

УДК 631.417.2:631.461.2

ВЛИЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, МИНЕРАЛИЗУЮЩИХ ГУМУСОВЫЕ ВЕЩЕСТВА, НА РАЗВИТИЕ БАКТЕРИЙ АВТОТРОФНОЙ НИТРИФИКАЦИИ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ СРЕДЫ

Е. З. ТЕППЕР, Т. В. ПУШКАРЕВА

(Кафедра микробиологии ТСХА и проблемная лаборатория МГМИ)

При проведении опытов с гумусовыми кислотами с целью выделения микроорганизмов рода *Nosardia*, которые минерализуют гумусовые вещества, для познания химизма минерализации их [11] мы решили более детально изучить сукцессию микрофлоры, проходящую в течение более длительного периода разложения.

На определенном этапе разложения гумусовых кислот наряду с микроорганизмами автохтонной группы, минерализующими гумусовые вещества [4], были выявлены бактерии рода *Nitrosomonas*. Развитие последних при разложении гумусовых кислот вполне закономерно, так как это разложение сопровождается мобилизацией аммонийного азота. Однако то обстоятельство, что при разложении фракций гумуса, различающихся по молекулярной массе, клетки *Nitroso-*

monas появляются не в один и тот же период инкубации и различаются по размерам, свидетельствует об определенном влиянии продуктов жизнедеятельности микроорганизмов при минерализации гумусовых веществ на развитие данных клеток.

В этом аспекте большой интерес представляют и спутники нитрифицирующих бактерий. В свое время С. Н. Виноградский [2] отмечал наличие их в культуре нитрифицирующих бактерий, но они не были им изучены. Между тем, чтобы выжить в условиях среды 1-й фазы нитрификации, в которой отсутствуют углеродсодержащие органические соединения, они должны обладать способностью к гетеротрофной нитрификации [1]. Все эти вопросы и рассматриваются в настоящей работе.

Объекты и методы исследования

Опыты с гумусовыми веществами были поставлены на гелевых пластинах в электрических условиях среды по С. Н. Виноградскому [2]. Отмытые от следов хлора и прокипяченные пластины, пропитывали 3 мл минеральной среды следующего состава (г на 200 мл дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $NaCl$ — 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; $Mn_2(SO_4)_3 \cdot 4H_2O$ — 0,01. В качестве единственного источника углерода и азота добавляли соответствующую фракцию гумусовой кислоты, полученную Н. А. Туевым.

В опыте было по две фракции фульвокислот (ФК) и гуминовых кислот (ГК). Молекулярная масса (ММ) 1-й фракции ФК составляла 520, 2-й — 2100, 1-й и 2-й фракций ГК — соответственно 9200 и 27 000.

Все фракции гумусовых веществ были доведены до pH 6,0. ФК добавляли из расчета 50 мг ГК 55 мг С на чашку. В каждую чашку добавляли по 75 мг мела, и среда инфицировалась 1 мл (10^{-2}) суспензией почвы, богатой органическим веществом. Содержимое чашек перемешивали и подсушивали до эмалевой поверхности, после чего в многократной повторности помещали

во влажную камеру и в термостат при температуре 28—30°.

После инкубации (в течение 2—12 мес) в чашках визуальными и под микроскопом определяли культуральные признаки выросших колоний, а затем изучали микробные пейзажи в репликах, приготовленных по методу Е. З. Теппер [6]. Суть этого метода заключается в следующем: к гелевой пластине, в которой прошел тот или иной процесс, осторожно сбоку добавляют стерильную дистиллированную воду, при этом микроорганизмы, развившиеся на пластине, за исключением мицелия актиноцид и микромонопор, вросших в гель, поднимаются в один слой клеток к поверхности воды. Если к последней приложить обезжиренное предметное стекло, то на нем остается отпечаток (реплика) микроорганизмов, отражающий микробный пейзаж на чашке.

Влияние продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, минерализующих гумусовые вещества, на развитие клеток *Nitrosomonas* изучали двумя способами: 1) делали последовательные пассажи (перевивки) этих клеток, выявленных в процессе разложения гумусовых веществ, на гелевые пластины,

протитанные минеральной средой для 1-й фазы нитрификации. После завершения процесса (по реакции на аммиак и нитрит) просматривали микробные пейзажи по указанному выше методу; 2) из соответствующих чашек с разлагающимися гуматами (лучше из высокомолекулярной фракции ГК на 6—8-м мес инкубации) готовили водный экстракт: 10 мл дистиллированной воды добавляли к соответствующей чашке с гуматами, через 1,5—2 ч настаивания ее сливали и пропускали через стерильный мембранный фильтр № 1. Затем перед разливкой агаризованной минеральной среды (предварительно из агара удаляли водорастворимые вещества) для 1-й фазы нитрификации к ней добавляли 0,5—1 мл экстракта, после чего производили поверхностный посев суспензии из чашек, в которых были обнаружены зоны с клетками *Nitrosomonas*. Контролем служила аналогичная среда без добавления экстракта.

В целях исследования спутников бактерий 1-й фазы нитрификации гелевые пла-

стины пропитывали минеральной средой Виноградского для этой фазы нитрификации, затем инфицировали среду 1 мл (10^{-4}) суспензией торфяно-болотной почвы низинного типа. Затем в разные сроки инкубации изучали микробные пейзажи по указанному выше методу, а в отдельные сроки содержимое чашек смывали в стерильные колбы с водой и делали посевы на нитритном агаре.

Для изучения экологических особенностей микроорганизмов, сопутствующих 1-й фазе нитрификации, чистые культуры соответствующих родов микроорганизмов испытывали на способность к гетеротрофной нитрификации. С этой целью использовали жидкую среду для 1-й фазы нитрификации, в которую добавляли ацетат натрия. Контролем была основная минеральная среда без добавления ацетата натрия. Данные о накоплении нитрита гетеротрофными микроорганизмами сравнивали с результатами определения содержания автотрофных микроорганизмов — *Nitrosomonas*, полученными Пзинтером [по 1].

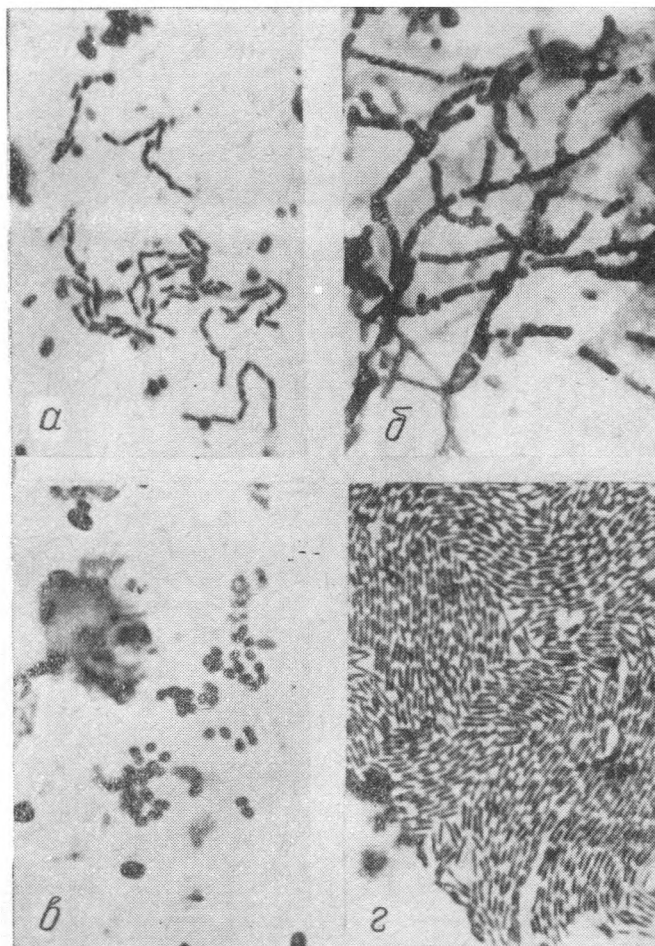
Микроорганизмы, участвующие в разложении гумусовых кислот, и бактерий автотрофной нитрификации

Через 2 мес инкубации на поверхности гелевых пластин с разными фракциями гумуса появились мелкие колонии бурого и желто-бурого цвета. После 4 мес диаметр

отдельных колоний достигал 1,0—2—2,5 мм. При просмотре колоний под микроскопом (при $\times 30$ и 80) у многих из них по периферии обнаружена мицелиальная зона, состо-

Рис. 1. Микроорганизмы, минерализующие гумусовые вещества, в микробных пейзажах в репликах из гелевых пластин с фракциями гумуса в разные сроки инкубации ($\times 1500$).

а — фрагментированные обрывки гифов *Nocardia*, встречающиеся во всех фракциях гумуса; б и в — соответственно фрагментированные гифы и кокковидные фрагменты нокардий, чаще встречающиеся в микробных пейзажах 1-й и 2-й фракций ГК; г — бактерии рода *Vastodegma* во всех фракциях гумуса после 5 мес инкубации.



ящая из фрагментированных гифов, характерных для представителей рода *Nocardia*¹, и близких к ним микроорганизмов.

Изучение микробных пейзажей в репликах из этих же чашек показало, что в указанный период во всех фракциях гумуса имеются зоны, состоящие из фрагментированных гифов и кокковидных фрагментов нокардий (рис. 1, а, б, в). Судя по диаметру отдельных гифов и их фрагментов, они принадлежат к разным видам данного рода. В микробных пейзажах, приготовленных после 5 мес инкубации, наряду с обрывками фрагментированных гифов нокардий и, возможно, близких к ним микроорганизмов часто встречаются палочки, выложенные в один слой клеток, соединенных в пленку — представители рода *Bactodermia* (рис. 1, г). Последние в этот период чаще встречаются в высокомолекулярных фракциях гумуса. В указанный период в микробных пейзажах высокомолекулярных фракций ФК и ГК наблюдаются довольно обширные зоны клеток *Nitrosomonas*² (рис. 2, а, б). Через 6 мес инкубации аналогичные пейзажи с зонами *Nitrosomonas* были обнаружены и в репликах из 1-й фракции ГК (рис. 2, в). Значительно позже (после 8 мес инкубации) зоны с клетками *Nitrosomo-*

pas встречались также в репликах из разлагающейся 1-й фракции ФК (рис. 2, г). При этом размеры клеток *Nitrosomonas* были значительно меньше, чем аналогичных клеток в высокомолекулярной фракции ФК и ГК и, как правило, зоны их окружали пленки бактерий рода *Bactodermia*.

Итак, в начале разложения разных фракций гумусовых веществ участвуют в основном представители рода *Nocardia* и, вероятно близкие к ним микроорганизмы, а в более поздние сроки — бактерии рода *Bactodermia*, которые, видимо, и заканчивают процесс их минерализации.

Выявленные в репликах из разных фракций разлагающегося гумуса клетки *Nitrosomonas* следует рассматривать как сопутствующую микрофлору не только потому, что процесс минерализации гумуса сопровождается мобилизацией аммонийного азота, но и потому, что при разложении гумусовых веществ образуются какие-то дополнительные факторы роста, в которых нуждаются бактерии рода *Nitrosomonas*.

Так, при пассаже клеток *Nitrosomonas* из 2-й фракции ФК (рис. 2, в) на гелевых пластинах, пропитанных минеральной средой для 1-й фазы нитрификации, после 21-го дня инкубации при температуре 28—30° и положительной реакции на нитрит были приготовлены реплики. Во всех микробных пейзажах обнаружено большое количество этих клеток, но размеры их были значительно меньше, чем в исходной культуре. При последующем пассаже клеток *Nitrosomonas* из предыдущей культуры на гелевую пластину с аналогичной средой процесс нитрификации был замедлен (реакция на нит-

¹ Часть выделенных чистых культур на нитритном агаре подверглись идентификации и были отнесены ко 2-й морфологической группе рода *Nocardia*.

² Клетки, взятые из этих зон, вызывали в жидкой и на гелевых пластинах со средой для 1-й фазы нитрификации окисление аммиака до нитрита.

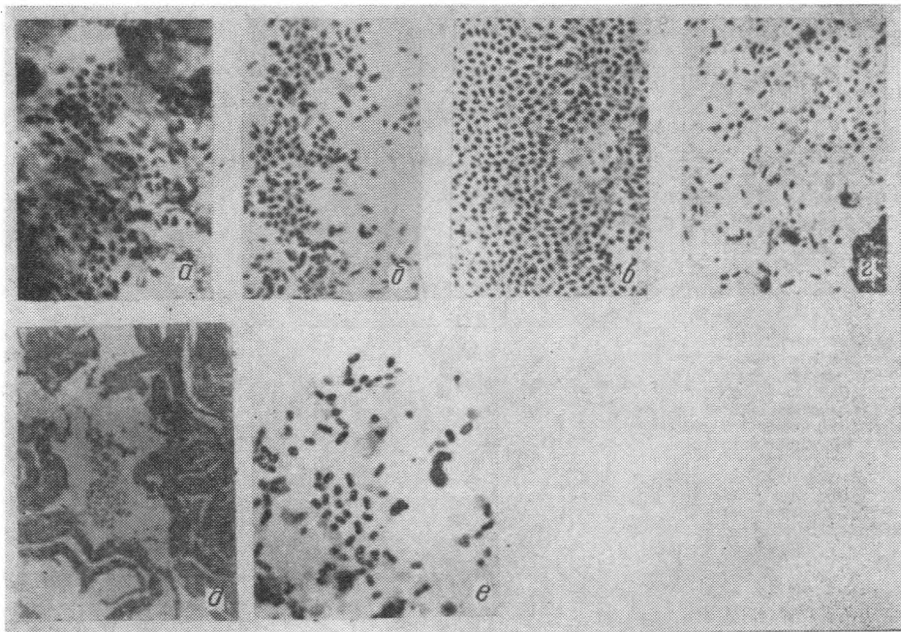


Рис. 2. Клетки *Nitrosomonas* в микробных пейзажах в репликах из гелевых пластин с разными фракциями гумуса в разные сроки инкубации и из гелевых пластин со средой для 1-й фазы нитрификации ($\times 1500$).

а и б — соответственно из 2-й и 1-й фракций ГК; в и г — соответственно 2-й и 1-й фракций ФК; д — при пассаже клеток из 2-й фракции ФК на гелевые пластины с минеральной средой для 1-й фазы нитрификации; е — из колоний на агаризованной среде для 1-й фазы нитрификации с добавлением экстракта из разлагающихся фракций ГК (1-й фракции).

рит появилась лишь на 30-е сутки инкубации), а в микробных пейзажах в репликах из последней чашки были обнаружены едва заметные (меньше чем в предыдущем пассаже) клетки *Nitrosomonas* (рис. 2, *д*). Это свидетельствует о том, что при последовательных пересевах клеток *Nitrosomonas* на сугубо минеральную среду им в конечном счете не хватает каких-то дополнительных факторов роста, что приводит к постепенной их деградации.

При посеве клеток *Nitrosomonas* из чашек с высокомолекулярной фракцией ГК на агаризованную минеральную среду для 1-й фазы нитрификации с добавлением водного экстракта, полученного из соответствующих чашек с разлагающейся фракцией ГК, через 10—12 дней инкубации наряду с колониями других микроорганизмов были обнаружены под микроскопом (при $\times 30$ и $\times 80$) бесцветные мелкие (диаметр 100—150 мкм) сильно преломляющие свет колонии. Они состоят из овальных клеток *Nitrosomonas* (рис. 2, *е*), близких по форме и размерам к исходной культуре (рис. 2, *а*). На этой же среде выявлены колонии бактерий рода *Bactodermia*. На аналогичной среде без добавления экстракта колонии

Nitrosomonas не обнаружены, не получили развития и колонии *Bactodermia*, которые также нуждаются в каких-то дополнительных факторах роста.

Итак, развитие клеток *Nitrosomonas* при разложении гумусовых веществ связано не только с мобилизацией аммонийного азота, но и с образованием каких-то дополнительных факторов роста, в которых нуждаются *Nitrosomonas*.

Следует отметить, что наши наблюдения в какой-то мере перекликаются с данными О. М. Ульяновой [7]. Ею было установлено, что в черноземах и в других естественных средах, богатых органическим веществом, создаются более благоприятные условия для развития *Nitrosomonas*, чем в песчаных и других почвах, бедных органическими веществами. Нитрифицирующая активность их независимо от того, из какой естественной среды они были выделены, резко снижается при последовательных пересевах на минеральную среду, что вызывает быструю гибель культур в лабораторных условиях. Вытяжки из субстратов, из которых они выделялись, способствовали их выживанию и повышению нитрифицирующей активности.

Микроорганизмы, сопутствующие автотрофной нитрификации, и их особенности

Для изучения сопутствующей микрофлоры автотрофной нитрификации после 21-го дня инкубации при интенсивной реакции на

нитрит в опыте, поставленном на гелевых пластинах для 1-й фазы нитрификации, были приготовлены реплики методом, описан-

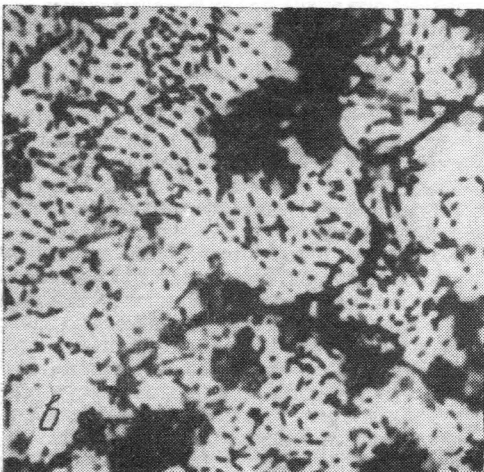
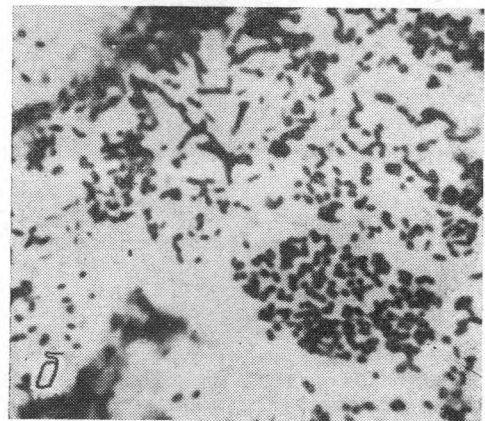
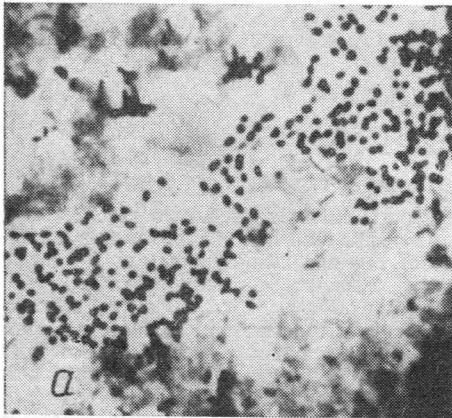


Рис. 3. Микробный пейзаж из культуры 1-й фазы нитрификации на гелевых пластинах в разные сроки инкубации ($\times 1500$).

а — клетки *Nitrosococcus* после 21-го дня инкубации; *б* — скопление клеток *Nitrosococcus*, окруженных обрывками фрагментированных нитей нокардий, и клеток *Arthrobacter* через 40 дней инкубации; *в* — цепочки палочковидных и кокковидных фрагментов нокардий через 60 дней инкубации.

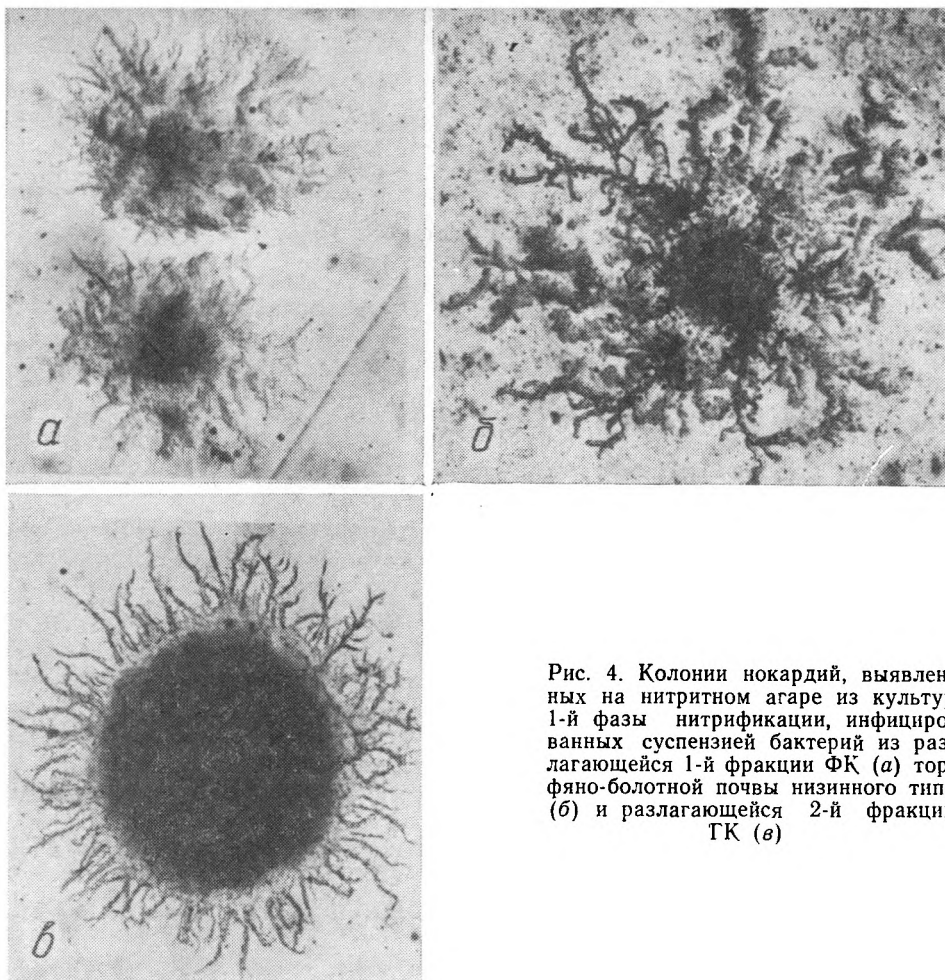


Рис. 4. Колонии нокардий, выявленных на нитритном агаре из культур 1-й фазы нитрификации, инфицированных суспензией бактерий из разлагающейся 1-й фракции ФК (а) торфяно-болотной почвы низинного типа (б) и разлагающейся 2-й фракции ТК (в)

ном выше. В микробных пейзажах в этот период выявлены лишь разбросанные клетки типа *Nitrosococcus* (рис. 3, а).

В репликах, приготовленных из аналогичных чашек в последующие сроки инкубации, микробные пейзажи были различные. Так, в 35—40-дневной культуре в отдельных зонах микробного пейзажа наблюдались компактные скопления *Nitrosococcus*, окруженные обрывками фрагментированных гифов, палочковидных и кокковидных фрагментов нокардий и близких к ним микроорганизмов (рис. 3, б). В микробных пейзажах реплик из 60-дневной культуры нитрификации, как правило, преобладали беспорядочные скопления обрывков фрагментированных гифов, а иногда цепочки палочковидных и кокковидных фрагментов нокардий (рис. 3, в); очень часто встречались также большие зоны клеток рода *Bactoderma*.

При посеве суспензии из 60-дневной культуры нитрификации на нитритный агар было выявлено довольно большое количество (от 31 до 53 %) нокардий, представленных, судя по культуральным признакам колоний (рис. 4 а, б, в), разными видами данного рода. В отдельных чашках обнаружены колонии *Arthrobacter* (от 3,0 до 16 %) и *Mycobacterium* (около 6,0 %), в том числе и *Mycob. filiforme*. Микроорганизмы рода *Bactoderma*, несмотря на то, что они занимали

обширные площади в микробных пейзажах в указанный период, не выявлены на этой среде, так как они нуждаются в каких-то дополнительных факторах роста [5].

Таким образом, спутниками бактерий 1-й фазы нитрификации являются в основном микроорганизмы, которые непосредственно участвуют в разложении гумусовых кислот, — представители рода *Nocardia*, *Bactoderma*, *Arthrobacter* и *Mycobacterium* [4]. Однако все эти микроорганизмы гетеротрофы и нуждаются в углеродсодержащих органических соединениях, которые отсутствовали в среде, которой пропитывали гелевые пластины.

В этом аспекте для объяснения возможного развития спутников автотрофной нитрификации в столь атипичной среде представляет интерес изучение способности их к гетеротрофной нитрификации. Так, в последнее десятилетие появились данные [1] о том, что многие представители бактерий, грибов и других групп микроорганизмов могут окислять не только аммиак и нитрит, но и большое количество органических азотсодержащих соединений. Продуктами этих гетеротрофных процессов нитрификации наряду с нитритом и нитратом могут быть гидроксиламин и органические соединения: производные гидроксиламина, окислы аминов, нитрозо- и нитросоединения и др. Од-

Данные о накоплении нитрита гетеротрофными микроорганизмами, выделенными в опытах по разложению гумусовых веществ, и чистой культуре *Nitrosomonas*

Культура	Максимальная концентрация N—NO ₂ , мкг/мл	
	NH ₄ (контроль)	NH ₄ + ацетат натрия
Гетеротрофы		
<i>Nocardia rubra</i> шт. 18 из длительно парящей почвы	0,001	67,2
<i>Nocardia</i> Sp. — 1 из 1-й фракции ФК	0,001	69,6
<i>Nocardia</i> Sp. — 2 из 2-й фракции ФК	0,001	75,9
<i>Nocardia</i> Sp. — 3 из 2-й фракции ГК	Следы	81,0
<i>Bactoderma</i> шт. 34 из гелевых пластин с гуматами	»	87,0
Автотрофы		
<i>Nitrosomonas</i>	2 000 000 [1]	—

нако, как отмечает автор, ни одно из указанных соединений гетеротрофной нитрификации, в том числе нитрит и нитрат, не образуется в значительных количествах. При этом такие соединения, как гидроксилламин и нитрозосоединения, обладают высокой токсичностью и даже в едва уловимых концентрациях могут вызвать гибель других микроорганизмов. Следовательно, гетеротрофная нитрификация в отличие от автотрофной не является энергетическим процессом, а образующиеся высокотоксические вещества имеют в этом случае экологическое значение, что позволяет микроорганизмам выжить в неблагоприятных условиях среды.

Установлено, что отдельные представители рода *Nocardia* способны к гетеротрофной нитрификации [8, 9]. *Nocardia corallina* может окислять оксимы до нитрита, а *Nocardia* Sp. может окислять до нитрита и ароматические оксимы [1].

В литературе имеются данные о способности к гетеротрофной нитрификации и представителей рода *Arthrobacter* [1, 10].

Результаты опытов, поставленных с выделенными нами представителями рода *Nocardia* из разных фракций гумусовых кислот, а также с *Bactoderma rosea* 34 (ВКМ—

№ 1344), также выделенной ранее при разложении гумата натрия, показали (таблица), что все указанные культуры, минерализующие гумусовые вещества, могут принимать участие в процессе гетеротрофной нитрификации. Этим, видимо, объясняется их способность развиваться в столь атипичной среде, какой является культура автотрофной нитрификации.

Таким образом, одни и те же микроорганизмы автохтонной группы при разложении гумусовых веществ образуют продукты жизнедеятельности, стимулирующие развитие бактерий 1-й фазы нитрификации (*Nitrosomonas*), а в неблагоприятных условиях среды, при отсутствии доступных источников углерода, они вызывают гетеротрофную нитрификацию и могут привести к гибели нитрифицирующих бактерий и развиваться, видимо, за их счет.

Нитрификация аммонийного азота, образующегося при разложении гумусовых кислот, в свою очередь, будет способствовать более интенсивной минерализации гумусовых веществ. Последнее было показано в опытах по разложению гумата натрия представителями автохтонной группы при добавлении нитратного или аммонийного азота [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Верстрэте В. Гетеротрофная нитрификация в почвах и в водной среде. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1975, № 4, с. 451—558. — 2. Виноградский С. Н. Микробиология почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1952. — 3. Теппер Е. З. О бактериях автохтонной микрофлоры, разлагающих гумусовые вещества. — Микробиология, 1963, т. XXXII, вып. 4, с. 655—662. — 4. Теппер Е. З. Микроорганизмы рода *Nocardia* и разложение гумуса. М.: Наука, 1976. — 5. Теппер Е. З., Коршунова Г. Ф. Таксономическое положение микроорганизмов группы *Bactoderma* и их роль в почве. — Микробиология, 1973, т. 42, вып. 3, с. 486—492. — 6. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзе-

ва Г. И. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1979. — 7. Ульянова О. М. К экологии *Nitrosomonas*. — Автореф. канд. дис. 1955. — 8. Jensen H. L. — J. Gen. Microbiol., 1951, vol. 5, N 2, p. 360—368. — 9. Lees H., Simson J., Jensen H., Sörgensen H. — Nature, 1954, vol. 173, p. 358—359. — 10. Tate Robert — Applied and Environmental Microbiology, 1977, vol. 33, N 4, p. 911—914. — 11. Tujev N. A., Emtser V. T., Tepper E. Z. — Abstracts of papers soil biology and conservation of the biosphere Gödollo, 26—28 August 1981. Hungari.

Статья поступила 28 мая 1984 г.