

УДК 631.461.5:633.18

ФИКСАЦИЯ АЗОТА АТМОСФЕРЫ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ ПОЧВ РИСОВЫХ ПОЛЕЙ

О. Д. СИДОРЕНКО, Т. Е. ЛИМАРЬ
(Кафедра микробиологии)

Способность сульфатредуцирующих бактерий связывать молекулярный азот установлена при их культивировании в атмосфере азота и аргона [16]. По мере роста сульфатредукторов объем азота уменьшается, что позволило авторам предположить наличие азотфиксирующей активности бактерий. Вначале способность фиксировать азот была обнаружена у неспорообразующих бактерий рода *Desulfovibrio* [13], затем у спорообразующих бактерий рода *Desulfotomaculum* [1, 5, 12]. Данные, полученные ацетиленовым методом, также подтвердились результатами, полученными изотопным методом с использованием $^{15}\text{N}_2$ [10].

Ряд исследователей отмечают положительную связь между азотфиксирующей активностью и интенсивностью восстановления сульфатов в затопленной почве. Так, нитрогеназная активность, как и сульфатредукция, в ризосфере риса выше, чем в почве без растений [6]. Значение сульфатредуцирующих бактерий в балансе азота может оказаться существенным, если учитывать мощность процесса сульфатредукции в затопленных почвах под рисом. Нами была сделана попытка установить роль данной физиологической группы бактерий в накоплении азота в почвах рисовых полей.

Объекты и методы исследований

Объектом исследований служили сульфатредуцирующие бактерии, выделенные из почв рисовых полей: лугово-черноземовидной Краснодарского края (среднесуглинистая, содержание гумуса — 3,21 %, $\text{pH}_{\text{водн}}$ — 7,12) и солонца лугового солончакового Ставропольского края (глинистый, содержание гумуса — 2,76 %, $\text{pH}_{\text{водн}}$ — 8,12).

Изолирование изучаемых бактерий в чистую культуру проводили в трубках Вейона, анаэробстатах на среде Постгейта «В» [11] и почвенном агаре с добавлением молочнокислого кальция. Для установления видовой принадлежности выделенных культур использовали определитель Берги [3]. Морфологию бактерий изучали с помощью электронного микроскопа марки Hitachi (Япония). Сульфатредуцирующую активность определяли йодометрическим титрованием [2], способность культур фиксировать атмосферный азот — ацетиленовым

методом [7], рН и окислительно-восстановительный потенциал (Eh) — путем применения универсального иономера ЭВ-74 на 5-е сутки инкубации в жидкой среде Постгейта «В» при 28° (для *Dm. orientis* — 37°, *Dm. nigrificans* — 55°). С целью определения нитрогеназной активности культуры выращивали на безазотистой среде Постгейта «В» в высоких пробирках. После 5 сут инкубации 5 мл культуральной жидкости с биомассой бактерий переносили в стерильные пенициллиновые флаконы, вводили 0,5 мл ацетилена и инкубировали в атмосфере аргона. Для анализа отбирали 0,5 мл газовой пробы и на газовом хроматографе «Хром-4» с помощью пламенно-ионизационного детектора определяли количество образовавшегося этилена. Модельный опыт при условии соблюдения заданных стандартных условий проводили в 3-кратной повторности с использованием

нестерильной почвы с естественной микрофлорой и стерильной, в которую вносили культуры сульфатредуцирующих бактерий (10^5 клеток на 1 г почвы) при затоплении.

Численность сульфатредуцирующих бактерий в почве устанавливали методом предельных разведений в жидкой среде Постагейта «В».

Результаты исследований

Из почв рисовых полей (лугово-черноземовидная и солонец луговой солончаковый), где численность сульфатредуцирующих бактерий составляла 10^5 — 10^9 клеток на 1 г, нами были выделены разнообразные представители данной группы, активно восстанавливающие сульфаты до сероводорода. Это неспорообразующие бактерии рода *Desulfovibrio* (*Dv. desulfuricans* ssp. *desulfuricans* — 5 штаммов, *Dv. desulfuricans* ssp. *aestuarii* — 1, *Dv. vulgaris* ssp. *vulgaris* — 2 штамма) и спорообразующие рода *Desulfotomaculum* (*Dm. orientis* — 2 штамма, *Dm. nigrificans* — 1 штамм). С помощью электронного микроскопа были сделаны снимки отдельных культур бактерий (рис. 1).

Как показали результаты изучения интенсивности сульфатредукции у выделенных штаммов (табл. 1), спорообразующие бактерии обладали несколько большей активностью, чем представители рода *Desulfovibrio*, а максимально активной была культура *Dv. desulfuricans* ssp. *aestuarii*, выделенная из засоленной почвы, — она образовала более 400 мг сероводорода на 1 л.

Все исследуемые штаммы сульфатредуцирующих бактерий несколько подщелачивали среду. Так, значение pH в зависимости от вида культуры увеличивалось на 0,20—0,45 и не превышало 7,6. При этом значительно снижался ОВ-потенциал (табл. 1).

Все выделенные культуры при росте на безазотистой среде восстанавливали ацетилен, причем нитрогеназная активность варьировала в зависимости от штамма и у неспорообразующих бактерий была в 3—5 раз выше, чем у представителей рода *Desulfotomaculum*. Азотфиксирующая активность была наименьшей у термофильной культуры *Dm. nigrificans* — 0,10 нм на 1 мл среды в 1 ч.

Для изучения способности сульфатредуцирующих бактерий связывать атмосферный азот в условиях, близких к естественным, был поставлен модельный опыт с внесением в стерильную затопленную лугово-

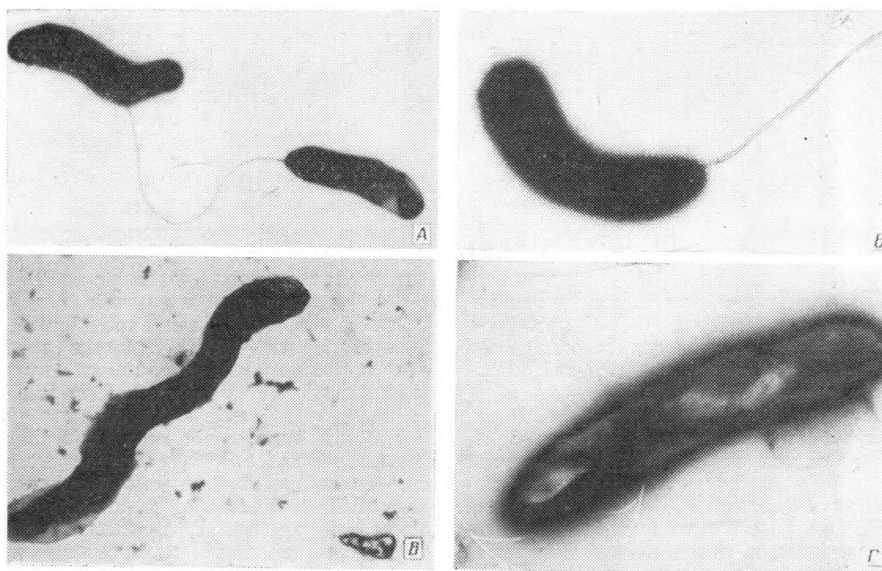


Рис. 1. Клетки 5-суточной культуры *Dv. desulfuricans* ssp. *desulfuricans* шт. 63, $\times 15\,000$ (A); 4-суточной *Dv. desulfuricans* ssp. *aestuarii*, $\times 25\,000$ (B); 5-суточной *Dv. vulgaris* ssp. *vulgaris* шт. 24, $\times 15\,000$ (B) и 4-суточной культуры *Dm. nigrificans*, $\times 30\,000$ (Г).

черноземовидную почву культуры *Dv. desulfuricans* ssp. *desulfuricans* шт. 237. В опыте изучалось влияние на жизнедеятельность бактерий сульфатов и органического вещества, наличие которых определяет развитие микроорганизмов данной группы. Для этого в почву вносили сульфат натрия и лактат натрия — соответственно 0,5 и 1,0 % от ее массы. При определении потенциальной азотфиксации в пенициллиновые флаконы с почвой вносили 1 % лактата натрия.

Наблюдалась значительная корреляция между численностью бактерий, восстанавливающих сульфаты, и уровнем потенциальной азотфиксации во всех вариантах опыта (табл. 2). Сульфаты не оказали существенного влияния на численность сульфатредуцирующих бактерий и их нитрогеназную активность. Лишь на 10-е сутки инкубации нитрогеназная активность была несколько меньше ожидаемой и составляла 0,53 мг азота на 1 кг почвы в сутки. Как установили японские исследователи [14, 15], сульфаты задерживают восстановление ацетилена бесклеточным экстрактом

Dv. desulfuricans, что объясняется конкуренцией процессов ацетилен- и сульфатредукции за электроны и АТФ, а не ингибированием нитрогеназной системы сульфатами. Они высказали предположение о том, что для бактериального восстановления ацетилена необходим высокий уровень АТФ. При внесении органического вещества и в результате совместного внесения сульфатов и органического вещества азотфиксация увеличилась в 2—9 раз по сравнению с контролем, максимальной она была при совместном внесении органического вещества и сульфатов.

Чтобы судить о масштабах гетеротрофной несимбиотической азотфиксации, осуществляемой сульфатредуцирующими бактериями, нами определялся уровень актуальной азотфиксации в нестерильной почве и в двух типах стерильных почв при внесении биомассы *Dv. desulfuricans* в количестве, близком к естественному (10^5 клеток на 1 г). Результаты опыта (рис. 2) показали, что азотфиксация в варианте с чи-

Т а б л и ц а 1
Некоторые результаты биохимической деятельности сульфатредуцирующих бактерий

Штамм сульфатредуцирующих бактерий	Eh, мВ	рН	Накопление	
			H_2S , мг/л	Фиксировано азота, мм/мл·ч
<i>Dv. desulfuricans</i> ssp. <i>desulfuricans</i> :				
368	—232	7,37	324	0,58
63	—229	7,40	331	0,73
42	—243	7,35	319	0,77
15	—228	7,38	328	0,66
237	—231	7,43	317	0,96
<i>Dv. desulfuricans</i> ssp. <i>aestuavii</i> -218	—260	7,60	420	0,69
<i>Dv. vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i> :				
49	—238	7,38	315	1,01
24	—235	7,45	322	0,87
<i>Dm. orientis</i> :				
58	—249	7,52	352	0,17
51	—241	7,49	343	0,23
<i>Dm. migrificans</i> -56	—253	7,58	379	0,10

Примечание. В контрольном варианте Eh — 94 мВ, рН — 7,15.

Т а б л и ц а 2
Численность и потенциальная азотфиксация *Dv. desulfuricans* ssp. *desulfuricans* при внесении сульфатов и органического вещества

Вариант опыта	Численность бактерий, тыс./г				Потенциальная азотфиксация, мг N_2 /кг в сутки			
	срок анализа образцов, сут							
	1	10	20	30	1	10	20	30
Контроль (нестерильный)	132	1418	3846	3906	1,78	17,71	7,47	5,01
Почва+ <i>Dv. desulfuricans</i>	547	3175	726	262	0,30	1,48	1,19	0,16
Почва+сульфат+ <i>desulfuricans</i>	547	2344	1532	185	0,30	0,53	1,64	0,09
Почва+лактат+ <i>Dv. desulfuricans</i>	547	7087	246	40	0,30	2,03	1,74	1,42
Почва+сульфат+лактат+ <i>Dv. desulfuricans</i>	547	23810	403	25	0,30	5,97	4,59	1,22

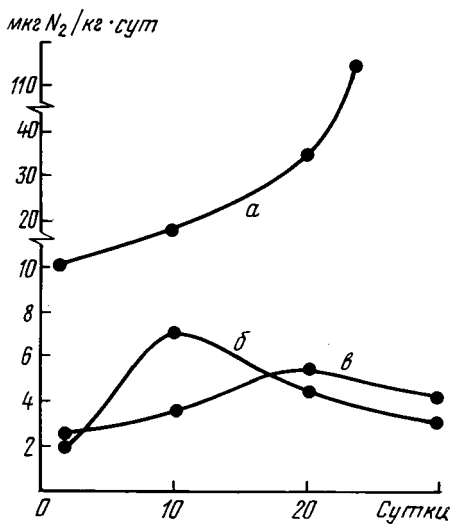


Рис. 2. Динамика актуальной азотфиксации почвы при внесении культуры сульфатредуцирующих бактерий.

а — нестерильная почва; б — лугово-черноземовидная почва + *Dv. desulfuricans ssp. desulfuricans* шт. 63; в — солонец луговой солончаковый + *Dv. desulfuricans ssp. aestuarii*.

отсутствует [4, 8, 9]. Корневые выделения риса и внесение в почву органических удобрений значительно стимулируют развитие сульфатредуцирующих бактерий, причем отмечается положительная связь между восстановлением серы и интенсивностью фиксации азота в затопленной почве [6]. Это позволяет предположить, что в естественных условиях масштабы накопления азота данными микроорганизмами в почве гораздо больше, что подтверждается результатами наших исследований.

Выводы

1. Все культуры сульфатредуцирующих бактерий, выделенные из почв рисовых полей, обладают нитрогеназной активностью, которая варьирует в зависимости от штамма. У неспорообразующих бактерий она в 3—5 раз выше, чем у представителей рода *Desulfotomaculum*.

2. При внесении в почву органического вещества и совместном его внесении с сульфатами активность азотфиксации сульфатредуцирующими бактериями возрастает в 2—9 раз. Использование одних сульфатов не оказывает существенного влияния на нитрогеназную активность бактерий. Микроорганизмы данной физиологической группы играют определенную роль в азотном режиме почв, связывая около 9 % общего азота гетеротрофной несимбиотической азотфиксации.

ЛИТЕРАТУРА

- Назина Т. Н., Розанова Е. П., Калининская Т. А. Фиксация молекулярного азота сульфатвосстанавливающими бактериями из нефтяных пластов. — Микробиология, 1979, т. 48, вып. 1, с. 133—136.
- Резников А. А., Муликовская Е. П., Соколов И. Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970.
- Bergey's manual of determinative bacteriology. — 8-ed., Baltimore, 1974.
- Charayulu P. B. V. N., Rao R. V. — Soil Biol. a. Biochem., 1981, vol. 13, N 1, p. 39—42.
- Dalton H. — Grit. Rev. Microbiol., 1974, vol. 3, p. 183—220.
- Garcia J.-L., Raimbault M., Jacq V., Rinaudo G., Roger P. — Rev. Ecol. et Biol. Sol., 1974, vol. 11, N 2, p. 169—185.
- Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. — Plant Physiol., 1968, vol. 43, N 8, p. 1185—1207.
- Hauke-Pacewiczowa T., Balandreau J., Dommergues V. — Soil Biol. a. Biochem., 1970, vol. 2, N 1, p. 47—53.
- Hirota Y., Fuih T., Sano Y., Iyama S. — Nature, 1978, vol. 276, N 5686, p. 416—417.
- Le Gall J. — J. Bacteriol., 1963, vol. 86, N 5,

- p. 1120. — 11. Postgate J. R. — Lab. Practice, 1966. vol. 15, N 11, p. 1240—1244. — 12. Postgate J. R. — Ibid., 1970, vol. 63, N 1, p. 137—139. — 13. Riederer-Henderson M. A., Wilson P. W. — J. Gen. Microbiol., 1970, vol. 61, N 1, p. 27—31. — 14. Sekiguchi T., Noguchi A., Nosoh Y. — J. Microbiol., 1977, vol. 23, N 5, p. 567—572. — 15. Sekiguchi T., Nosoh V. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, vol. 51, N 2, p. 331—335. — 16. Sissler T. D., Zobell C. E. — Ibid., 1951, vol. 113, N 2940, p. 511—512.

Статья поступила 30 июля 1985 г.

SUMMARY

All cultures of sulphate reducing bacteria obtained from rice-field soils are characterized by nitrogenase activity varying with the strain. This activity is 3—5 times higher in non-sporogenous bacteria than in representatives of the genus *Desulfotomaculum*.

Under the application of organic matter into the soil and under combined application of it with sulphates the nitrogen-fixing activity of sulphate-reducing bacteria grows 2—9 times. Application of sulphates alone has no practical influence on nitrogenase activity of bacteria. Microorganisms of the given physiological group play certain role in nitrogen regime of soils, fixing about 9% of total nitrogen of heterotrophic asymbiotic nitrogen fixation.