

О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ АЗОТОБАКТЕРА АЦЕТИЛЕНОВЫМ МЕТОДОМ

В. Г. НИКОГОСЯН

Определялась нитрогеназная активность *Az. chroococcum* ацетиленовым методом, связанная с условиями и продолжительностью развития.

Показано, что наивысшая нитрогеназная активность у азотобактера, выращенного на среде Виноградского, проявляется в ранней логарифмической фазе. При длительном культивировании в газовой атмосфере она частично обусловлена наличием определенных количеств этилена в среде.

Ключевые слова: азотобактер, нитрогеназная активность.

В настоящее время для определения активности азотфиксации широко применяется ацетиленовый метод, теоретические основы и возможность применения которого для определения активности азотфиксации разными объектами представлены в ряде работ [1—5, 7, 12, 14—16]. Для определения азотфиксирующей активности указанным методом культуры инкубируются в присутствии ацетилена на жидкой или твердой питательной средах в герметически закрытых сосудах и периодически устанавливается количество образовавшегося этилена [6, 7, 10]. В ряде случаев ацетилен вводится в определенные периоды развития культуры [8].

Одновременно отметим, что в настоящее время у аэробных бактерий все еще недостаточно исследованы динамика нитрогеназной активности в процессе их развития, а также влияние на нее различных газов и густоты посева.

В настоящей работе мы задались целью исследовать влияние указанных факторов на нитрогеназную активность азотобактера, определяемую ацетиленовым методом.

Материал и методика. Исследования проводились на полученных нами стрептомициноустойчивых (С-5, С-6, С-20) и тетрациклинустойчивых (Т-3, Т-6, Т-16) мутантах и на исходном штамме *Az. chroococcum* 53 (НИИ сельхоз. микробиология, К-1).

Культуры выращивались при 27° на агаризованной среде Виноградского (3 мл) в 15 мл пенициллиновых флаконах. В определенный период развития воздух во флаконах заменялся смесью газов, состоящей из аргона (70), кислорода (20) и ацетилена (10%). В отдельных опытах за счет уменьшения количества аргона и кислорода в газовую смесь вводили этилен (1—8%).

Для исследования нитрогеназной активности в процессе роста культуры выращивались в 6-ти флаконах в течение 4, 24, 48, 72, 96 и 168 ч. По истечении этих сроков во

флаконы вводилась смесь газов, и после одночасовой инкубации определялась активность фермента. Количество образовавшегося этилена определяли в 0,5 мл образца смеси газов на газовом хроматографе «цвет» модели 4—67 с пламенноионизационным детектором. В колонке (60 см×0,3 см)—окись алюминия, обработанная щелочью при 50°. Температура испарителя 85°. Скорость газ-носителя (гелий) 40 мл/мин. Активность нитрогеназы выражали по восстановленному ацетилену (мкмоль/час) [9].

В качестве контроля служили флаконы с питательной средой и соответствующей смесью газов.

Результаты и обсуждение. Исследования динамики нитрогеназной активности азотобактера показали, что нитрогеназная активность проявляется спустя четыре часа после инокуляции и достигает максимума на 2—3-й день. Далее начинается быстрый спад активности фермента (табл. 1).

Таблица 1
Динамика нитрогеназной активности *Az. chroococcum* в процессе развития.
мкмоль C_2H_2 /час

Культуры	Возраст культуры, ч					
	4	24	48	72	96	168
С—20	0,10	0,90	1,65	2,55	1,10	0,40
С—6	0,25	1,80	1,75	1,30	1,20	0,45
С—5	0,15	1,42	1,35	1,90	1,35	0,50
Т—6	0,10	1,15	1,05	1,55	0,40	0,15
Т—16	0,23	0,60	1,75	2,10	1,00	0,27
Г—3	0,27	0,93	1,50	1,35	1,25	0,17
К—1	0,40	2,20	2,45	2,40	0,90	0,10

Опыты показали, что между нитрогеназной активностью, титром живых клеток и биомассой азотобактера нет коррелятивной зависимости (рис. 1).

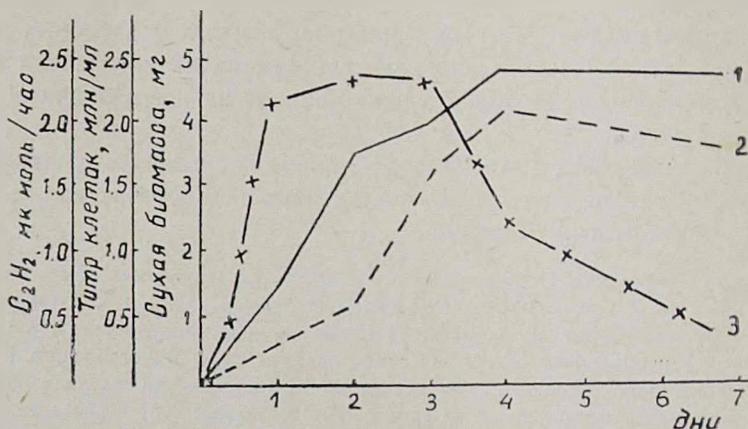


Рис. 1. Динамика накопления биомассы, титра живых клеток и нитрогеназной активности *Az. chroococcum* (К-1) в процессе развития. 1— сухой вес биомассы, 2— титр живых клеток, 3— нитрогеназная активность.

Азотфиксирующая активность достигает максимума в ранней логарифмической фазе роста культуры и в дальнейшем, с увеличением количества биомассы, клетки азотобактера значительно теряют нитрогеназную активность.

Интересно было выяснить и динамику нитрогеназной активности азотобактера в процессе длительного развития в газовой смеси. Проведенные нами исследования показали, что в присутствии ацетилена и других газов нитрогеназная активность растет, достигая максимума в 24-часовой культуре (рис. 2). При дальнейшем развитии в этих усло-

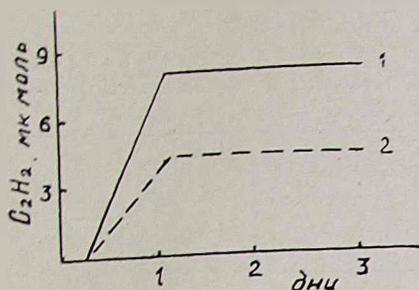


Рис. 2. Нитрогеназная активность *Az. chroococcum* при длительном развитии в газовой атмосфере. 1 К; 2—С-20

виях восстановления ацетилена не наблюдается, хотя предыдущими опытами (табл. 1) было показано, что у азотобактера наивысшая нитрогеназная активность обнаруживается на 2—3-й день. Вероятно, это можно объяснить отсутствием необходимого количества азота (N_2) для роста азотобактера, а также отрицательным воздействием смеси газов на нормальное развитие культуры.

В литературе имеются указания на то, что ацетилен ингибирует развитие микроорганизмов и, следовательно, в аналогичных экспериментах следует избегать сравнительно высоких концентраций ацетилена в газовой смеси [10]. Одновременно известно, что в ряде случаев продукты ферментативной реакции способны подавлять активность данного фермента.

В связи с этим было интересно выяснить влияние различных доз этилена на активность ферментного комплекса.

Нами выявлено, что незначительные концентрации этилена (1%), введенного в газовую среду, отрицательно действуют на нитрогеназную активность азотобактера (табл. 2).

Таблица 2
Влияние этилена на нитрогеназную активность *Az. chroococcum* в процессе развития.

Количество этилена, %	Количество восстановленного ацетилена, мкмоль, спустя	
	3 ч	24 ч
Контроль (без этилена)	6,10	13,10
1	6,10	10,50
2	5,15	6,80
4	3,30	5,00
8	2,80	3,00

При определении нитрогеназной активности ацетиленовым методом культуру обычно сеют густым штрихом [1].

В задачу наших исследований входило также выяснение оптимального периода для определения активности фермента в зависимости от количества посевного материала.

Исследования показали, что при внесении большого количества посевного материала, активность нитрогеназы выше у однодневных культур, а при внесении незначительного количества—у трех-, четырехдневных. Очевидно также, что независимо от количества посевного материала нитрогеназная активность на вторые сутки почти выравнивается (табл. 3).

Таблица 3
Зависимость нитрогеназной активности *Az. chroococcum* от количества посевного материала, мкмоль $C_2H_2/час$

Густота посева	Возраст культуры, ч				
	2	24	48	72	96
Густой штрих	0,95	2,50	2,50	1,20	0,60
Умеренный штрих	0,45	1,75	2,80	1,45	0,80
Средний штрих	0,28	2,15	2,65	1,35	0,80
Слабый штрих	0,18	0,80	1,80	2,65	2,35
Незначительный штрих	0,15	1,05	2,55	2,90	1,80

Таким образом, проведенные исследования показывают, что нитрогеназная активность *Az. chroococcum* на среде Виноградского характеризуется одновершинной кривой, максимум которой совпадает с ранней логарифмической фазой и не коррелирует с ростом биомассы и титром живых клеток. Уровень азотфиксирующей активности в значительной степени зависит от продолжительности инкубации культуры в газовой атмосфере, содержащей различное количество этилена. Определение нитрогеназной активности на среде Виноградского ацетиленовым методом целесообразно проводить на второй день роста культуры, сокращая время инкубации в газовой смеси.

Отметим также, что при исследовании нитрогеназной активности азотобактера, выращенного на других питательных средах указанным методом, следует учитывать особенности развития культуры и динамику активности фермента.

Институт микробиологии
АН Армянской ССР

Поступило 18. XII. 1980 г.

ԱՅԵՏԻԼԵՆԱՅԻՆ ԵԴԱՆԱԿՈՎ ԱՋՈՏՈՐԲԱՅՆՐԻ
ՆԻՏՐՈԳԵՆԱՋԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Վ. Գ. ՆԿՈՂՈՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են ացետիլենային եղանակով *Az. chroococcum*-ի նիտրոգենազային ակտիվության որոշման մի շարք հարցեր՝ կապված կուլտուրայի զարգացման տեղումային և սլայմանների հետ:

Պարզվել է, որ Վինոգրադսկու սննդամիջավայրում զարգանալիս աշոտարակտերի նիտրոգենազային ակտիվությունը մեծ է վաղ լոգարիթմական ֆազայում:

Այդտիպի նյարունակող միջավայրում, երկարատև զարգացման ընթացքում, *Az. chroococcum*-ի նիտրոգենազային ակտիվությունը մասամբ պայմանավորված է նաև զազային մթնոլորտում առկա էթիլենի քանակությամբ:

ON SOME PECULIARITIES OF DETERMINATION OF NITROGENASE ACTIVITY OF AZOTOBACTER BY ACETYLENOUS METHOD

V. G. NIKOGHOSIAN

Some questions on determination of nitrogenase activity of *Az. chroococcum* by acetylenous method connected with conditions and duration of development have been studied. It has been shown that the highest nitrogenase activity in azotobacter, grown on a medium of Vinogradski is displayed at early logarithmic phase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гочелашвили З. А. Микробиология, 47, 5, 1979.
2. Егоров В. И. Микробиология, 48, 3, 1979.
3. Зубко И. К., Чундерова А. И., Тациев С. С. Гр. конф. Микробиолог. процессы в почвах и урожай с.-х. культур, Каунас, 1978.
4. Зубко И. К., Серегин М. С., Чундерова А. И., Тациев С. С. Микробиология, 48, 1, 1979.
5. Калининская Т. А., РАО В. Р., Волкова Т. Н., Ипполитов Л. Т. Микробиология, 42, 3, 1973.
6. Конопков Ф. П., Умаров М. М., Мирчинк Т. Г. Микробиология, 48, 4, 1979.
7. Метод. рекоменд. по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценке их эффективности. Л., 1979.
8. Назина Т. Н., Розанова Е. П., Калининская Т. А. Микробиология, 48, 1, 1979.
9. Парийская А. И., Калининская Т. А. Микробиология, 46, 1, 1977.
10. Умаров М. М. Почвоведение, 11, 1976.
11. Феодоров М. В. Биолог. фиксация азота атмосферы, М., 1952.
12. Феодоров Р. И., Милехина Е. И., Ильюхина Н. И., Брелиников В. В. Изв. АН СССР, сер. биол., 1, 1973.
13. Bulen W. A., Le Comte J. R., Bales H. E. J. Bacteriol., 85, 3, 1963.
14. Campbell N. E. R., Evans H. J. Canadian J. Microbiol., 15, 1342, 1969.
15. Hardy R. W., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. Plant Physiol., 43, 1185, 1968.
6. Hardy R. W., Burns R. C., Holsten R. D. Soil. Biol. and Biochem., 5, 47, 1973.