

УДК 633.11:581.144.2

АССОЦИАТИВНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ АЗОТФИКСИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ РОДА CLOSTRIDIUM И ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЕЙ

М. И. ЧУМАКОВ, Л. Ю. ИВАНОВА, М. Х. БРУК, Л. Е. КОТЛЯР, В. Т. ЕМЦЕВ
(Кафедра микробиологии)

Установлены ассоциативные взаимоотношения между штаммами сахаролитических анаэробов рода *Clostridium* и яровой пшеницей. Значимость *Clostridium* как ассоциативных азотфиксаторов подтверждается результатами количественного учета сахаролитических анаэробов в почве, ризосфере и ризоплане яровой пшеницы, данными об активности азотфиксации (ацетиленредукции) в прикорневой зоне, о динамике накопления биомассы яровой пшеницей и содержание общего азота в растениях.

Ранее считалось, что несимбиотические азотфиксирующие бактерии не могут играть большой роли в обеспечении почвы и растения азотом. Между тем применение высокочувствительных и точных методов регистрации активности азотфиксации в почве, таких как ацетиленовый и изотопный [2, 17, 22], позволило пересмотреть существующие взгляды на величину биологической азотфиксации и роль бактерий-азотфиксаторов в снабжении растений азотом. Установлена возможность управления со стороны растения активностью ассоциации злак — азотфиксирующие бактерии, показан значительный вклад азотфиксирующих бактерий в азотное питание растений [3, 8, 11, 18, 20, 21].

До недавнего времени традиционно анаэробные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium* рассматривались как свободноживущая группа азотфиксаторов [7], но в последние годы появились работы, в которых отмечается более тесная связь указанных бактерий со злаковыми, например с рисом [18]. Бактерии рода *Clostridium* как возможный микросимбионт пшеницы не изучались. Это предопределило наш интерес к проблеме ассоциативности *Clostridium* к пшенице.

В задачу данной работы входило: 1) определение степени приуроченности бактерий рода *Clostridium* к корням пшеницы; 2) установление численности, активности сахаролитических анаэробных азотфиксирующих бактерий рода *Clostridium* в почве прикорневой зоны и на корнях, а также в корнях яровой пшеницы.

Методика

Полевые опыты. Яровую пшеницу сорта Ершовская 32 выращивали в 1983—1984 гг. на полях Ершовской станции орошаемого земледелия (Саратовская область) при орошении (установка ДДА-100) без применения азотных удобрений. Фосфорные и калийные удобрения (60Р40К) вносили перед посевом. Делянки размером 12×30 м. Повторность 3-кратная. Почва темно-каштановая, подробная характеристика дана в работе [12]. Отбирали монолиты почв (1 кг) с растениями и анализировали через 8—10 ч. Отбор и обработку проб проводили по методу [4]. Активность азотфиксации в почве и в прикорневой зоне пшеницы устанавливали ацетиленовым методом при помощи модифицированного нами устройства [14].

Содержание NH_4^- и NO_3^- в почве определяли ионометрически.

Вегетационные опыты. Яровую пшеницу сортов Саратовская 29, Аль-

бидум 43, Саратовская 52, WS 1616 (Индия) выращивали в модифицированных нами сосудах, предложенных в работе [2], которые позволяли вести наблюдения за активностью азотфиксации на корнях, не нарушая образец почвы с растением.

Брали темно-каштановую почву из-под пшеницы 3-го года возделывания, горизонт 0—20 см, масса образца почвы в сосуде 1 кг. Применяли также смеси почвы и песка в соотношении 1:1. Растения выращивали до полной спелости при 16-часовом дне, освещенность 17 тыс. лк. Влажность поддерживали на уровне капиллярной, подпитку водой вели снизу сосуда. Активность азотфиксации определяли ацетиленовым методом при помощи устройства, предложенного в работе [2], в небольшой модификации, применяли активное прокачивание перистальтическим насосом через слой почвы газовой смеси (99 % азота; 1 % C_2H_2 или 99 % воздуха; 1 % C_2H_2). Для предупреждения

роста сине-зеленых водорослей применяли черную бумагу. Повторность опытов 15-кратная.

Микровеgetационные опыты. Яровую пшеницу сортов Саратовская 29, Альбидум 43, WS 1616 выращивали до стадии 3 листьев при комнатной температуре и освещении. Влажность поддерживали на уровне капиллярной, производя подпитку снизу смесью Гельригеля без азота. Нитрогеназную активность почвы определяли в модифицированных нами устройствах [14] по методу, предложенному в [23]. Объем сосудов 70—80 мл, навеска почвы 10—15 г, песка — 20 г. Повторность опытов 3—4-кратная. Для предупреждения роста сине-зеленых водорослей сосуды оборачивали черной бумагой.

Микробиологический анализ и выделение азотфиксирующих бактерий. Микробиологический анализ почвы, ризосферы и рйзопланы пшеницы проводили в соответствии с принципами, изложенными в работах [23, 24]. В полевых опытах брали почву междуурядий посевов пшеницы; в вегетационных — на расстоянии — 0,5 см от корня. Зонай ризосферы считали почву, оставшуюся в виде муфточки (1—2 мм) на корнях после их встряхивания. Корни с прилипшей землей перед посевом обрабатывали на микророзмельчителе тканей при 5 тыс. об/мин в течение 5 мин для десорбции микроорганизмов с поверхности частичек почвы и корней.

В микровеgetационных и вегетационных опытах исследовали микробиологическую популяцию ризопланы корней. Ризосферную почву удаляли, размачивая корни с почвой в воде. Затем в колбах с физиологическим раствором (по 100 мл) проводили 2-кратную мягкую отмывку корней ручным встряхиванием в течение 5 мин, а в дальнейшем — 2-кратную обработку корней при помощи микророзмельчителя тканей РТ-2 при 5 тыс. об/мин в течение 5 мин в физиологическом растворе, $V = 100$ мл (жесткая отмывка). Обработанные таким образом корни делили на четыре части. Одну часть корней растирали в стерильной ступке и делали микробиологический анализ; вторую — стерилизовали с поверхности (см. ниже), отмывали в физиологическом растворе 2-кратно в колбах, растирали стерильно в фарфоровой ступке и производили микробиологический анализ; третью и четвертую части корней не растирали. Нестерилизованные и стерилизованные корни проверяли на присутствие микрофлоры, используя следующие элективные среды: твердую среду Эшби, оптимально дифференциальную полужидкую среду [7] и полужид-

кую среду, предложенную в работе [5].

Количество бактерий рода *Clostridium* учитывали на полужидкой оптимально дифференциальной среде [7] методом предельных разведений в двух параллельных рядах пробирок. Повторность 3-кратная.

Характерный для *Clostridium* рост определяли по изменению окраски индикаторного красителя нейтральрота с красной на флуоресцирующую желтую, интенсивному газообразованию в толще агара и по специфическому запаху масляной кислоты. Пересчет вели по таблицам Мак-Креди. Численность аэробных форм азотфиксаторов учитывали на полужидкой среде [5] в пробирках Хангейта и среде Эшби в чашках Петри. Накопительные и чистые культуры бактерий выделяли из разведений, где была выявлена нитрогеназная активность.

Азотфиксирующую активность чистых и накопительных культур определяли ацетиленовым методом [5, 17] на средах, предложенных для анаэробных и аэробных форм азотфиксирующих бактерий [5, 7].

Стерилизацию корней проводили следующими растворами: NaOCl в концентрации 0,25—10 %, раствор получали согласно методике, предложенной в работе [9]; $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ — 1—10 % (производство «Fluka»); хлорамина Б — 10 %; H_2SO_4 — 60 %; диацита, H_2O_2 — 12,5 %; этилового спирта — 96 % при перемешивании. После стерилизации корни дважды обильно отмывали стерильной дистиллированной водой или физиологическим раствором. Обработанные корни или растирали в ступке для проведения микробиологического анализа, или целые корни раскладывали на среды, как описано выше.

Стерилизующий эффект хлорамина Б, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, H_2SO_4 был проверен на спорах *Clostridium* и *Bacillus*.

Для получения стерильных семян пшеницы зерновки обрабатывали по методу, описанному в [24]. Стерильные растения выращивали в сосудах объемом 90 мл [24] на вермикулите, пропитанном смесью Гельригеля без азота. Заражение растений в стадии двух листьев и определение ацетиленредукции у зараженных растений проводили в сосудах. Культуру *Clostridium* для заражения выращивали на твердой среде в чашках Петри в микроанаэробных условиях под вакуумом. Инокулят готовили на физиологическом растворе сразу после разгерметизации микроанаэробстата. Инокулировали 3—4-суточной культурой, концентрация $1 \cdot 10^8$ клеток на растение.

Результаты опытов были подвергнуты статистической обработке по методу, описанному в [15].

Образование ассоциации яровой пшеницы с сахаролитическими *Clostridium*.

Сахаролитические *Clostridium* могут поселяться на корнях пшеницы и фиксировать азот в тесной взаимосвязи с растением [3, 18]. Мы провели учет численности *Clostridium* на корнях яровой пшеницы, используя последовательно мягкую отмывку корней (встряхивание руками), жесткую отмывку (при помощи РТ-2) и поверхностную стерилизацию корней. Количественный учет показал, что сахаролитические *Clo-*

Распространение сахаролитических *Clostridium* на корнях и в корнях пшеницы
(тыс. клеток в 1 г корня)

Сорт пшеницы	Мягкая обработка		Обработка на РТ-2		Корни гомогенизованы		Корни стерилизованные, нестерильные
	I	II	I	II	нестерилизованные	стерилизованные	
Саратовская 52		0	26 500	3 600	4,6	2,1	—
Альбидум 43	—	—	30	1 400	1 628	0	—
WS 1616	—	0	—	24	0,2	0	—

- Примечания. 1. Стерилизацию проводили 4% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ в течение 15—20 мин.
2. Количество *Clostridium* в почве составило 13 тыс. клеток в 1 г почвы.
3. 0 — не обнаружено.
4. Тире — анализ не проводили.

stridium прочно удерживаются поверхностью корней пшеницы. При проведении мягких отмывок корней клетки в отмывочном растворе отсутствовали (табл. 1). После десорбции бактерий с поверхности корней с помощью РТ-2 в отмывочном растворе было обнаружено значительное количество *Clostridium* (до 26 500 тыс. клеток в 1 г корня), что свидетельствует о наличии довольно прочной связи клеток *Clostridium* с поверхностью растительной ткани, природа которой не известна. Даже после 2-кратной десорбции с помощью РТ-2 на корнях остается большое количество клеток *Clostridium* (0,2—1628 тыс. в 1 г корня).

Ранее было установлено, что бактерии *Clostridium* могут развиваться на поверхности корней злаков и в глубоких складках корня [3]. Для того чтобы выяснить, обладают ли сахаролитические *Clostridium* способностью проникать в глубь корня, мы использовали метод химической поверхностной стерилизации корней 4 % $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ и 60 % H_2SO_4 , продолжительность стерилизации соответственно 15—20 и 3—5 мин.

Поверхностной химической стерилизации подвергались корни пшеницы, выращенной в условиях вегетационного и микровегетационного опытов после предварительной обработки в физиологическом растворе в мягких и жестких условиях десорбции, как описано выше.

Клетки сахаролитических *Clostridium* были обнаружены в гомогенате корней в количестве 0—2,1 тыс. в 1 г корня (табл. 1). Это количество варьировало в зависимости от сорта и возраста растения. Сорта местной селекции в большей степени привлекали сахаролитические *Clostridium* в зону корней, чем сорт зарубежной селекции (табл. 1). Разница отмечена в числе клеток как на стерилизованных, так и на нестерилизованных корнях.

При повторном заражении стерильного растения штаммом *Clostridium*, который был выделен из корней пшеницы Саратовской 52, бактерии поселились на корнях. Клетки *Clostridium* обнаруживались на корнях и после жесткой десорбции. При поверхностной стерилизации корней повторно зараженного растения в гомогенате корней также содержались сахаролитические *Clostridium*. Это свидетельствует о том, что колонизация корней анаэробными азотфиксаторами в условиях гнотобиотической системы происходит на поверхности и внутри корней.

Все выделенные после поверхностной стерилизации штаммы *Clostridium* обладали нитрогеназной активностью (табл. 2).

Изложенное выше дает основание рассматривать сахаролитические азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium* как микросимбионты яровой пшеницы. В то же время необходимо отметить, что ассоциация между яровой пшеницей и сахаролитическими *Clostridium* не является закрытой, поскольку при использовании методов анализа ризопланы яровой пшеницы нами было выделено еще несколько типов неидентифицированных азотфиксирующих бактерий.

Нитрогеназная активность сахаролитических Clostridium, выделенных из корней яровой пшеницы

№ культуры Clostridium spp.	Сорт пшеницы	Стерилизующий агент	Продолжительность стерилизации, мин	Активность азотфиксации (ацетиленредукции), иг $C_2H_4 \cdot 10$ мл среды - сут ⁻¹
T4	Ершовская 32	Диацид	5	832—8 208
T8	Саратовская 29	10 % NaOCl	6	3276
T21	Ершовская 32	Диацид	5	567—6 228
T23	»	»	5	14 184
T32	»	»	90	4 248
T42	»	70% H ₂ SO ₄	5	8 280
T43-I	»	»	5	3 276
T43-II	»	»	5	7 344
T46-I	Саратовская 29	12,5 % H ₂ O ₂	10	3 024
T46-II	»	»	10	3 888
T47-I	»	»	10	18—200
T47-II	»	»	10	11 736
T55	»	0,25 % NaOCl	60	6 264
T57	»	4 % »	60	26
T60	»	10 % »	6	998
1*				6 588
15**				5 580

* Cl. pasteurianum.

** Cl. butyricum.

Установив наличие ассоциативных взаимоотношений Clostridium с яровой пшеницей, мы определяли, насколько велика численность сахаролитических Clostridium в зоне ризосферы, ризопланы пшеницы, насколько их количество зависит от фаз развития растений, имеется ли корреляция между численностью Clostridium и азотфиксацией в корневой зоне, а также биомассой растений и накоплением азота в них.

Численность азотфиксаторов в почве и ризосфере растений.

Результаты исследований, проведенных нами в полевых условиях, показали, что численность сахаролитических Clostridium в почве, окружающей корни, и на их поверхности зависит от фазы развития пшеницы. Численность анаэробных бактерий была максимальной в период интенсивного вегетативного роста растений — от кушения до цветения (табл. 3), что наиболее четко проявилось в благоприятный по экологическим условиям сезон 1983 г. Аналогичная картина отмечена нами ранее при выращивании яровой пшеницы Саратовской 42. Максимум численности Clostridium в прикорневой зоне пшеницы, кукурузы, овса наблюдали и другие исследователи [3, 11]. Численность Clostridium в корневой зоне, видимо, связана с корневыми выделениями растений, динамика количества которых носит аналогичный характер [10, 11]. В экссудатах пшеницы преобладают легкодоступные для микроорганизмов моносахара и аминокислоты [1]. Общее количество корневых выделений может достигать 1/3 вегетативной массы растений [10, 11] и обеспечивать энергетические затраты при азотфиксации.

Изменение численности азотфиксирующих Clostridium в ризосфере и ризоплане пшеницы по фазам развития в определенной мере совпадает с изменением активности несимбиотической азотфиксации в непосредственной близости от корней пшеницы. Исходя из этого можно предположить наличие зависимости между ассоциативной азотфиксацией у пшеницы и численностью анаэробных азотфиксаторов в зоне корней. Clostridium не являются единственным азотфиксатором, развивающимся на корнях и в непосредственной близости от них [21, 24, 25]. Поэто-

Динамика численности сахаролитических *Clostridium* (тыс. клеток в 1 г почвы)
в ризосфере и ризоплане яровой пшеницы сорта Ершовская 32.
Полевой опыт 1983—1984 гг.

Фаза развития	1983 г.		1984 г.		
	дата от- бора об- разца	ризосфера	дата от- бора об- разца	ризосфера	ризоплана
2 листа (1983 г.) и 3 листа (1984 г.)	4/V	13	17/V	13,6±10,5	3,3±1,8
Кущение	25/V	1 700±2 710	—	—	—
Выход в трубку	1/VI	1 660±1 440	1/VI	40 700±16 200	19 300±23 700
Колошение	16/VI	4 400±3 200	15/VI	14±11,5	0,2±0,1
Цветение	29/VI	2 310±7 20	21/VI	1 840±2 000	1 110±1 500
Молочная спелость	14/VII	332 ±645	—	—	—
Восковая спелость	27/VII	104±114	12/VII	2,7±2,0	1 250±110
Полная спелость	—	—	26/VII	52 ±57	123±110

Примечание. В 1983 г. в ризоплане яровой пшеницы сахаролитические *Clostridium* не обнаружены. Тире — анализ не проводили.

му интересен вопрос о вкладе той или иной группировки бактерий в азотное питание растения.

Методами количественного анализа азотфиксирующих бактерий представляется проблематичным в условиях полевого опыта однозначно определить истинный вклад анаэробных бактерий в азотный баланс растений, поскольку численность бактерий не всегда совпадает с их активностью.

Попытки определить активность анаэробной группировки азотфиксаторов по их отношению к кислороду [13] показали сложный характер изменения активности азотфиксации в почве в ответ на изменение содержания кислорода в газовой фазе. Поэтому данный прием также не дает однозначного ответа на вопрос о значимости определенной группировки диазотрофов в азотном балансе растения.

Очевиден только тот факт, что популяция сахаролитических *Clostridium* в корневой зоне яровой пшеницы развивается и функционирует по фазам развития растения. Данные о численности и активности популяции *Clostridium* в корневой зоне пшеницы позволяют предположить, что вклад этой группировки азотфиксаторов в азотное питание растения может быть существенным, что предстоит еще выяснить.

Накопление биомассы растениями, содержание в них азота и нитрогеназная активность в почве, ризосфере и ризоплане яровой пшеницы.

Активность фиксации азота в зоне корней пшеницы зависит от возраста растения. Так, в период цветения наблюдали максимальную нитрогеназную активность, которая составила $5,5 \cdot 10^{-4}$ нг C_2H_4 /г почвы в 1 ч, что на 2 порядка выше активности в фазы выхода в трубку и колошения. Это согласуется с данными ряда авторов [3, 11].

В связи с изложенным вполне закономерен вопрос, какие микроорганизмы ответственны за ассоциативную фиксацию азота на корнях злаков. Имеются сведения [11, 19, 21, 24, 25] о том, что ассоциативная азотфиксация у злаков может осуществляться различными представителями почвенной микрофлоры (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*). Состав ассоциантов определяется многими факторами, и в первую очередь растением-хозяином и типом почвы. Поскольку в каштановых и темно-каштановых почвах, занятых пшеницей, среди азотфиксирующих бактерий преобладают представители рода *Clostridium* [6], мы уделили основное внимание этой группировке почвенной микрофлоры.

Динамика накопления биомассы и содержания азота в яровой пшенице сорта Ершовская 32. Полевой опыт 1984 г.

Фаза развития растения и дата отбора проб (1985 г.)	Количество отобранных растений, шт.	Масса 1 растения, г	Содержание азота в 1 растении, %	Общее содержание азота в 1 растении, г
3 листа (17/V)	10	0,06	2,84	0,002
Выход в трубку (1 /VI)	10	0,93	2,36	0,022
Колошение (15/VI)	10	1,18	1,73	0,020
Цветение (21/VI)	10	1,90	1,40	0,027
Восковая спелость (12/VII)	12	1,53	1,24	0,019
Полная спелость (26/VII)	54	1,76	1,42	0,025

Интересно было выяснить, в какой зависимости находятся микробиологические характеристики группы сахаролитических *Clostridium*, нитрогеназная активность почвы, количество гидролизуемого азота в почве, накопление сухой биомассы растениями и содержание в них азота.

В полевом опыте (1984 г.) увеличение сухой биомассы надземной части было максимальным в период выход в трубку — цветение (табл. 4), что можно сказать и об увеличении содержания азота в растениях. Между тем количество легкодоступного азота в почве в данный период снижалось (табл. 5).

Тем не менее урожай зерна яровой пшеницы в нашем опыте при орошении и без применения азотных удобрений составил $34,5 \pm 2,5$ ц/га.

Необходимо учитывать, что при орошении в почве происходит интенсивная денитрификация и часть имеющегося азота не достигает растения. Возникает некоторый парадокс — пшеница накапливает значительное количество биомассы и азота в надземной части при крайне низком содержании его в почве. Видимо, растение должно обладать механизмом, позволяющим накапливать азот в условиях азотного голодания на стадиях интенсивного роста, например ассоциативная азотфиксация бактерий на корнях растений [11, 21, 25]. Вполне возможно, что при селекции пшеницы на урожайность и другие хозяйственно полезные признаки осуществлялся неконтролируемый отбор по признаку ассоциативной азотфиксации, восполняющей дефицит азота в растении. Уже имеются некоторые доказательства в пользу данного положения [8, 18, 20, 21]. Причем, видимо, эта взаимосвязь между микроорганизмами и растениями генетически обусловлена. Показана возможность воздействия на активность ассоциативной азотфиксации у пшеницы при помощи манипуляции с дисомной хромосомой [20, 21].

Таблица 5

Содержание NH_4^+ , NO_3^- (мг/кг) в почве под яровой пшеницей Ершовской 32. Полевой опыт 1983—1984 гг.

Фаза развития	1983 г.			1984 г.		
	дата отбора образца	NH_4^+	NO_3^-	дата отбора образца	NH_4^+	NO_3^-
3 листа	20/V	0,55±0,05	21,50±3,60	17/V	0,38±0,14	22,90±15,01
Выход в трубку	30/V	0,085±0,070	21,70±11,70	1/VI	1,36±0,22	9,18±6,09
Колошение	16/VI	0,50±0,0	13,86±0,0	15/VI	0,64±0,32	5,18±1,61
Цветение	29/VI 2	5,55±14,70	2,00±1,00	27/VI	0,50±0,06	4,07±0,18
Налив зерна	7/VII	2,40±0,0	2,77±0,0	—	—	—
Полная спелость	—	—	—	26/VII	3,64±1,19	3,47±1,04

Примечание. Тире — анализ не проводили.

Если сопоставить полученные нами данные о динамике количества сахаролитических *Clostridium* и активности азотфиксации (ацетиленредукции) в ризосфере и ризоплане яровой пшеницы с данными о динамике накопления биомассы (табл. 4), то можно видеть сходство в изменении этих показателей.

Таким образом, потребность пшеницы в азоте на этапах интенсивного его накопления частично удовлетворяется за счет ассоциативной азотфиксации популяцией бактерий, поселяющихся на корнях пшеницы, одним из активных членов которой являются сахаролитические *Clostridium*.

Итак, в результате проведенных исследований установлены ассоциативные взаимоотношения между рядом штаммов сахаролитических анаэробов рода *Clostridium* и яровой пшеницей. Значимость *Clostridium* как ассоциативных азотфиксаторов подтверждается результатами количественного учета сахаролитических анаэробов в почве, ризосфере и ризоплане яровой пшеницы, данными об активности азотфиксации (ацетиленредукции) в прикорневой зоне, динамике накопления биомассы яровой пшеницей и содержания общего азота в растениях.

В заключение авторы благодарят сотрудницу группы хроматографии лаборатории физико-химических методов исследования ИБФРМ АН СССР Ю. В. Гоголеву за техническую помощь при определении активности ацетиленредукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берестецкий О. А. Роль культурных растений в формировании микробных сообществ почвы. — Автореф. докт. дис. Л., 1982. — 2. Волкогон В. В. Способ определения активности азотфиксации в почве. — Микробиол. журн., 1984, т. 46, вып. 2, с. 89—91. — 3. Годова Г. В. Ассоциации анаэробных бактерий рода *Clostridium* в корневой зоне растений и их азотфиксирующая активность. — Автореф. канд. дис. М., 1983. — 4. Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 5. Калининская Т. А., Редьки на Т. В., Белов Ю. М. и др. Применение ацетиленового метода для количественного учета разных групп азотфиксаторов методом предельных разведений. — Микробиология, 1981, т. 50, № 5, с. 924—927. — 6. Калининская Т. А., Иванов Н. П., Трунова О. Н. Изучение активности азотфиксации в каштановой почве с помощью ацетиленового метода. — В сб.: Физиол.-биохим. исследования растений и микроорганизмов, 1982. Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 1982, с. 28. — 7. Мишустин Е. И., Емцев В. Т. Почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium*. — М.: Наука, 1974. — 8. Роденюк И. С., Гамзикова О. И. Ассоциативная азотфиксация в связи с генотипическим разнообразием высших растений. — 16-я конференция FEBS. Тез. докл. М., 1984, с. 237. — 9. Скрипаль И. Г., Малиновская Л. П., Онищенко А. И. Метод выделения микоплазм — возбудителей желтух растений. — Микробиол. журн., 1984, т. 46, № 1, с. 93—97. — 10. Умаров М. М. Значение несимбиотической азотфиксации в балансе азота в почве: Обзор. — Сер. биол., 1982, № 1. М.: АН СССР, с. 92—103. — 11. Умаров М. М. Ассоциативная азотфиксация (особенности, продуктивность, значение в азотном балансе почв). — Автореф. докт. дис. М., 1983. — 12. Усов Н. Н. Почвы Саратовской области. — Саратов: Облгиз, 1948, с. 362. — 13. Чумаков М. И. Воздействие различных факторов на нитрогеназную активность темно-каштановых почв Заволжья. — В сб.: Микроорганизмы, их роль в плодородии почвы и охране окружающей среды. М.: ТСХА, 1985, с. 26—31. — 14. Чумаков М. И., Емцев В. Т. Модификация определения потенциальной нитрогеназной активности почвы ацетиленовым методом в условиях анаэробноза. — М.: ТСХА, 1985, вып. 2, с. 190—192. — 15. Щеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Применение мини- и микроЭВМ при определении параметров дисперсных систем спектрофотометрическим методом. — Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 1984, с. 45. — 16. Baidapi V., Dobereiner I. — Soil. Biol. Biochem., 1980, vol. 12, p. 433—439. — 17. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Yackson E. K., Burus R. C. — Plant Physiol., 1968, vol. 48, N 8, p. 1185—1207. — 18. Hiroba G., Fujii T., Sano G., Iyama S. — Nature, 1978, vol. 276, p. 416—417. — 19. Holl F. B. — Can. J. Microbiol., 1983, vol. 29, p. 945—953. — 20. Rennie R. J., Larson R. — Can. J. Bot., 1979, vol. 57, p. 2771—2775. — 21. Rennie R. J. — In: Induced mutations as a tool for crop plant improvement. Interna. Atomic Energy Agency. Vienna, 1981, p. 293—321. — 22. Rennie R. J., Rennie D. A. — Can. J. Microbiol., 1983, vol. 29, p. 1022—1045. — 23. Scher F. M., Ziegler J. S., Klopper J. W. — Can. J. Microbiol., 1984, vol. 30, p. 151—157. — 24. Thomas-Bauzon D., Vveinhard P., Pillecourt P., Ballandreau J. — Can. J. Microbiol., 1982, vol. 28, p. 922—928. — 25. Vose P. V. — Can. J. Microbiol., 1983, vol. 29, p. 837—850.

Статья поступила 7 июля 1986 г.