

УДК 631.461.5(479.22)

АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА CLOSTRIDIUM В ГОРНО-ЛУГОВОЙ И ЧЕРНОЗЕМНОЙ ПОЧВАХ ГРУЗИИ

Т. Д. ДЗАДЗАМИЯ, Н. М. РАМИШВИЛИ, Л. К. НИЦЭ, М. Х. БРУК
(Кафедра микробиологии)

Азотный баланс почв, несмотря на применение удобрений, часто бывает отрицательным. Имеющийся дефицит азота в значительной степени восполняется за счет активности свободноживущих и симбиотических микроорганизмов. Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы ежегодно усваивают от 10 до 100 кг азота на 1 га [7]. Представляет интерес изучить азотфиксирующую активность почв южной зоны СССР (Грузинская ССР) и интенсивность фиксации азота чистыми культурами *Clostridium*, что и явилось предметом наших исследований.

Объекты и методы исследований

Исследовались черноземная почва Шираки и горно-луговая Казбеги. Варианты опытов указаны в таблицах. Анаэробные азотфиксаторы рода *Clostridium* культивировали на элективных средах [6]. Азотфиксирующую активность почвы и чистых культур *Clostridium* определяли ацетиленовым методом [10], содержание щелочногидролизующего азота в почве — по Корнфилду [1], качественный состав гумуса — по методу Кононовой и Бельчиковой [4], дегидрогеназную активность — по методу Тунберга [9].

Нитрогеназная активность почвы

Данные о нитрогеназной активности почвы представлены в табл. 1. Из них видно, что накопление биологического азота в почве носит сезонный характер. В черноземной почве максимум фиксации азота отмечен весной и осенью, в горно-луговой — в весенне-летний период (табл. 1). При этом уровень накопления биологического азота был выше в горно-луговой почве, что можно сказать и о количестве анаэробных азотфиксаторов. Последнее, по-видимому, обусловлено медленно

Таблица 1

Сезонная изменчивость нитрогеназной активности почвы
(мкг N₂ в 1 кг воздушно-сухой почвы за 1 ч; в числителе —
глубина взятия образца 0—25 см, в знаменателе — 25—50 см)

Вариант опыта	Весна		Лето		Осень		В среднем	
	ч	г	ч	г	ч	г	ч	г
Неосвоенная почва (без выпаса скота)	576,8	1120,0	320,8	1054,4	442,0	926,4	446,3	1033,6
	144,5	459,2	180,2	508,8	286,6	410,2	203,7	459,4
Пастбища	364,0	307,2	340,6	1082,0	716,2	792,6	473,6	927,3
	352,0	649,6	339,8	716,2	388,0	618,0	326,6	661,3
Эродированная почва	236,0	178,2	148,2	288,0	186,4	146,2	190,2	204,5
	140,0	264,0	156,0	180,6	162,2	118,2	152,7	187,6

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 и 5 ч — черноземная почва; г — горно-луговая

идущими процессами минерализации и некоторыми экологическими факторами.

Наиболее интенсивный процесс азотфиксации в слое 0—25 см черноземной почвы характерен для пастбищного варианта (473,6 мкг N₂ на 1 кг), а в горно-луговой — для неосвоенного (1033,6 мкг). Меньшая интенсивность накопления азота свойственна эродированным почвам обоих типов (140—260 мкг N₂ на 1 кг воздушно-сухой почвы). Аналогичная картина наблюдалась и в более глубоких слоях почвы (25—50 см).

Установлена прямая зависимость между накоплением биологического азота в почве и содержанием в ней азота, что иллюстрируется данными за 1977 г. (табл. 2). Подобные результаты получены и в 1978 г.

Таблица 2

Содержание щелочно-гидролизуемого азота в черноземной и горно-луговой почвах в 1977 г. (мг на 100 г; в числителе — глубина взятия образца 0—25 см, в знаменателе — 25—50 см)

Вариант опыта	Весна		Лето		Осень	
	ч	г	ч	г	ч	г
Неосвоенная почва	9,52	16,80	7,28	19,25	9,24	15,82
	8,33	14,70	7,00	18,62	8,47	14,56
Пастбища	10,78	18,97	7,70	18,97	11,16	16,1
	8,61	16,10	6,72	16,80	8,33	14,42
Эродированная почва	7,70	11,97	5,67	14,00	8,05	10,08
	6,23	10,22	5,18	11,76	7,70	10,64

В горно-луговой почве анаэробные свободноживущие азотфиксаторы более активны и уровень накопления азота выше, чем в черноземе. Биологический азот, усваиваемый свободноживущими анаэробными бактериями, играет существенную роль в азотном балансе этих почв, тем более что в ассоциациях травяной растительности как Ширакской степи, так и высокогорных пастбищ Казбеги бобовые представлены в незначительных количествах.

Нитрогеназная активность анаэробных бактерий рода *Clostridium*

Интенсивность фиксации азота в почве не всегда обуславливается численностью населяющих почву бактерий. В большинстве случаев решающую роль играет азотфиксирующая активность микроорганизмов. Так, при низкой численности анаэробных микроорганизмов в почве со-

Активность фиксации азота атмосферы *Clostridium*, выделенных из разных почв (мкг N₂/ч)

Вариант опыта	<i>Cl. pasteurianum</i>		<i>Cl. butyricum</i>		<i>Cl. acetobutylicum</i>		<i>Cl. butylicum</i>	
	ч	г	ч	г	ч	г	ч	г
Неосвоенная почва	6,4	7,5	4,6	10,8	4,0	4,0	5,0	4,3
Пастбища	6,7	6,5	4,0	6,8	4,2	4,1	5,0	3,9
Эродированная почва	4,0	5,8	2,2	3,2	1,8	1,8	1,9	1,2

держание в ней азота часто высокое, что объясняется, по-видимому, большой их активностью [5]. В этой связи одной из задач наших исследований явилось определение азотфиксирующей активности некоторых чистых культур маслянокислых, ацетобутиловых и бутиловых бактерий рода *Clostridium* (табл. 3).

Выявлено, что различные виды анаэробных азотфиксаторов усваивают биологический азот с разной интенсивностью. Максимум азота фиксируют маслянокислые бактерии *Cl. pasteurianum* и *Cl. butyricum*, меньшее количество — *Cl. acetobutylicum* и *Cl. butylicum*.

Интенсивность азотфиксации различных штаммов *Clostridium* во многом зависит от типа почв, из которых они выделены. Так, штаммы маслянокислых бактерий *Cl. pasteurianum* и *Cl. butyricum*, выделенные из черноземной почвы, фиксируют меньше азота, чем аналогичные штаммы из горно-луговой почвы. Азотфиксирующая активность штаммов *Cl. acetobutylicum* и *Cl. butylicum*, выделенных из черноземной почвы, несколько больше, чем у культур, полученных из горно-луговой почвы.

Высокая азотфиксирующая способность характерна для штаммов *Clostridium*, выделенных из почв неосвоенных участков и пастбищ. Наиболее активны культуры маслянокислых анаэробов, выделенных на неосвоенных участках горно-луговой почвы и пастбищных участках чернозема, наименее — ацетобутиловые бактерии, полученные из эродированной почвы.

Как известно, интенсивность фиксации азота бактериями рода *Clostridium* зависит от концентрации углевода: чем выше концентрация сахара, тем меньшее количество связанного азота на каждый грамм сброженного энергетического материала [2, 8].

Нами изучалось влияние глюкозы, крахмала и маннита при разных концентрациях на азотфиксирующую активность различных штаммов *Clostridium*. Оптимальная концентрация сахаров для *Clostridium*, выделенных из черноземной и горно-луговой почв, составила соответственно 2—3 и 1—2 %. Установлено, что штаммы *Cl. pasteurianum* лучше связывают молекулярный азот на глюкозе, чем на крахмале и манните (табл. 4). Причем высокие концентрации глюкозы способствуют азотфиксации *Cl. pasteurianum*, а крахмала и маннита — подавляют азотфиксацию. Количество азота, накапливаемого *Cl. butyricum*, больше на крахмале и манните, чем на глюкозе. При повышении концентрации сахаров азотфиксирующая активность *Cl. butyricum* возрастает в вариантах с черноземной почвой и снижается в вариантах с горно-луговой почвой. Аналогичное влияние более высокие концентрации сахаров оказывают и на азотфиксирующую активность *Cl. acetobutylicum* и *Cl. butylicum*. Штаммы *Cl. acetobutylicum* лучше фиксируют азот при использовании глюкозы и крахмала, в то время как *Cl. butylicum* — маннита и крахмала.

Физиолого-биохимические особенности сахаролитических *Clostridium*

Интенсивность азотфиксации сахаролитических *Clostridium* зависит не только от природы углевода, но и от его концентрации в сре-

Интенсивность фиксации азота атмосферы *Clostridium*
в зависимости от источника углерода (мкг N₂/ч; в числителе — черноземная почва,
в знаменателе — горно-луговая)

Вариант опыта	Глюкоза			Крахмал			Маннит		
	содержание сахара, %								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Cl. pasteurianum</i>									
Неосвоенная почва	5,7	7,2	7,2	5,3	5,3	5,1	5,3	4,0	3,8
	10,2	9,4	7,6	1,2	1,4	0,8	0,8	0,6	0,5
Пастбища	6,1	6,8	7,6	5,4	5,1	4,7	5,7	5,1	4,0
	9,0	10,1	7,1	1,4	1,2	0,6	0,5	0,6	0,5
Эродированная почва	4,8	5,2	6,5	2,9	2,6	2,6	3,7	2,9	2,6
	7,4	7,8	6,6	0,8	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4
<i>Cl. butyricum</i>									
Неосвоенная почва	5,7	6,7	7,3	5,4	7,9	9,0	6,8	7,9	8,3
	7,9	8,7	6,5	10,4	9,9	6,8	9,0	9,3	6,9
Пастбища	6,0	6,7	7,7	5,7	8,3	8,8	7,0	8,3	9,0
	7,7	8,1	6,1	9,6	9,5	6,5	8,8	9,6	6,7
Эродированная почва	3,6	4,2	4,0	3,8	6,4	6,7	5,8	6,4	6,5
	6,2	6,9	5,7	8,3	8,4	4,7	6,5	7,9	6,2
<i>Cl. acetobutylicum</i>									
Неосвоенная почва	3,8	4,2	5,1	4,4	5,0	5,9	2,8	3,3	3,1
	3,8	4,3	2,8	4,6	5,0	3,8	2,2	2,5	1,9
Пастбища	4,1	4,4	4,9	4,9	5,1	5,7	2,9	3,2	3,2
	3,4	3,7	3,2	4,4	4,9	3,2	1,9	2,2	1,9
Эродированная почва	1,5	1,9	2,2	2,4	2,4	2,9	1,6	2,2	2,8
	2,8	2,5	1,7	2,8	2,8	2,4	1,5	1,9	1,1
<i>Cl. butylicum</i>									
Неосвоенная почва	3,0	3,2	3,2	3,6	4,2	4,4	4,0	4,7	5,4
	2,5	3,2	2,0	3,2	2,8	1,9	3,1	3,4	2,4
Пастбища	3,2	3,2	3,6	3,6	4,9	5,1	4,3	5,3	5,7
	2,4	2,8	1,9	2,8	3,1	2,4	2,8	3,1	2,9
Эродированная почва	2,5	2,4	2,8	3,1	4,0	4,2	3,7	4,3	4,7
	1,8	1,9	1,4	2,0	2,1	1,5	2,6	2,8	1,6

де, а также от физиолого-биохимических особенностей штаммов, выделенных из разных биотопов. При этом существенное значение имеет соотношение азота и углерода в субстрате, которое, по-видимому, является одним из факторов, определяющих физиолого-биохимические свойства микроорганизмов (табл. 5). Так, в горно-луговой почве углерода содержится больше, чем в черноземной, причем в фульвокислотах

Таблица 5

Состав гумуса почв на глубине 0—25 см

Вариант	Гумус, %		С. % от общего						$\frac{C_{ГК}}{C_{ФК}}$	
			в почве		в гуминовых кислотах		в фульвокислотах			
	ч	г	ч	г	ч	г	ч	г	ч	г
Неосвоенная почва	2,95	7,48	2,54	2,90	19,14	21,39	16,06	27,16	1,12	0,79
Пастбища	2,75	6,20	2,05	2,82	22,08	19,65	18,10	28,03	1,22	0,70
Эродированная почва	1,12	2,12	1,06	2,05	14,62	14,20	13,78	21,54	1,06	0,65

Дегидрогеназная активность *Clostridium* в зависимости от концентрации углеводов в почве (мг ТФФ на 1 млрд клеток за сутки; в числителе — черноземная почва, в знаменателе — горно-луговая)

Вариант опыта	Глюкоза			Крахмал			Маннит		
	содержание сахара, %								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Cl. pasteurianum</i>									
Неосвоенная почва	0,315	0,600	0,620	0,290	0,270	0,245	0,315	0,245	0,245
	0,945	0,885	0,695	0,100	0,090	0,050	0,075	0,050	0,050
Пастбища	0,385	0,475	0,695	0,290	0,245	0,220	0,360	0,270	0,220
	0,860	0,925	0,575	0,080	0,075	0,038	0,050	0,037	0,037
Эродированная почва	0,220	0,270	0,455	0,140	0,120	0,120	0,220	0,130	0,120
	0,670	0,720	0,430	0,050	0,037	0,025	0,025	0,075	0,025
<i>Cl. butyricum</i>									
Неосвоенная почва	0,335	0,525	0,645	0,405	0,790	0,905	0,550	0,765	0,790
	0,765	0,860	0,430	0,990	0,970	0,550	0,860	0,885	0,575
Пастбища	0,385	0,500	0,695	0,360	0,810	0,860	0,600	0,790	0,810
	0,720	0,810	0,405	0,925	0,905	0,500	0,810	0,925	0,525
Эродированная почва	0,200	0,270	0,290	0,245	0,455	0,525	0,315	0,475	0,500
	0,405	0,575	0,335	0,790	0,790	0,280	0,500	0,745	0,405
<i>Cl. acetobutylicum</i>									
Неосвоенная почва	0,220	0,270	0,335	0,245	0,280	0,360	0,150	0,180	0,160
	0,220	0,280	0,160	0,270	0,290	0,220	0,130	0,140	0,120
Пастбища	0,245	0,290	0,315	0,270	0,290	0,315	0,150	0,170	0,170
	0,200	0,245	0,170	0,245	0,280	0,180	0,120	0,130	0,110
Эродированная почва	0,090	0,110	0,120	0,130	0,140	0,150	0,100	0,120	0,140
	0,140	0,130	0,100	0,140	0,150	0,130	0,090	0,110	0,075
<i>Cl. butylicum</i>									
Неосвоенная почва	0,150	0,170	0,170	0,200	0,245	0,270	0,220	0,280	0,315
	0,130	0,170	0,120	0,170	0,150	0,120	0,160	0,170	0,130
Пастбища	0,160	0,160	0,200	0,200	0,290	0,302	0,270	0,315	0,335
	0,120	0,150	0,110	0,150	0,160	0,130	0,140	0,160	0,150
Эродированная почва	0,120	0,120	0,140	0,160	0,220	0,245	0,200	0,245	0,280
	0,110	0,120	0,075	0,120	0,120	0,080	0,130	0,140	0,100

горно-луговой почвы его в 1,5 раза больше, чем в гуминовых кислотах. Следовательно, горно-луговая почва богата органическим веществом, которое, вероятно, находится в легкоусваиваемой маслянокислыми анаэробами форме (простые сахара и другие растворимые в воде соединения). Благодаря ферментативному аппарату эти микроорганизмы способны использовать разнообразные источники углерода.

Ацетонобутиловые и бутиловые бактерии, хорошо развивающиеся в черноземной почве, очевидно, связаны с более стабильной частью органических веществ. В этой почве больше углерода содержится в гуминовых кислотах, что обуславливает особенности питания *Cl. acetobutylicum* и *Cl. butylicum*, которые преобладают над маслянокислыми анаэробами. У маслянокислых бактерий, выделенных из черноземной почвы, в отличие от таковых, полученных из горно-луговой почвы, изменен ферментативный комплекс. Следовательно, они обладают высокой пластичностью, и поэтому адаптированы к условиям существования в черноземной почве. Таким образом, для биосинтеза ферментов исключительно важное значение имеет не только уровень углерода и

азота в среде обитания, но и их соотношение [3], которое, по-видимому, оптимально в черноземной почве.

Мы изучали дегидрогеназную активность бактерий рода *Clostridium*, выделенных из изучаемых почв и обладающих неодинаковой азотфиксирующей активностью при культивировании на различных источниках углерода и в разных его концентрациях (табл. 6). В результате выявлена прямая зависимость между интенсивностью азотфиксации и дегидрогеназной активностью культур *Clostridium*. Наибольшей дегидрогеназной активностью обладают штаммы *Cl. pasteurianum*, выделенные из горно-луговой почвы при использовании в качестве субстрата глюкозы (табл. 4 и 6). То же можно сказать и про *Cl. butyricum*. Увеличение концентрации углевода в субстрате (свыше 2%) в большинстве случаев ингибирует дегидрогеназную активность, так как в природных условиях анаэробные бактерии не адаптированы к ним.

Таким образом, разработка целостного представления о биологии анаэробных бактерий теснейшим образом связана с необходимостью установления экологических закономерностей существования отдельных видов анаэробов в почве. Определение внешних факторов, обуславливающих максимальный рост анаэробов и их активность, позволит найти способы интенсификации ряда процессов, осуществляемых анаэробными бактериями, в частности фиксации азота атмосферы.

Выводы

1. Потенциальная азотфиксирующая активность почвы изменяется в зависимости от ее типа и состояния. Малопродуктивные почвы (эродированные) характеризуются наименьшей нитрогеназной активностью.

2. Активность связывания азота атмосферы различными экологическими штаммами сахаролитических бактерий рода *Clostridium* зависит от среды их обитания.

3. Выявлена прямая зависимость между интенсивностью азотфиксации и дегидрогеназной активностью бактерий рода *Clostridium*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агрохимические методы исследования почв. М.: Наука, 1975. — 2. Виноградский С. В. Микробиология почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1952. — 3. Коновалов С. А. Биосинтез ферментов микроорганизмами. М.: Пищ. пром-сть, 1972. — 4. Кононова М. М., Бельчикова И. П. Ускоренные методы определения состава гумуса минеральных почв. — Почвоведение, 1961, № 10, с. 74—87. — 5. Мегрелидзе А. Г. Биологические особенности анаэробных азотфиксирующих бактерий в связи с мелиорацией почв. — Автореф. канд. дис. Тбилиси, 1979. — 6. Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium*. М.: Наука, 1974. — 7. Мишустин Е. Н., Черепков Н. И. О биологическом азоте в сельском хозяйстве СССР. — VIII Межд. конф. по минеральным удобрениям. М.: Наука, 1976, с. 23. — 8. Омелянский В. Л. Связывание атмосферного азота почвенными микроорганизмами. — Избр. тр. М.: Изд-во АН СССР, 1953, т. 1, с. 175—178. — 9. Fahmy A., Walsh E. — *Bioch. J.*, 1952, vol. 5, p. 945—951. — 10. Hardy R. W., Holsien R. D., Jackson E. K., Burns B. C. — *Plant Physiol.*, 1968, vol. 43, № 8 p. 1185.

Статья поступила 5 октября 1984 г.

SUMMARY

Nitrogen-fixing activity of chernozem and mountain-meadow soils of Georgia and pure culture of *Clostridium* anaerobic № 8 bacteria obtained from these soils was studied. Intensity of nitrogen fixation in mountain-meadow soils was found to be higher than in chernozem soils.