

ПРОВ 2010

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР

ИССЛЕДОВАНИЯ П Л А Н К Т О Н А ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО М О Р Е Й

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ
МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

СЕРИЯ «БИОЛОГИЯ МОРЯ»

Институт биологии
южных морей АН УССР

ВИЗНАЧКА

17436



НАУКОВА
ДУМКА

КИЕВ—1965

ВИДОВОЙ СОСТАВ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДЕ ЧЕРНОГО МОРЯ

Разработка проблемы биологической продуктивности водоемов требует изучения систематического состава и количественного развития организмов, его населяющих. В связи с этим особый интерес представляет микробная флора различных физиологических групп и в частности азотфиксирующие бактерии. Однако исследования по их видовому составу и количественному распределению в морях единичны. Они относятся в основном к илам и прибрежным водам. Водная толща глубоководных районов морей и океанов почти не затронута такими исследованиями. Изучение азотфиксирующих микроорганизмов Черного моря ведется также относительно недавно. О видовом составе и распространении азотобактера и *Clostridium* в воде прибрежной полосы западной части Черного моря сообщает М. Зарма (Zarma, 1957, 1960). В предыдущих сообщениях (Пшенин, 1959а, б) мы пытались охарактеризовать количественное распределение азотобактера и *Clostridium* в районе «Филлофорного поля Зернова» и в грунтах прибрежных районов Черного моря. Нами изучалось также распределение азотобактера в открытом море (Pshenin, 1963), связь его с количественным распределением фитопланктона (Пшенин, 1961) и специфическими условиями жизни в приповерхностном слое воды (Пшенин, 1964).

В настоящей работе приводятся новые данные о видовом составе азотфиксирующих микроорганизмов и о количественном распределении азотфиксирующих бактерий из родов *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* и *Spirillum* в воде глубоководных, прибрежных и мелководных областей, в том числе в районе Филлофорного поля Черного моря.

Наблюдения были проведены на 31 станции. Из них 15 станций расположено по глубоководным разрезам: Евпатория—Босфор (февраль 1956) и Ялта—Батуми (август 1956), а 16 станций — в мелководных районах и на прибрежных участках в разные месяцы (рисунок). В кислородной зоне Черного моря (в районе Филлофорного поля, на прибрежных участках и из приповерхностного слоя глубоководных районов, кроме разреза Евпатория—Босфор) пробы воды отбирались стерильными склянками (Родина, 1950) и стерильными стаканами (Пшенин, 1964). В глубоководных районах с глубины 10—2000 м пробы воды брались батометрами Нансена. Из кислородной зоны (0—150 м) было взято 133 пробы, в том числе 46 (35%) проб, отобранных склянками. Водой скляночных проб было произведено 428 (44,2%) посевов, а батометрических — 540 (55,8%). Из сероводородной зоны (200—2000 м) было отобрано батометрами Нансена 36 проб, которыми сделано 275 посевов. Для аэробов использовалась жидкая безазотистая среда Федорова с маннитом, для анаэробов — глюкозная среда Виноградского, содержащие 50% морской воды (с учетом испарения при инкубации в течение двух—шести месяцев) и микроэлементы по

М. В. Федорову (1951). Среда засеивалась водой в количестве 100, 10, 1 и 0,1 мл из каждой пробы, причем 100 и 10 мл — при помощи мембранных фильтров № 3. Количество бактерий определялось методом титров (Драчев и др., 1953). При этом посевы морской воды многократно (3—10 раз) микроскопировались через разные интервалы времени от момента посева.

Микроскопирование посевов, сделанных в среду для азотобактера, показало, что из 160 проб воды в 122 был встречен *Azotobacter* и в 148 пробах — *Pseudomonas*, *Vibrio* и *Spirillum*. Псевдомонасы с вибрионами количественно преобладали над азотобактером как в естественных условиях (судя по данным метода титров), так и в селективной

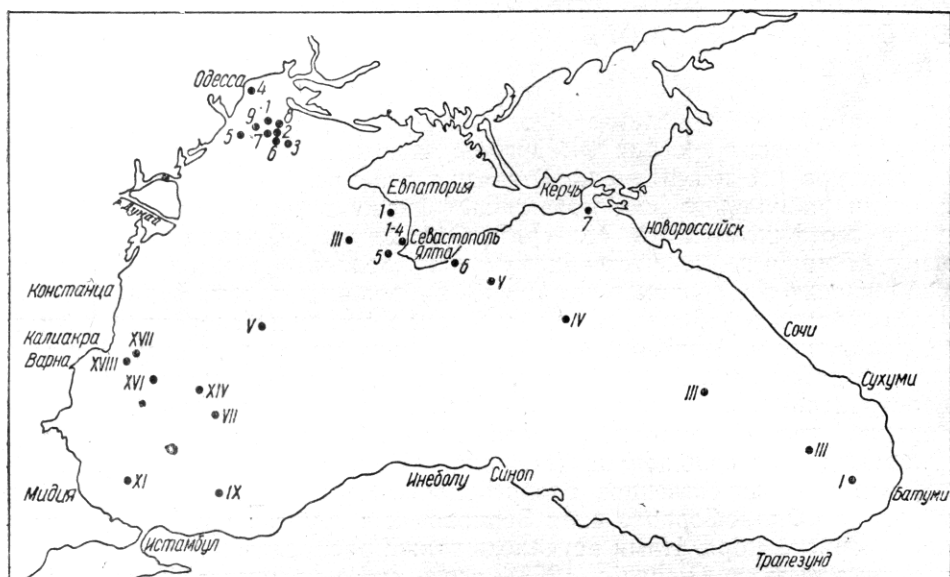


Схема расположения станций.

среде, засеянной морской водой (результаты микроскопирования посевов). В посевах из 83 проб воды наблюдались полиморфные и гипертрофированные клетки азотобактера часто с признаками распада оболочки и протопласта. В то же время в этих же самых посевах *Pseudomonas*, *Vibrio* и *Spirillum* имели нормальный вид, причем они выделялись из морской воды в культуру гораздо легче, чем *Azotobacter* и *Clostridium*. В питательных средах некоторые клетки спироилл могут укорачиваться до размеров вибрионов, а вибрионы — выпрямляться и походить на палочки псевдомонасов (явления, известные как из наших наблюдений, так и из литературы), вследствие чего, когда все три формы присутствуют в одном и том же посеве, их бывает трудно дифференцировать. Поэтому в табл. 2 приводятся суммарные количества азотфиксирующих псевдомонасов, вибрионов и спироилл.

В табл. 1 указано количество штаммов азотфиксирующих микробов, выделенных из морской воды в различных районах Черного моря. Всего был выделен на безазотистых средах 371 штамм перечисленных микроорганизмов, из которых 166 — из скляночных проб и 205 штаммов — из батометрических. При этом количество штаммов *Clostridium*, *Vibrio* и *Spirillum*, выделенных из скляночных проб воды, превышало количество штаммов этих бактерий из батометрических проб. Оба штамма *Treponeta* были выделены из воды, отобранной стерильными склянками. Следует отметить, что из скляночных и батометрических проб морской воды часто выделялись одинаковые формы микроорга-

Таблица 1

Количество штаммов азотфиксирующих микроорганизмов, выделенных из воды Черного моря

Организмы	Общее количество штаммов	Из них число штаммов, выделенных из проб воды, отобранных		Организмы	Общее количество штаммов	Из них число штаммов, выделенных из проб воды, отобранных	
		стерилизованными склянками	батометрами типа Нансена			стерилизованными склянками	батометрами типа Нансена
<i>Azotobacter</i> .	114	42	72	<i>Treponema</i> . .	2	2	0
<i>Clostridium</i> .	19	16	3	<i>Torulopsis</i> . .	18	4	14
<i>Pseudomonas</i> .	79	29	50	<i>Rhodotorula</i> .	15	4	11
<i>Vibrio</i>	86	44	42				
<i>Spirillum</i> . .	38	25	13	Итого:	371	166	205

низмов. При этом микробный состав в упомянутых безазотистых средах, засеваемых скляночными пробами воды, был в общем богаче, чем состав микроорганизмов, наблюдаемый в этих же средах, засеваемых батометрическими пробами воды. Необходимо также подчеркнуть, что все формы азотфиксирующих микроорганизмов, выделенные нами из батометрических проб морской воды и упомянутые в этой статье, имели своих аналогов среди микроорганизмов, выделенных из скляночных проб воды.

Для идентификации выделенных микроорганизмов (кроме дрожжей) использовался определитель Н. А. Красильникова (1949). Дополнительными пособиями служили определитель Берджи (Bergey etc., 1948, 1957). Кроме того, для идентификации морских видов *Pseudomonas*, *Vibrio* и *Spirillum* использовали работы Бризу (Brisou, 1955) и Вильямса и Риттенберга (Williams, Rittenberg, 1957), а для определения морских спирохет — статью Цуэльцер (Zuelzer, 1931). Дрожжи из родов *Rhodotorula* и *Torulopsis* определялись по Лоддер и Крегер-Ван Рий (Lodder, Kreger-Van Rij, 1952).

При изучении видового состава выделенных штаммов микроорганизмов получены следующие результаты. Среди организмов рода *Azotobacter* 62 штамма оказались новым видом, описанным нами под названием *A. miscellum* (Пшенин, 19646), 19 штаммов принадлежало к *A. chroococcum*, 3 штамма были отнесены к *A. agile*, 6 штаммов — к *A. vinelandii*, 1 штамм — к *A. nigricans*, 1 штамм — к *A. beijerinckii*. Десять штаммов *Clostridium* было отнесено к *C. pasteurianum*. Часть штаммов этого рода, в том числе ряд плектридиальных форм, совершенно очевидно не принадлежало к этому виду. Около 80 штаммов *Pseudomonas* оказались идентичными *P. radiobacter*. Свыше 30 штаммов *Vibrio* определены как *V. hydrosulfureus*, *V. frequens*, и примерно столько же штаммов оказалось новой разновидностью, названной нами *Vibrio nonhydrosulfureus* nov. var. Подробное изучение спирилл показало, что они принадлежат к трем новым видам, которые мы наименовали: *Spirillum magnum* nov. sp. (16 штаммов), *S. speciosum* nov. sp. (7 штаммов) и *S. nana* nov. sp. (11 штаммов).

В результате многолетних наблюдений над культурами спирохет были подробно изучены их морфологические, культуральные, физиологические и другие свойства. Полученные данные позволяют отнести их к роду *Treponema*, причем к новому для этого рода виду, получившему название *Treponema hyponeustonicum* nov. sp.* Из 17 штаммов дрожжей двух родов 9 штаммов оказались идентичными *Rhodotorula*

* Описания новых форм вибрионов, спирилл и трепонемы будут представлены в других сообщениях.

Таблица 2

Распределение азотфиксирующих бактерий в воде Черного моря
(число клеток и микроколоний в 1 л воды)

Глубина, м	Глубоководные районы				Филлофорное поле				Прибрежные участки		
	Разрез Емпатория—Босфор. Февраль 1956 г.				Разрез Ялта—Багуи. Август 1956 г.				Август 1955 г.		
					Июль 1956 г.				Апрель 1956 г.		
Расстояние от берега (в милях)											
110	77,5	28	71	70	80	15	20	24	4	0,1	0,6
Станции											
V	XIV	IX	II	III	IV	9	1	3	6	3	4

Azotobacter

0	< 9	2380	230	> 2380	23	2380	> 2380	2380	> 23800	< 9	2380	23800
5	< 9	23	< 9	23	2380	23	2380	95	> 23800	< 9	2380	2380
10	94	< 9	< 9	< 9	> 2380	23	2380	< 90	> 23800	< 9		
20, 25	< 9	< 9	< 9	< 9	2380	23	2380	230	> 23800	< 9		
50	23	< 9	23	< 9	2380	23	2380	230	> 23800	< 9		
75	23	< 9	23	< 9	2380	23	2380	230	> 23800	< 9		
100	23	< 9	23	< 9	2380	23	2380	230	> 23800	< 9		
150	< 9	< 9	23	230	> 2380	2380	2380	230	> 23800	< 9		
200	23	< 9	< 9	230	2380	230	2380	230	> 23800	< 9		
250	< 9	23	23	9	2380	230	2380	230	> 23800	< 9		
300	< 9	< 9	23	< 9	2380	230	2380	230	> 23800	< 9		
500	< 9	23	23	23	2380	230	2380	230	> 23800	< 9		
1000	< 9	< 9	23	23	2380	230	2380	230	> 23800	< 9		
1500					> 2380	23	> 2380	> 2380	> 23800	23		
2000					> 2380	23	> 2380	> 2380	> 23800	23		

Clostridium

[illegible]

Pseudomonas, Vibrio и Spirillum (суммарно)

[illegible]

rubra и *Rh. mucilaginosa* и 8 штаммов — *Torulopsis jamata* и *T. ernobii*.

Необходимо особо подчеркнуть, что микроорганизмы, выделенные из морской воды, взятой батометрами Нансена, не отличались морфологически, культурально и физиологически от аналогичных микробов, выделенных из воды, отобранной стерильными склянками. Это обстоятельство дает основание полагать, что перечисленные выше микроорганизмы, выделенные из батометрических проб, не являются случайным загрязнением проб и посевов морской воды.

В табл. 2 представлено распределение азотфиксирующих бактерий в морской воде в различных районах Черного моря. *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio* и *Spirillum* были обнаружены во всех районах по всей толще воды кислородной и сероводородной зон. Они распределены микроразнообразно, что, как и в случае других гетеротрофных бактерий (Крисс, 1959), по-видимому, обуславливается очаговым распределением в воде доступного органического вещества. Количество азотфиксаторов в воде в разные сезоны различно: летом их больше, чем зимой. Как было показано ранее (Пшенин, 1961), между количеством азотобактера и общим количеством фитопланктона не наблюдается прямой связи. Последняя проявляется лишь между содержанием азотобактера и крупных форм фитопланктона и частиц детрита. Оседая, детрит может увлекать с собой прикрепленные к нему клетки *Azotobacter*, а также *Pseudomonas*, *Vibrio* и *Spirillum* в более глубокие слои воды. По-видимому, этим и объясняется встречаемость и сходство в характере распределения этих аэробных форм в воде сероводородной зоны, где облигатные аэробы могут сохранять жизнеспособность, а факультативные, вероятно, также и активность.

В районе Филлофорного поля количество бактерий в воде может повышаться вследствие ветровых волнений, взмучивающих грунт (станция 3). В тихие дни этот район Черного моря (станция 1 и 9) по количеству аэробных азотфиксаторов мало отличается от сходного слоя воды глубоководных районов. Однако в отличие от последних в районе Филлофорного поля часто в заметных количествах встречается *Clostridium pasteurianum*. В прибрежных мелководных участках (бухты, заливы), благодаря близости берега и грунта и в зависимости от времени года, а также от ветровых условий, численность азотфиксирующих бактерий в воде обычно или выше (станция 4), или одного порядка (станция 3 и 6) с таковой в воде открытых районов моря.

Как указывалось выше, *Clostridium* в толще воды глубоководных районов не был обнаружен, но в районе Филлофорного поля и в воде прибрежных участков встречался, хотя и в меньших количествах, чем *Azotobacter*. Интересно отметить, что при посевах грунта в среду Виноградского рост *Clostridium* давали все пробы (Пшенин, 1959б). Наилучший рост наблюдался после внесения больших количеств ила (1—10 г), при малых количествах (0,01 г и меньше) рост *Clostridium* был таким же слабым, как и при посевах морской воды. Возможно, слабый рост как в одном, так и в другом случае обуславливался недостатком ростовых веществ, в которых нуждается *Clostridium* (Емцев, 1962).

Азотфиксирующая способность чистых культур микроорганизмов определялась микрометодом Кельдаля. Воздух, поступающий в инкубационные сосуды, перед этим очищался от примесей аммиачных соединений и окислов азота растворами серной кислоты и щелочного перманганата в газопромывательных колонках с диффузором из мелкопористого стекла. Учитывался азот исходной среды. В результате химических анализов были получены величины фиксации молекулярного азота на 100 мл среды и величины продуктивности азотфиксации в миллиграмм на 1 г использованной глюкозы (табл. 3).

Таблица 3

Азотфиксирующая способность микроорганизмов, выделенных из воды в различных районах Черного моря

Виды	Район моря	Стан-ции	Рассто-яние от бе-рега (в ми-лях)	Глуби-на, м	Количество фиксирован-ного азота*		
					мг на 100 мл среды	мг на 1 г исполь-зованной глюкозы	
						у отдель-ных штам-мов	сред-нее
<i>Azotobacter chroococ- cum</i>	Евпатория—Босфор	XI	25	0	14,66	7,73	6,6
	Ялта—Батуми	III	70	250	10,92	5,46	
<i>A. miscellum</i>	Филлофорное поле	I	20	0	9,37	4,70	6,4
	"	7	20	0	18,74	9,37	
	Евпатория—Босфор	XII	81	15	9,97	5,00	
<i>Clostridium pasteu- rianum</i>	Филлофорное поле	9	15	0	0,49	0,83	1,0
	"	9	15	10	1,18	1,18	
<i>Treponema hyponeu stonicum</i> nov. sp.	Ялта—Батуми	I	41	0	19,42	9,74	9,3
	"	"	"	"	17,44	8,78	
<i>Spirillum magnum</i> nov. sp.	Евпатория—Босфор	XVIII	12	0	32,24	16,12	16,8
	"	XVIII	12	0	31,25	17,44	
<i>S. speciosum</i> nov. sp.	Филлофорное поле	9	15	0	8,02	4,24	
<i>S. nana</i> nov. sp.	"	9	15	0	9,63	4,84	
<i>Vibrio nonhydrosul- fureus</i> nov. var.	Ялта—Батуми	IV	80	0	1,50	4,42	5,7
	"	III	70	200	17,22	8,61	
	"	III	70	2000	2,23	3,95	
<i>V. fresquens</i>	Ялта—Батуми	V	33	0	3,84	2,23	2,0
	"	V	33	0	1,52	1,84	
	"	IV	80	200	3,43	1,84	
<i>V. hydrosulfureus</i>	Филлофорное поле	9	15	10	1,76	1,62	1,6
	"	9	15	10	1,12	1,64	
<i>Pseudomonas radio- bacter</i>	Ялта—Батуми	V	33	0	1,30	2,01	2,3
	Евпатория—Босфор	VII	81	15	0,22	1,26	
	Филлофорное поле	VIII	13,5	15	0,64	3,62	
<i>Rhodotorula rubra</i>	Евпатория—Босфор	XI	25	35	0,03	0,12	0,2
	"	XI	25	50	0,23	0,35	
<i>Torulopsis famata</i>	Евпатория—Босфор	XIV	77,5	100	0,28	0,93	1,0
	"	XIV	77,5	150	0,28	1,06	

* Цифры в колонках выражают прирост азота, вычисленный путем вычитания из общего азота (после инкубации в течение месяца при 28°) азота исходной среды. Последний для среды Федорова составлял 0,28 мг на 1 колбу (50 мл среды), а для среды Виноградского — 0,17 мг на 1 пробирку (50 мл среды).

Необходимо отметить, что в ранее опубликованной работе (Pshe- nin, 1963, табл. 3) данные о продуктивности азотфиксации спирилл, вибрионов и псевдомонасов приводятся без указания их видового со- става. Вибрионы и псевдомонасы в упомянутой работе представлены как «пигментированные и непигментированные палочки». Кроме того, некоторые штаммы *Azotobacter miscellum* (Пшенин, 1964а) мы при- нимали за *A. chroococcum* вследствие наличия коричневой окраски колоний и пленок, образуемых этим организмом, или за *A. vinelandii* — из-за периодического выделения в среду некоторыми штаммами *A. mis- cellum* зеленого флуоресцирующего пигмента.

В настоящей статье уточнен и дополнен видовой состав испытанных на азотфиксацию микроорганизмов и впервые приводятся данные о способности организмов из класса спирохет фиксировать молекулярный азот (табл. 3). Из данных этой таблицы следует, что наибольшее количество азота, как на 100 мл среды, так и на 1 г использованной глюкозы, фиксирует *Spirillum magnum* nov. sp. Характерно также, что у *Treponema hyponeustonicum* nov. sp., *S. speciosum* nov. sp., а также у некоторых штаммов *Vibrio nonhydrosulfureus* nov. var., азотфиксирующая способность такая же, как у морских представителей классического азотфиксатора — азотобактера. Прочие микроорганизмы (*C. pasterianum*, *V. frequens*, *V. hydrosulfureus*, а также *Torulopsis jamata* и *Rhodotorula rubra*) показали значительно более низкую, чем у азотобактера, азотфиксирующую активность. У всех штаммов *Rhodotorula*, *Torulopsis* и у одного штамма *Clostridium* азотфиксирующая активность при данных условиях настолько низка, что прирост фиксированного азота колеблется около среднего значения примесей азота в исходной среде. Очевидно, необходимо подтверждение наличия азотфиксации у этих штаммов дрожжей масс-спектрометрическим методом. Вполне вероятно, что в присутствии витаминов или других стимулирующих факторов азотфиксирующая способность *Clostridium* и дрожжей резко возрастет.

Изложенный материал дает основание полагать, что в воде глубоководных районов Черного моря ведущая роль в фиксации азота гетеротрофными аэробными бактериями принадлежит не одному азотобактеру, но целому комплексу организмов: *Spirillum*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, а, возможно, и другим микроорганизмам, количественное развитие которых мало изучено. О роли *Clostridium* в процессе азотфиксации в воде глубоководных районов можно будет судить лишь после количественных исследований с применением среды, содержащей необходимые для *Clostridium* витамины и другие факторы роста.

Представленные результаты наблюдений показывают, что способность фиксировать молекулярный азот широко распространена среди различных групп свободноживущих микроорганизмов. К такому выводу в настоящее время приходит все большее число исследователей. Интересен тот факт, что свойством фиксировать азот обладают и сапрофитные спирохеты из рода *Treponema*. Общеизвестно, что способность фиксировать азот присуща лишь таким простейшим растительным организмам, как бактерии, грибки, водоросли, или симбиотическим системам типа: высшее растение — микроорганизм. В то же время спирохеты до сих пор еще относятся многими авторами к простейшим животным. В связи с этим доказательство наличия азотфиксирующей способности у сапрофитных трепонем является одним из аргументов в пользу существующего мнения о близком родстве более низко организованных форм спирохет с представителями порядка *Eubacteriales* — спириллами.

ЛИТЕРАТУРА

- Драчев С. М. и др., 1953. Методы химического и бактериологического анализа воды. Медгиз, М.
- Емцев В. Т., 1962. О количественном учете анаэробных азотфиксирующих маслянокислых бактерий рода *Clostridium* в почве. «Микробиология», т. 31, вып. 2.
- Красильников Н. А., 1949. Определитель бактерий и актиномицетов. Изд-во АН СССР, М.—Л.
- Крис А. Е., 1959. Морская микробиология (глубоководная). Изд-во АН СССР, М.
- Пшенин Л. Н., 1959а. Количественное распределение азотфиксирующих бактерий и их экология в районе Филлофорного поля Зернова в Черном море. «Микробиология», т. 28, вып. 6.

Пшенин Л. Н., 1959б. Азотфиксирующие бактерии в грунтах прибрежных районов Черного моря. ДАН СССР, т. 129, № 4.

Пшенин Л. Н., 1961. О связи между азотобактером и фитопланктоном в Черном море. «Тр. Севаст. биол. ст.», т. XIV.

Пшенин Л. Н., 1964. Об азотфиксирующих бактериях приповерхностного слоя воды в Черном море. «Тр. Севаст. биол. ст.», т. XV.

Пшенин Л. Н., 1964а. *Azotobacter miscellum* — один из массовых видов рода *Azotobacter*, обитающих в воде Черного моря. «Тр. Севаст. биол. ст.», т. XVII.

Пшенин Л. Н., 1964б. *Azotobacter miscellum* nov. sp., обитающий в Черном море. «Микробиология», т. 33, вып. 4.

Родина А. Г., 1950. Микробиологические исследования водоемов. Изд-во АН СССР, М.—Л.

Федоров М. В., 1951. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Сельхозгиз, М.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, 1948, 1957.

Brisou J., 1955. La Microbiologie du Milieu Marin. Editions Medicales Flammarion, Paris.

Lodder J. a. Kreger-Van Rij N. J. W., 1952. The yeasts. A taxonomic study. Amsterdam — New York.

Pshenin L. N., 1963. Distribution and ecology of *Azotobacter* in the Black Sea. Symposium on marine microbiol. Springfield, Illinois, U.S.A.

Williams M. A. a. Rittenberg S. C., 1957. A taxonomic study of the genus *Spirillum* Ehrenberg. Intern. Bull. Bact. Nomen. a. Tax., v. 7, No 2.

Zarma M., 1957. Microorganisme fixatoare de azot molecular in Marea Neagra. I. Consideratii asupra speciilor si varietatilor genului *Azotobacter* din Marea Neagra. Buletin stiintific, I, t. IX.

Zarma M., 1960. Les microorganismes fixateurs de l'azote molecular dans la Mer Noire. III. Leur role dans la productivite biologique de la Mer Noire. Rapports et proces-verbaux des Reunions, v. XV, fasc. 3, Monaco.

Zuelzer M., 1931. Spirochaeta. Die Tierwelt der Nord- und Ostsee, Lief. 20, t. II, Leipzig.