

А. В. Киракосян, Л. Г. Ананян, Ж. С. Мелконян

**Влияние рН среды на азотфиксацию экологических форм
*Azotobacter chroococcum***

Азотфиксирующая способность азотобактера при различной активной кислотности среды изучалась рядом авторов. В своих исследованиях Федоров (1947) приходит к выводу, что при рН 5,0—5,3 азотфиксации не происходит. Предельными значениями, при которых начинается азотфиксация, являются рН от 5,6 до 8,75, оптимальными значениями отмечены рН от 6,98 до 8,04. В дальнейшем Федоров (1952, 1956, 1956а) отмечает, что у трех видов азотфиксаторов (*Az. agile*, *Clostridium pasteurianum* и *Azotomonas fluorescens*) продуктивность азотфиксации остается на одном уровне в пределах рН от 5,59 до 8,5 и не меняется даже при очень щелочной среде (рН 11,29). Таким образом, автор приходит к выводу, что азотфиксация не зависит от реакции окружающей клетку среды. Это обстоятельство он объясняет тем, что азотфиксирующие ферменты тесно связаны с протоплазмой клеток азотфиксирующих микроорганизмов и не реагируют на изменения условий среды.

Блинков (1948, 1951, 1953) установил, что азотобактер может развиваться и фиксировать атмосферный азот при рН от 5,5 до 11,0, но при крайних пределах рН жизнедеятельность азотобактера резко ослабевает. Наилучшими значениями рН для роста и азотфиксации азотобактера автор считает интервал между рН 7,3—8,0. Он находит, что при первоначальном значении рН среды 7,46—7,55 азотобактер не изменяет ее реакцию, если же первоначальная реакция среды сильно щелочная, то подкисляет ее, при этом образуются муравьиная, уксусная и молочная кислоты.

Работнова (1949, 1958) отмечает, что азотобактер изменяет реакцию среды и, несмотря на наличие в среде фосфат-

ных буферных растворов, может сдвигать рН. Поэтому автор предлагает обращать внимание на ранние стадии развития культуры для установления оптимальных значений рН для роста и ассимилирующей способности азотобактера.

Работнова находит также, что размножение и азотфиксирующая способность азотобактера—два разных процесса, не всегда связанные между собой.

Цель настоящей работы заключалась в выявлении адаптивных свойств культур азотобактера в процессе ассимиляции азота при различных значениях рН среды. Исследуемые штаммы азотобактера были выделены из разных типов почв Армении с различным значением рН.

Исследовано 12 штаммов *Az. chroococcum*, выделенных из бурых, каштановых почв и черноземов АрмССР, и двух типов почв Ленкоранского района АзССР.

Азотассимилирующая способность культур азотобактера изучалась в жидкой среде Виноградского с исключением K_2HPO_4 и $CaCO_3$. Взамен мела взят $CaCl_2$ —0,01 %, а вместо K_2HPO_4 —растворы фосфатных буферов, состоящие из смеси KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 (Белозерский и Проскуряков, 1951). Питательная среда готовилась таким образом, что компоненты среды имели обычную концентрацию, компоненты буферных растворов—половину своей концентрации. Опыт закладывался в 300-миллиметровых колбах Эрленмейера с 50 мл среды с содержанием 1 г сахарозы. В каждую колбу вносилось по 1 мл суспензии двухсуточных культур азотобактера. Азот определялся методом Кьельдаля. Продолжительность опыта—12 суток при температуре 27—28°C.

В табл. 1 представлены исследуемые культуры. Все культуры азотобактера предварительно были испытаны на их азотассимилирующую способность в обычной жидкой среде Виноградского и в прокаленном кварцевом песке с добавлением питательной среды. Результаты приведены в табл. 2 (среднее двух повторностей).

Приведенные данные показывают, что все штаммы ассимилируют азот атмосферы в основном в пределах 8—12 мг азота на 1 г сахарозы,

Ассимиляция азота штаммами азотобактера, выделенными из бурых культурно-поливных почв с рН 7,6—8,1, приведена в табл. 3. Ввиду того, что ассимилированный азот и значения рН среды в параллельных колбах были одинаковы или близки, во всех таблицах представлены средние данные двух повторностей. Для сравнения приведены также средние данные по ассимиляции азота на среде Виноградского без буферных смесей.

Из табл. 3 видно, что ассимиляция азота в забуференных средах протекает в узких пределах рН. Предельные значения рН среды для ассимиляции азота у отдельных штаммов азотобактера различны.

Следует также отметить отсутствие резко выраженной адаптации в отношении реакции среды у культур азотобактера при процессе ассимиляции азота.

Таблица 1

Исследованные культуры азотобактера

Место выделения и названия штаммов	Год выделения	Тип почвы	рН почвы
Октемберян 16 ₁	1956	Бурая	7,66
Октемберян 18		"	7,63
Арташат 5	1959	"	8,10
Арташат 6		"	7,79
Аштарак 8	1956	Каштановая	6,28
Аштарак 11 ₂	"	"	7,49
Гукасян 19 ₁	"	Выщелоченный чернозем	6,53
Гукасян 13		"	6,24
Калинино, пашня	1959	"	5,28
Апаран 28	1956	Чернозем	7,20
АзССР, Ленкорань 4 ₂	1958	Желтозем	4,91
Ленкорань 7 ₃	"	Темно-коричневая, выщелоченная	6,21

Так, например, штамм Арташат 5, выделенный из бурой почвы с рН 8,1, на питательной среде с рН 7,7, связывает незначительное количество азота—1,19 мг. То же самое наблюдается и у остальных штаммов азотобактера из тех же почв.

Из данных табл. 4 видно, что штаммы Аштарак 8 и Аштарак 11₂, выделенные из каштановых почв с более низким значением рН в обычной безбуферной среде Виноградского,

Таблица 2

Азотфиксирующая способность штаммов азотобактера
(количество связанного азота в мг на 1 г сахара)

Штаммы азотобактера	Кварце- вый пе- сок	Среда Вино- градского	Штаммы азотобактера	Кварце- вый пе- сок	Среда Вино- градского
Октемберян 16 ₁	8,47	9,88	Гукасян 19 ₁	10,22	10,78
Октемберян 18	8,61	12,46	Гукасян 13	8,40	8,58
Арташат 5	10,43	9,17	Калинино	7,21	4,85
Арташат 6	8,47	9,87	Апаран 28	10,22	3,57
Аштарак 8	10,36	11,41	Ленкорань 4 ₂	8,89	12,64
Аштарак 11 ₂	9,31	11,76	Ленкорань 7 ₂	8,11	—

Таблица 3

Ассимиляция азота штаммами азотобактера, выделенными из бурых почв
(количество связанного азота в мг на 1 г сахара)

Октемберян 16 ₁			Октемберян 18			Арташат 5			Арташат 6		
рН опыта		Связанный азот	рН опыта		Связанный азот	рН опыта		Связанный азот	рН опыта		Связанный азот
в нача- ле	в конце		в нача- ле	в конце		в нача- ле	в конце		в нача- ле	в конце	
4,40	5,07	0,35	4,99	4,90	0,14	5,26	4,87	0,28	4,97	5,18	0
1,61	5,15	0,49	5,28	5,47	0,35	5,54	4,79	0,28	5,28	5,48	0
1,80	5,59	0,28	5,52	5,15	0,70	5,69	5,24	0,56	5,52	5,86	6,86
5,09	5,63	0,42	6,02	6,12	1,68	6,34	6,36	1,26	6,02	6,28	6,16
5,61	6,31	11,48	6,73	6,61	1,16	6,72	6,70	11,62	6,73	6,65	6,16
6,27	6,82	10,64	7,59	7,14	0,28	7,22	7,26	13,09	7,59	6,76	2,10
7,15	7,22	12,25	7,89	7,50	0	7,70	7,12	1,19	7,89	7,26	0,51
7,90	7,86	0,49	8,43	7,35	0,28	7,79	7,38	0,56	8,43	7,73	0,98
8,10	8,00	0,49	8,59	7,94	0,14	8,01	7,74	0,84	8,59	8,46	0,14
			В						В		
8,70	8,25	0,49	8,51	7,64	12,46	8,88	8,26	0,28	8,51	7,43	9,87
В*	—	9,88				В	7,12	9,17			
8,51						8,07					

* В данной и следующих таблицах В означает — обычная среда Виноградского.

связывают примерно по 11 мг азота. В забуференных же средах первый штамм почти не связывал азот, второй связывал лишь 5,39 мг. В этом случае приспособительные свойства азотобактера к условиям pH среды также не выявлены.

Азотфиксирующая способность штаммов азотобактера, выделенных из черноземных почв, приведена в табл. 5. Как видно из данных таблицы, только один штамм—Гукасян 19д—связывал азот (в пределах pH 6,72—7,70), остальные же штаммы, по-видимому, не приспособились к условиям буферной среды и почти не связали азота.

Данные относительно связывания азота (табл. 6) штаммами азотобактера из кислых почв Ленкоранского района АзССР свидетельствуют о том, что одна культура (Ленкорань 4₂) в питательной среде с pH 5,61 и 6,27 интенсивно ассимилировала атмосферный азот, вторая же культура при тех же значениях pH связала ничтожное количество азота.

В настоящем опыте культуры азотобактера начинали ассимилировать азот при pH от 5,5 до pH 7,2 и лишь в единичных случаях процесс ассимиляции азота протекал при pH 7,7.

Таблица 4

Ассимиляция азота штаммами азотобактера, выделенными из каштановых почв

(количество связанного азота в мг на 1 г сахара)

Аштарак 5			Аштарак 11,		
pH опыта		Связанный азот	pH опыта		Связанный азот
в начале	в конце		в начале	в конце	
5,26	4,78	0,42	5,26	4,66	0,35
5,54	4,95	0,56	5,54	5,05	0,28
5,69	5,29	0,28	5,69	5,37	0,42
6,34	5,90	0,63	6,34	5,92	1,12
6,72	6,00	0,56	6,72	5,92	5,39
7,22	6,40	1,33	7,22	6,34	2,73
7,70	6,73	0,28	7,70	7,34	0,56
7,79	7,24	0,77	7,79	7,71	0,28
8,01	7,70	0,56	8,01	7,90	0,84
8,88	7,86	0,21	8,88	7,95	0,56
B			B		
8,07	6,68	11,41	8,07	6,87	11,76

Результаты нашего опыта по ассимиляции азота азотобактером в кислых средах подтверждают литературные данные, т. е., что этот процесс начинается только от рН 5,5. Что ка-

Таблица 5

Ассимиляция азота штаммами азотобактера, выделенными из черноземов АрмССР

(количество связанного азота в мг на 1 г сахара)

Гукасян 19 ₁			Гукасян 13			Калинино			Апаран 28		
рН опыта		Связанный азот	рН опыта		Связанный азот	рН опыта		Связанный азот	рН опыта		Связанный азот
в начале	в конце		в начале	в конце		в начале	в конце		в начале	в конце	
5,26	5,00	0,14	4,99	4,89	0,49	4,99	4,87	0,14	5,26	5,01	0,35
5,54	5,06	0,42	5,28	5,52	0,14	5,28	5,50	0,14	5,54	4,83	0,35
5,69	5,40	0,28	5,52	5,79	0,77	5,52	5,29	0,84	5,69	5,27	0,28
6,34	5,45	0,98	6,02	6,28	1,80	6,02	5,94	1,96	6,34	5,94	0,63
6,72	6,06	8,54	6,73	6,68	1,96	6,73	6,33	1,12	6,72	5,76	0,84
7,22	5,93	11,21	7,59	6,66	0,35	7,59	7,15	0,28	7,22	6,14	0,42
7,70	5,94	9,03	7,89	7,66	0	7,89	7,67	0,28	7,70	7,20	0,84
7,79	7,15	0,28	8,43	8,00	0	8,43	8,01	0	7,79	7,66	0,70
8,01	7,73	0,42	8,59	7,97	0,28	8,59	8,00	0,14	8,01	7,87	0,14
			В			В					
8,89	7,92	0,35	8,51	7,07	8,58	8,51	6,30	4,85	8,89	7,90	0,56
В									В		
8,07	6,26	10,73							8,07	6,00	3,57

сается щелочных буферных сред, то азотобактер в данном опыте при значениях рН выше 7,7 совершенно не ассимилировал азот. Тогда как данные литературы утверждают о том, что азотобактер ассимилирует азот даже при значениях рН 9—10 и выше. Это расхождение, вероятно, можно объяснить тем, что нами приводятся количества фактически связанного азота без пересчета его на 1 г сахара.

Несмотря на присутствие в средах буферных смесей, азотобактер сдвигал значение рН. На это обстоятельство указывали также Работнова и Блинков.

Для установления прямой зависимости между размножением культур азотобактера и их ассимилирующей способностью были микроскопированы к концу опыта окрашенные

Таблица 6

Ассимиляция азота штаммами азотобактера, выделенными из почв
Ленкоранского района

(количество связанного азота в мг на 1 г сахара)

Ленкорань 4 ₂			Ленкорань 7 ₃		
pH опыта		Связанный азот	pH опыта		Связанный азот
в начале	в конце		в начале	в конце	
4,40	4,97	0,56	4,40	5,05	0,21
4,61	5,17	0,42	4,61	5,18	0,21
4,80	5,43	0,14	4,80	5,51	0,14
5,09	5,71	0,21	5,09	5,83	0,49
5,61	6,34	10,29	5,61	6,06	1,33
6,27	6,86	11,97	6,27	6,80	1,47
7,15	7,20	0,14	7,15	7,30	0,84
7,90	7,85	0,42	7,90	8,02	0,42
8,10	8,00	0,49	8,10	7,90	0,35
8,70	7,25	0,49	8,70	8,16	0,42
В					
8,51	—	12,67	В кварцевом песке	—	8,11

препараты азотобактера, приготовленные из колб по ассимиляции азота. Наблюдения показали, что в ряде случаев, когда не было ассимиляции азота, в среде обнаруживалось довольно большое количество гомогенных и ячеистых клеток азотобактера. Так, например, у штамма Аштарак 8 в средах, имеющих pH от 6,3 до 7,8, содержались в значительном или даже большом количестве гомогенные и ячеистые клетки. То же можно было видеть у штамма Апаран 28 и штамма Ленкорань 7₃. Эти же штаммы ассимилировали всего до 1 мг азота. Надо полагать, что интенсивность размножения азотобактера не всегда сопряжена с процессом ассимиляции азота. Культура может размножаться, но не связывать азот. В своих исследованиях Работнова приходит к такому же выводу.

В исследованиях прошлых лет нами (1961) было установлено, что культуры азотобактера, выделенные из различных экологических условий, приспособлены к определенным условиям кислотности среды, соответственно условиям места их обитания. Опыты же по ассимиляции азота азотобакте-

ром такой приспособленности не выявили, как было показано данными вышеприведенных исследований.

Выводы

Азотобактеры, выделенные из почв с разным значением рН, в средах с буферными смесями ассимилировали азот при рН от 5,5 до 7,2 и только в единичных случаях при рН 7,7. Несмотря на присутствие буферных смесей, азотобактер смешивает значение рН среды, создавая более оптимальные условия для роста и жизнедеятельности.

Однако, изучая процесс ассимиляции азота экологическими формами азотобактера, нам не удалось выявить их способности к адаптации в отношении реакции среды.

Ա. Վ. ԿԻՐԱԿՈՍՅԱՆ, Լ. Գ. ԱՆԱՆՅԱՆ, Ժ. Ս. ՄԵԼԿՈՆՅԱՆ

ՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ՐԻ-Ի ԱԶՂԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ AZOTOBACTER
CHROOCOCCUM-Ի ԷՎՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՁԵՎԵՐԻ
ՍՈՒԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Աշխատության նպատակն է եղել՝ պարզել ազոտորակտերների ադապտացիոն ունակությունը դեպի միջավայրի ՐԻ-ը ազոտասիմիլյացիայի պրոցեսի նկատմամբ: Այս ուսումնասիրության համար ազոտորակտերները մեկուսացված են հղել տարրեր ՐԻ ունեցող հողերից:

Սննդամիջավայրի տարբեր ՐԻ-ը ստեղծվել է ֆոսֆորային բուֆերների օժանդակությամբ:

Ստացված արդյունքների հիման վրա կարելի է անել հետևյալ եզրակացություններ՝

1. Հետազոտված ազոտորակտերները շտամները սույն փորձի ազոտասիմիլյացիայի պրոցեսի պայմաններում ադապտացիոն ունակություն չեն հայտնաբերել սննդամիջավայրի ՐԻ-ի նկատմամբ:

2. Ֆոսֆորային բուֆերներով պատրաստված սննդամիջավայրում ազոտասիմիլյացիայի պրոցեսն ընթանում է ՐԻ 5,5 միջև

7,2-ի սահմաններում, հազվագյուտ դեպքում pH 7,7-ի, ժամանակ: Այդ պայմաններում կապվել է 1-ից մինչև 13 մգ ատմոսֆերային ազոտ վերցրած 1 գ շաքարին:

Վինոգրադակու սովորական սննդամիջավայրում, առանց բուֆերների, բոլոր հետազոտվող ազոտոբակտերների ասիմիլացիայի ինտենսիվությունը բարձր է եղել և հիմնականում կապվել է 8-ից մինչև 12 մգ ազոտ:

3. Ուսումնասիրված ազոտոբակտերները հաճախ սննդամիջավայրի ակտիվ ռեակցիան հարմարեցնում են իրենց պահանջներին և ստեղծված բարենպաստ պայմաններում ինտենսիվ կապում օդի ազոտը:

A. V. Kirakossian, L. G. Ananian, G. S. Melkonian

The effect of pH media on nitrogen fixation of some ecological forms of *Azotobacter chroococcum*

Summary

Azotobacter isolated from various ecological conditions do not adapt themselves to different degrees of pH. In their vital process assimilation takes place mainly in the limits of $\text{pH}=5.5-7.2$ and from the oxidation of 1 gram sugar 1—13 mg of nitrogen is accumulated.

The pH of buffered cultural medium of *azotobacter* often undergoes a considerable change.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белозерский А. Н. и Проскуряков Н. И. Практическое руководство по биохимии растений, 1951.
2. Блинков Г. Н. Влияние реакции среды на интенсивность азотфиксации и рост азотобактера. «Микробиология», 1948, т. XVII, в. 1, стр. 49.
3. Блинков Г. Н. Рост азотобактера и азотфиксация в условиях кислой и щелочной среды. «Микробиология», 1951, т. XX, в. 4, стр. 330.
4. Блинков Г. Н. Органические кислоты как продукты углеводного обмена азотобактера. «Микробиология», 1953, т. XXII, в. 1, стр. 49.
5. Киракосян А. В., Мелконян Ж. С., Ананян Л. Г. Влияние активной кислотности среды на развитие экологических форм *Az. chroococcum*. «Вопросы микробиологии», 1962, в. 11 (XII).

6. Работнова И., Кондратьева Е., Нетте И. и Аронес С. Фиксация азота атмосферы азотобактером при различных условиях аэрации. «Микробиология», 1949, т. XVIII, в. 6, стр. 509.
7. Работнова И. Л. Роль физико-химических условий (рН и γH_2) в жизнедеятельности микроорганизмов. Изд. АН СССР, 1957.
8. Работнова И. Л. Об активном изменении микроорганизмами условий среды в соответствии со своими потребностями. Труды Института микробиологии АН СССР, 1958, в. V, стр. 80.
9. Федоров М. В. Влияние среды на усвоение атмосферного азота азотобактером. «Советская агрономия», 1947, № 5, стр. 40.
10. Федоров М. В. Биологическая фиксация азота атмосферы, Сельхозгиз, 1952.
11. Федоров М. В. и Калининская Т. А. Продуктивность фиксации азота атмосферы *Azotomonas fluorescens* на разных источниках углерода и в разные периоды развития культуры. «Микробиология» 1956, т. XXV, в. 2, стр. 175.
12. Федоров М. В. и Калининская Т. А. Влияние различных факторов внешней среды на азотфиксирующую активность *Azotomonas fluorescens*. «Микробиология»; 1956а, т. XXV, в. 6, стр. 690.