

МИКРОБИОЛОГИЯ

Е. И. КВАСНИКОВ, Т. М. КЛЮШНИКОВА, О. А. НЕСТЕРЕНКО,
Е. Н. ПИСАРЧУК, Н. И. ПАВЛЕНКО

**ФИКСАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО АЗОТА МИКРООРГАНИЗМАМИ,
ОКИСЛЯЮЩИМИ УГЛЕВОДОРОДЫ**

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 21 VI 1971)

Азотфиксирующая способность обнаружена у многих свободноживущих бактерий: у некоторых микобактерий, представителей рода *Arthrobacter* и у *Nocardia* (¹⁻⁶). В литературе есть единичные упоминания и об усвоении атмосферного азота представителями отдельных родов бактерий при росте на углеводородах нефти, однако, эти культуры не были идентифицированы и изучены, не была исследована и степень азотфиксации (^{7, 8}).

В наших исследованиях исходным материалом для выделения азотфиксирующих углеводородсдвигающих бактерий служили нефтеносные и ненефтеносные (контроль) почвы Прикарпатья. В них устанавливали содержание исследуемых бактерий при высеве на среды, минеральной осно-

Таблица 1

Содержание олигонитрофильных микроорганизмов, использующих углеводороды, в почвах Бориславской нефтеносной площади. Средние данные шестикратной повторности (млн на 1 г абсолютно сухой почвы)

Дата исследования	Среды			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Почва ненефтеносного района (контроль)				
15 V 1969	1,91±0,4	1,13±0,2	0,17±0,05	0,013±0,002
29 VII	4,5±0,15	2,19±0,1	0,26±0,1	0,1±0,02
8 X	2,9±0,1	1,4±0,05	0,2±0,02	0,1±0,05
Почва нефтеносного района, визуально не пропитанная нефтью				
15 V	2,04±0,1	0,99±0,2	0,84±0,1	0,41±0,04
29 VII	4,46±0,15	2,44±0,04	1,6±0,1	0,62±0,1
8 X	2,8±0,1	1,41±0,05	1,35±0,07	0,59±0,01
Почва нефтеносного района, пропитанная нефтью				
15 V	1,7±0,1	0,73±0,02	0,36±0,04	0,15±0,02
29 VII	3,45±0,0	1,6±0,1	0,78±0,0	0,34±0,04
8 X	2,13±0,05	0,96±0,07	0,48±0,05	0,25±0,02

вой которых были растворы солей (г/л): Na_2HPO_4 0,3, KH_2PO_4 0,2, MgSO_4 0,1, NaMoO_4 0,002. К ним прибавляли следующие компоненты: среда № 1 — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,003, сахара 20,0; среда № 2 — сахара 20,0; среда № 3 — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,003, парафин 10,0; среда № 4 — парафин 10,0. Во всех опытах использовали промышленный парафин (C_{11} — C_{22}) Грозненского нефтеперерабатывающего завода.

Было установлено, что распространение фиксирующих азот и усваивающих углеводороды микроорганизмов в нефтеносных почвах подчиняет-

ся определенным закономерностям (табл. 1). В почвах нефтеносного района, визуально не насыщенных нефтью, содержащих единицы процентов битуминозных веществ и расположенных в районе нефтеносных скважин, данных микроорганизмов находится в несколько раз больше, чем в такого же типа почвах (контроль) ненефтеносного района, в которых количество битуминозных веществ не превышало 0,2%. В почве, визуально очень сильно пропитанной нефтью (десятки процентов битуминозных веществ), их меньше, чем в умеренно пропитанной, но также больше, чем в контрольной. Опыты, проведенные как с почвами Бориславской, так и с почвами Долинской нефтеносных площадей, дали совпадающие результаты.

При высеве образцов изучаемых почв на среды (№ 1 и № 3), содержащие в качестве источника азота 0,003 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ («стартовый азот»), выделяется больше микроорганизмов, растущих за счет следов азота и за счет усвоения молекулярного азота воздуха, чем при посеве на среды (№ 2 и № 4) без его внесения. Аналогичные данные были получены нами и при изучении закономерностей распространения в почвах других групп микроорганизмов, усваивающих углеводороды (*).

Интересно отметить, что во всех опытах при высеве тех же образцов почвы как нефтеносных, так и ненефтеносных районов на среды (№ 1 и № 2), в которых единственным источником углерода была сахароза, заметной разницы между количеством микроорганизмов-азотфиксаторов не было обнаружено.

Выделенные микроорганизмы отнесены нами по определителю Берджи (10) к видам: *Brevibacterium maris*, *Brevibacterium fulvum*, *Arthrobacter simplex*, *Nocardia citrea*, *Nocardia* sp.

Большая часть исследованных штаммов проявляет азотфиксирующую способность при росте на минеральной среде с парафином и «стартовым» азотом. Так, представители рода *Brevibacterium* накапливали от 2,5 до

Т а б л и ц а 2

Азотфиксирующая активность некоторых штаммов
нокардий на среде со «стартовой» дозой азота

Вид	Штамм	Источник углерода в среде	Накопление азота, мг на 100 мл среды
<i>Nocardia aquosa</i>	83	Парафин	Нет роста
	95	»	1,2
	96	»	2,4
	101	»	Нет роста
	83	Натрий уксуснокислый	1,9
	95	То же	0,9
	96	» »	Нет роста
	101	» »	1,5
	68	Парафин	Нет роста
	67	»	4,0
<i>N. rubropertincta</i>	73	»	4,0
	75	»	7,2
	68	Сахароза	5,0
	67	»	6,9
	73	»	2,5
	75	»	7,5
	111	Парафин	Нет роста
	112	»	13,0
<i>N. flava</i>	113	»	13,0
	116	»	10,0
	111	Натрий уксуснокислый	13,2
	112	То же	13,3
	113	» »	12,5
	116	» »	7,7

7,5 мг азота на 100 мл среды, продуктивность азотфиксации на среде с глюкозой у них составляла 1,75–3,50 мг азота на 1 г потребленного углерода. У культур рода *Arthrobacter* прибавка азота составляла 1,75–2,00 мг на 100 мл среды. Существенно, что у ряда коринеподобных бактерий азотфиксирующая способность на средах с углеводородами была выше, чем на средах с углеводами. Отдельные штаммы обладают азотфиксирующей способностью только при использовании углеводородов.

Штаммы *Nocardia citrea* росли на безазотистых средах и на средах со «стартовой» дозой азота. Азотный баланс (определение азота культуральной жидкости, биомассы, внесенного азота) показал, что эти бактерии довольствуются небольшими дозами находящегося в среде азота. Содержание в их клетках азота незначительно, процесс азотфиксации не поддается определению.

Среди большого количества микроорганизмов, изолированных из почв при высеве на азотсодержащие среды по методам Финнерти (¹¹), Ямала (¹²), Бушнелла и Хааса (¹³), нам также удалось выделить штаммы, принадлежащие к коринеподобным бактериям, близким к роду *Arthrobacter* и роду *Nocardia*, обладающие способностью фиксировать атмосферный азот при росте на средах, содержащих в качестве единственного источника энергии углеводороды. При этом среди представителей коринеподобных бактерий обнаружены культуры, дающие на средах с парафином и минимальным азотом прибавку, равную 2,4–7,8 мг на 100 мл среды. Продуктивность азотфиксации на средах с сахарозой колебалась от 0,9 до 4,5 мг азота на 1 г потребленного углевода. Значительной способностью азотфиксации обладали многие штаммы исследованных видов *Nocardia* (табл. 2). Ранее нами было обнаружено это свойство у ряда видов споровых аэробных — типичных термофильных бактерий с оптимумом роста 45–65° (¹⁴).

Существенно подчеркнуть, что некоторые культуры, не растущие на средах с сахарозой без азота, растут на среде с парафином. Это, возможно, объясняется тем, что при росте на безазотных средах они нуждаются в дополнительных ростовых факторах, имеющихся в нефтепродуктах. В то же время отсутствие роста отдельных штаммов на средах с парафином и минимальным содержанием азота вызвано неспособностью окислять углеводороды при недостатке азота.

Обнаружение среди бактерий и нокардий видов, обладающих значительной активностью фиксации азота атмосферы при использовании в качестве единственного источника энергии простейших органических соединений — углеводородов, представляет существенный интерес в эволюционном аспекте. В настоящее время установлено, что углеводороды начали образовываться на нашей планете еще на заре ее развития. Можно предположить, что углеводородусваивающие азотфиксаторы возникли на первых этапах развития мира микроорганизмов.

Институт микробиологии и вирусологии
Академии наук УССР
Киев

Поступило
26 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. А. Калининская, Почвенная и сельскохозяйственная микробиология, Ташкент, 1963, стр. 73. ² Т. А. Калининская, Т. К. Ильина, Тез. Всесоюз. конференции по сельскохоз. и почв. микробиологии, Л., 1963. ³ Н. П. Львов, Докл. ТСХА, 94, 265 (1963). ⁴ М. В. Федоров, Т. А. Калининская, Микробиология, 30, 9 (1961). ⁵ C. Metcalfe, M. E. Brown, J. Gen. Microbiol., 17 (1957). ⁶ B. Smyk, Zbl. Bakteriол., Abt. II, 124, 231 (1970). ⁷ F. Coty, Biotechnol. and Bioengin., 9, 25 (1967). ⁸ M. C. Gay et al., Science Invest., 24, 560 (1969). ⁹ Е. И. Квасников, И. П. Кривицкий, Микробиология, 37 (1968). ¹⁰ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed., Ed. R. S. Breed, 1957. ¹¹ W. R. Finnerty, E. Hawtrey, R. E. Kallio, Zs. allgem. Mikr., 2, 169 (1962). ¹² K. Yamada, J. Takachashi et al., Agr. Biol. Chem., 27, 390 (1963). ¹³ L. Buschnell, H. Haas, J. Bacteriol., 41, 653 (1941). ¹⁴ Е. И. Квасников, А. М. Журавель, Т. М. Ключникова, Микробиология, 40, 3 (1971).