважды дестиллированной воде, отогнанной из кислой среды. Так как такая среда очень быстро обогащается аммиаком из воздуха (до 0,1 γ/мл), то

в пробку колбы вставлялся затвор с серной кислотой *4*, применяемый в опытах по брожению, вполне предохранявший от проникновения аммиака в среду. Установка стерилизовалась по частям, собиралась с соблюдением условий стерильности и присоединялась к насосу через колбу с тубусом *5*.

Отсутствие аммиака в промывной среде определялось по исчезновению желтой окраски с реактивом Несслера и конуса Тиндаля с реактивом Гревса, что соответствовало не более нескольких сотых γ/мл NH_3. Нитриты определялись с реактивом Грисса в фотоэлектроколориметре ФЭК-М.

Таблица 1

Остаточная нитрификация у Nitrosomonas. (Выделение NO_2 в гаммах)

№№ опытов	Возраст культуры в сутк.	Обнаружено NO_2 в среде с аммиаком	Выделено NO_2 при отсутствии NH_3 в среде				
			1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	всего
10	8	5396	270	0,0	0,0	—	270[1]
12	20	3966	1194	0,0	0,0	—	1194[2]
17	20	3832	135,2	422,4	20,9	13	651,3
18	20	605880	89,7	15,2	1029	6	1160,1[3]
19	8	128150	50,6	130,5	166,5	152,0	575,6
27	8	50000	104,5	52,5	26,1	12,0	205,3
28	8	50000	156,8	6,4	0,0	0,0	164,4[4]
31	10	—	13,6	20,4	7,44	4,9	43,34[5]
32	10	—	8,7	8,84	1,35	0,6	11,49[6]

[1] Осадок растворялся HCl. Добавление NH_3 не вызывало нитрификации.
[2] Осадок растворялся HCl.
[3] Добавление NH_3 вызвало бурную нитрификацию.
[4] Добавление NH_3 не вызвало нитрификации.
[5] На 2 сутки добавлена культура, убитая УФ.
[6] На 2 сутки добавлена культура, убитая HCl.

Осадок, содержащий клетки Nitrosomonas, промытый таким образом, по многократным определениям не содержал аммиака. Отмытый осадок мела с культурой оставлялся стоять с 50—100 мл промывной среды. Через сутки среда отсасывалась и определялось количество выделенных нитритов и аммиака, но последний или отсутствовал или наблюдался лишь в концентрациях, находившихся у предела чувствительности метода.

Результаты нескольких опытов приведены в табл. 1. Из таблицы следует, что культура Nitrosomonas в отсутствие аммиака выделяет небольшие, но хорошо определяемые количества нитритов. Образование нитритов продолжается в течение 3—4 суток, редко около недели.

В тех случаях, когда остаточная нитрификация прекращалась (опыты №№ 10 и 28), добавление аммиака не вызывало вспышки нитрификации: повидимому, большинство клеток было мертвых. Добавление аммиака к культуре с продолжающейся остаточной нитрификацией вызывало резкое увеличение количества нитратов в среде (опыт 18).

Растворение осадка разбавленной HCl (опыты №№ 10 и 12) приводило к тому, что в первые же сутки выделялось значительное количество нитритов и остаточная нитрификация прекращалась. Это связано, повидимому, с диспергированием клеток Nitrosomonas в среде. Двойная окраска Пешкова (Гимза — лихтгрюн) показала, что базофильные клетки приурочены почти исключительно к комочкам мела. Клетки же, находящиеся в жидкой фазе, окрашены в зеленый цвет лихтгрюном и, очевидно, неактивны. Так как все возможности проникновения аммиака извне были исключены самым тщательным образом, оставалось предположить, что нитрификация идет за счет аммиака, образуемого клетками самой куль-

туры. Возможность автолиза в условиях опыта не была исключена. Однако попытка получить нитрификацию за счет азота автолизатов: Mycobacterium rubrum, Mycobact. phlei, Micrococcus sp., Proteus vulgaris, Bacillis mesentericus, Pseudomonas fluorescens, Sarcina lutea совершенно не удалась. Автолизаты получались по Имшенецкому и Рубан ([1]).

Автолизат самого Nitrosomonas в этом отношении ничем не отличался от автолизатов клеток гетеротрофов. Отсутствие нитрификации не следует приписывать в данном случае тормозящему действию органических веществ, так как на среде с аммиаком нитрификация шла, хотя и несколько подавленная. Также безуспешной оказалась попытка увеличить выделение нитритов, добавляя в колбу с ведущей остаточную нитрификацию культурной Nitrosomonas клетки этого организма, убитые ультрафиолетовой радиацией (опыт № 31) или соляной кислотой (опыт № 32).

Таблица 2

Количество общего азота культуры до и после остаточной нитрификации

	Опыт № 1	Опыт № 2
Общий азот в мг:		
Исходный	0,2576	0,4368
Конечный	0,2184	0,3948
Разность	0,0392	0,0420
NO_2 в мг:		
Теоретич.	0,1176	0,1260
Опытн.	0,158	0,173

Таким образом, предположение об использовании аммиака автолизирующихся клеток Nitrosomonas также пришлось отвергнуть. Можно считать установленным, что в культурах Nitrosomonas, отмытых от аммиака, имеет место остаточная нитрификация. Единственным вероятным источником азота для нее оказываются азотсодержащие запасные вещества клеток Nitrosomonas. Выделение азота при остаточной нитрификации составляет несколько процентов от общего азота культуры, как это показали расчеты по числу клеток и прямые определения в отдельных опытах (табл. 2).

Существование остаточной нитрификации устраняет кажущееся противоречие между результатами Мейергофа и Гофмана и Лиза, с одной стороны, и Бёмеке, с другой, и подтверждает представления Виноградского о природе хемосинтеза.

В заключение приносим благодарность чл.-корр. АН СССР А. А. Имшенецкому за ценные указания, сделанные им во время работы.

Поступило
8 IV 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А Имшенецкий, Е. Л. Рубан, Микробиология, 23, 3, 4 (1954). [2] Е. Л. Рубан, Микробиология, 24, 1 (1955). [3] H. Bömeke, Arch. f. Mikrob., 10, 4, 385 (1939). [4] T. Hofman, H. Lees, Biochem. J., 52, No. 4, XIX (1952). [5] T. Hofman, H. Lees, Biochem. J., 54, No. 4, 579 (1953). [6] O. Meyerhof, Pflüg. Arch. Physiol., 165, 229 (1916). [7] O. Meyerhof, Pflüg. Arch. Physiol., 166, 240 (1917).