

A-27479

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

На правах рукописи

ЧИСТЯКОВА
ИРИНА КОНСТАНТИНОВНА

УДК 631.34

АВТОФИКСИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ ПОЧВ РИСОВЫХ ПОЛЕЙ
(МИКРОБИОЛОГИЯ- 03.00.07)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

МОСКВА

- 1984 -

Азотобактер.

Работа выполняется в отделе почвенных микроорганизмов Института микробиологии АН СССР.

Научный руководитель: академик АН СССР Е.Н.Мизустин

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор В.Т.Емцев

доктор биологических наук В.И.Дуда

Ведущее учреждение: Московский Государственный Университет

Факультет почвоведения, кафедра биологии почв

Автореферат разослан "16" марта 1984 года

Защита состоится "18" апреля 1984 года в 13³⁰ часов на заседании Специализированного Совета Д.002.64.01 при Институте микробиологии АН СССР.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института

Приглашаем Вас принять участие в обсуждении диссертации на заседании Специализированного Совета или прислать отзыв на автореферат по адресу: Москва 117312 Проспект 60-летия Октября д.7 кор.2. Отзывы направлять в 2-х экземплярах, заверенных печатью.

Ученый секретарь Специализированного Совета, кандидат биологических наук

Л.Н.Москаленко

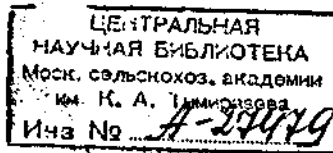
Актуальность проблемы. Для разработки теоретически обоснованных мероприятий по поддержанию и повышению плодородия почв, используемых под культуру риса, путем активизации процессов несимбиотической фиксации азота необходимо детальное изучение микроорганизмов, принимающих участие в этом процессе. Имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные явно недостаточны для подобных обобщений. Слабоизученными остаются такие вопросы как состав комплекса азотфиксаторов в почвах под рисом, особенности его функционирования в разных типах почв, пути превращения азота, связанного почвенными диазотрофами и т.д.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состояла в изучении закономерностей процесса несимбиотической фиксации азота в некоторых типах почв рисовников Советского Союза.

Конкретные задачи исследования были следующими:

1. Получить данные о распространении в почвах под рисом, помимо традиционно изучаемых групп, таких малоизученных диазотрофов как бактерии рода *Azospirillum*, водородокисляющие и метанотрофные бактерии. Изучить особенности физиологии этих азотфиксаторов.
2. Изучить состав комплекса диазотрофов некоторых типов почв рисовников.
3. С помощью ацетиленового и изотопного методов провести оценку азотфиксирующей активности микрофлоры изученных почв под рисом.
4. Исследовать закономерности использования азота, фиксированного почвенными бактериями, растениями риса.

Научная новизна работы. Впервые изучены особенности состава комплекса азотфиксирующих бактерий в зависимости от типа почв, используемых под культуру риса. Установлено, что наряду с традиционно исследуемыми азотфиксаторами такими как бактерии родов *Azotobacter* и *Clostridium*, значительное место в комплексе занимают не изученные ранее группы диазотрофов.



Впервые научно распространение в почвах рисовых полей бактерий рода *Azospirillum*, что вносит вклад в решение вопроса об экологии этих азотфиксаторов.

Впервые установлено, что комплекс диазотрофов почвы под рисом использует газообразные продукты анаэробного превращения органического вещества — метан и водород. Изучено распространение и показано участие в процессе несимбиотической фиксации азота в почвах рисовых полей мезофильных и водородокисляющих азотфиксирующих бактерий.

Практическая ценность исследования. Полученные экспериментальные данные расширяют представления о функционировании комплекса азотфиксаторов в почвах рисовых полей. Это дает обоснование для разработки практических приемов и рекомендаций по интенсификации процесса биологической фиксации азота и, в конечном итоге, повышению плодородия почв.

Изучение процесса несимбиотической фиксации азота в сильнозасоленных тапировидных почвах Казахской ССР является частью комплексного исследования, проводимого совместно с Институтом почвоведения АН КазССР, по использованию рисовой соломы в качестве мелиоранта для поддержания и повышения плодородия этих почв.

Данные о несимбиотической фиксации азота в почвах под рисом Краснодарского края включены в раздел по динамике соединений азота Отчета по хозяйству №72 Факультета почвоведения МГУ с Кубанским производхозом.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на конференции молодых ученых ИВМИ АН СССР, Закавказской конференции молодых ученых "Наука-сельскому хозяйству", Всесоюзной конференции молодых ученых "Повышение плодородия почв в условиях интенсификации земледелия", на Республиканской конференции "Структура и функции микробных сообществ почв с разной антропогенной нагрузкой".

на Всесоюзном совещании "Экологические последствия применения агрохимикатов, на VI Республиканской конференции почвоведов Казахстана, на VII Всесоюзном Баховском коллоквиуме по азотфиксации.

Публикации. Основные материалы диссертации опубликованы в 9 печатных работах.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 8 глав, заключения, выводов и списка литературы. Материалы малыжены на 190 страницах машинописного текста, включая 47 таблиц и 10 рисунков. Список литературы содержит 87 отечественных и 139 иностранных наименований работ.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Активность азотфиксации и численность диазотрофов определяли в образцах почв под рисом Краснодарского края, Казахской и Украинской ССР.

В Краснодарском крае исследования проводили с образцами лугово-черноземовидной и лугово-солончаковидной почв Прикубанского района, перегнойно-глеевой и луговой сильнозасоленных почв Темрюкского района. В Казахской ССР изучали слабо- и сильнозасоленную почву Акдалинского массива орошения в Южном Прибалхашье. В Украинской ССР исследовали образцы южного чернозема Одесской области и темно-каштановой почвы Крымской области.

Изучение азотфиксирующей активности почв. Азотфиксирующую активность изучаемых почв определяли ацетиленовым методом (Калининская с соавт., 1973). Навеску, соответствующую 5 г воздушно-сухой почвы, помещали в герметизированный стеклянный флакон. В газовую фазу с помощью шприца вводили ацетилен в количестве 10% по объему. Инкубацию вели при 26-28° в темноте в течение

ние 24 часов. Повторность определения трехкратная. Об азотфиксирующей активности судили по количеству образовавшегося этилена, которое определяли на газовом хроматографе "Хром - 3".

Сахара, органические кислоты и метанол вносили в виде водных растворов из расчета 2 - 5 мг на 1 г почвы. Измельченную солому и порошок целлюлозы вносили в количестве 5 мг на 1 г почвы равномерно во весь образец. Для оценки роли водородокисляющих азотфиксаторов инкубацию вели в атмосфере газовой смеси, состоящей из 40% водорода, 10% углекислого газа и 50% воздуха. Для создания анаэробных условий почву инкубировали в атмосфере аргона.

Изотопный метод (Калининская, 1971) использовали для изучения влияния метана на азотфиксирующую активность комплекса почвенных бактерий и в некоторых других случаях.

Определение количества азотфиксирующих бактерий. Количественный учет аэробных дiazотрофов вели методом предельных разведений с помощью ацетиленового теста (Калининская с соавт., 1982). Для учета общей численности аэробных азотфиксаторов использовали глицеро-автолизатную среду и безазотную среду с маламом. Количество бактерий рода *Aspergillus* учитывали на питательной среде с маламом. Для определения количества водородокисляющих и метилотрофных азотфиксаторов использовали жидкую безазотную среду с 50 мг дрожжевого автолизата на 1 л среды. Источником углерода для метилотрофов служил метанол, при учете количества водородокисляющих азотфиксаторов инкубацию вели в атмосфере водородной газовой смеси.

Учет количества облигатных (*Clostridium*) и факультативных (*Bacillus polymyxa*, *Enterobacter*) анаэробных дiazотрофов вели на жидких питательных средах способом предельных разведений. Использовали среды, где наблюдается совместное развитие облигатных и факультативных анаэробов (Федоров, Калининская, 1961)

и дифференциальные среды для определения количества сахаролитических клостридий (Емцев, 1965). Материал из пробирок, где был отмечен рост, проверяли на нитрогеназную активность ацетиленовым способом на жидкой безазотной среде с сахарозой в атмосфере аргона.

Расчет наиболее вероятного количества диазотрофов проводили по статистическим таблицам Мак-Кроди.

Методы изучения чистых культур азотфиксаторов. Выделение чистых культур азотфиксирующих бактерий проводили из материала накопительных культур с высокой нитрогеназной активностью на питательных средах с глюкозой, малатом, метанолом. Рассев проводили на чашках Петри с агаризованными питательными средами по методу Дригальского. Культуральные, физиологические, биохимические свойства культур азотфиксаторов изучали общепринятыми методами (Салибер, 1962; Бгоров и др., 1976; Skelton, 1959).

Идентификацию бактерий проводили по определителю Берги (Buchanan, Gibbons, 1974) и оригинальным статьям (Калининская, Нозавникова, 1977; Tarrand et al., 1978; Wiegand, Schlegel, 1976; Davis et al., 1969).

Изучение использования растениями риса азота, фиксированного почвенными бактериями. Образцы изучаемых почв увлажняли до 60-80% от полной влагоемкости, вносили глюкозу или целлюлозу в количестве 10 г на 1 кг почвы и инкубировали в течение 30 суток в эксикаторах, заполненных газовой смесью, состоящей из 30% $^{15}\text{N}_2$, 20% O_2 и 50% Ar . В результате деятельности почвенных азотфиксаторов происходило закрепление стабильного изотопа ^{15}N в почве. Обогащенную изотопом почву использовали в вегетационных опытах с растениями риса.

Определение общего содержания азота по Кьельдалю и массо-спектрометрическое определение его изотопного состава проводили в материале растений и почвы через 15, 30 и 60 суток после посева риса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Азотфиксирующая активность почв под рисом. Определение азотфиксирующей активности почв позволяет оценить суммарную деятельность всего комплекса почвенных диазотрофов. С помощью ацетиленового и изотопного методов было показано, что активность азотфиксации почв под рисом Краснодарского края, Казахской и Украинской ССР без дополнительного внесения источников углерода составляла в период затопления от 30 до 130 мкг азота на 1 кг почвы за 1 сутки.

Отмечена сезонная динамика азотфиксирующей активности почвенной микрофлоры. Максимальные величины активности были определены в период цветения риса, что согласуется с литературными данными (Малининская, 1977; Fujii et al., 1979).

Внесение в почву рисовой соломы оказывает многостороннее положительное влияние как на растения риса, так и на микроорганизмы почвы. Одним из важнейших аспектов повышения почвенного плодородия в этом случае является активизация деятельности несимбиотических азотфиксаторов почвы (Мишустин с соавт., 1977).

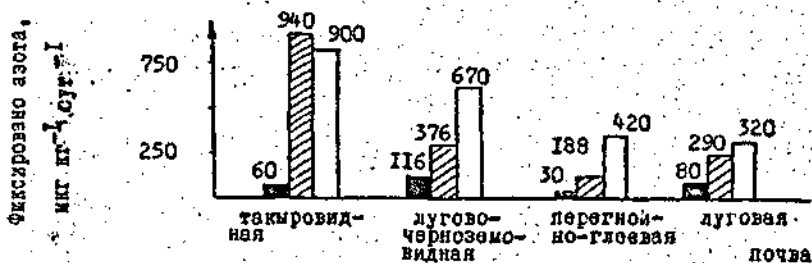


Рисунок 1. Влияние соломы и целлюлозы на азотфиксирующую активность почв, определенную ацетиленовым методом.

■ контроль ▨ солома □ целлюлоза

В лабораторных опытах это проявляется в значительном возрастании азотфиксирующей активности почв после внесения соломы (рис. I). Продуктивность использования соломы азотфиксаторами почв под рисом составляла от 2,8 до 6,9 мг азота на I г, а целлюлозы - 3,0 - 10,3 мг азота.

2. Использование метана, метанола и водорода азотфиксаторами почв под рисом. Образование метана и водорода в затопленных почвах под рисом связано с микробным превращением органического вещества в анаэробных условиях.

В литературе имеются данные о возрастании общего содержания азота в почве, на которую воздействовали природным газом (Нагрег, 1939) и чистым метаном (Davis et al., 1964). Высказано предположение, что это увеличение связано с деятельностью метанооксиляющих азотфиксирующих бактерий (Davis et al., 1964).

Однако, до настоящего времени отсутствовали количественные данные о влиянии метана на азотфиксирующую активность комплекса почвенных бактерий. Это не позволяло делать выводы о возможной роли метилотрофных бактерий в процессе фиксации атмосферного азота микроорганизмами почвы.

Микроорганизмы почв под рисом обладают высокой потенциальной активностью окисления метана. Скорость его окисления, определенная методом газовой хроматографии, составляла 0,06-0,08 мг метана на I г почвы за I сутки. Количество метанооксиляющих бактерий, определенное методом предельных разведений и методом посева на агаризованные среды, варьирует от 2,5 тыс до 6 млн клеток на I г почвы в зависимости от типа почвы.

С помощью изотопного метода впервые получены количественные данные о потенциальной азотфиксирующей активности комплекса азотфиксаторов почв под рисом за счет окисления метана. Инкубация в атмосфере газовой смеси, содержащей метан, приводила к увеличе-

нию азотфиксирующей активности комплекса почвенных микроорганизмов в 10-100 раз, достигая 30-45 мг азота на 1 кг почвы за 30 суток инкубации, тогда как в образцах, инкубированных без метана, количество фиксированного азота не превышало 0,3-1,2 мг на 1 кг. Наибольшие прибавки фиксированного азота были определены для южного чернозема (табл. I). Продуктивность азотфиксации при использовании метана комплексом почвенных бактерий составляла 10-12 мг азота на 1 г окисленного метана.

Таблица I. Влияние метана на азотфиксирующую активность почв под рисом, определенную изотопным методом.

Почва	Общее содержание азота, мг кг ⁻¹	Контрольная газовая смесь		Газовая смесь с метаном	
		избыток ¹⁵ N ат. %	фиксировано, мг азота кг ⁻¹ 30 сут. -I	избыток ¹⁵ N ат. %	фиксировано, мг азота кг ⁻¹ 30 сут. -I
Лугово-черноземовидная	2000	0,023	1,15	1,499	32,33
Перегнойно-глебовая	3370	0,003	0,25	0,707	26,46
Луговая	1910	0,010	0,76	0,874	18,35
Южный чернозем	1930	0,019	0,92	2,129	45,65
Темно-каштановая	1660	0,015	0,63	0,533	9,89
Такировидная	840	0,013	0,27	0,787	7,34

* 30% ¹⁵N₂, 20% O₂, 50% Ar; * ¹⁵N в N₂ составлял 40%

** 30% ¹⁵N₂, 20% O₂, 10% CH₄, 40% Ar; * ¹⁵N в N₂ составлял 90%

Наиболее вероятными причинами возрастания азотфиксирующей активности почв при инкубации с метаном на наш взгляд представляются активизация деятельности метаноокисляющих азотфиксаторов и активизация деятельности гетеротрофных азотфиксаторов, трофически связанных с метаноокисляющими микроорганизмами.

В настоящее время показано, что азотфиксирующей активностью обладают многие представители облигатных метаноокисляющих бактерий (Романовская *с соавт.*, 1981; Davis *et al.*, 1964; Whittenden *et al.*, 1970; de Vont, Mulder, 1974). Изучено распространение в водах водоемов метаноокисляющих азотфиксаторов *Methylosinus sporium*, и *Meth. trichosporium* (Саралов *с соавт.*, 1980).

Развитие метаноокисляющих микроорганизмов происходит в тесной ассоциации с гетеротрофной микрофлорой, в том числе азотфиксирующей. Развитие метаноокисляющих организмов в условиях затопленной почвы приводит к образованию недоокисленных продуктов, таких, например, как метанол. Внесение метанола в почву в количестве 0,2% по весу в значительной мере стимулирует процесс несимбиотической азотфиксации, увеличивая количество фиксированного азота в 2-100 раз (табл. 2).

Образование водорода в почвах под рисом связано с деятельностью анаэробных бактерий. Микрофлора почв под рисом окисляет водород, используя образующуюся энергию на метаболические процессы, в том числе на связывание молекулярного азота. В табл. 2 приведены результаты определения азотфиксирующей активности почв рисовников при инкубации в атмосфере газовой смеси, содержащей водород и углекислый газ. Количество связанного азота значительно возросло по сравнению с образцами, инкубированными на воздухе.

Таблица 2. Влияние метанола и водорода на азотфиксирующую активность почв под рисом, определенную ацетиленовым методом.

Почва	Фиксировано азота, мг кг ⁻¹ сут. ⁻¹		
	контроль	метанол	водород
Клный чернозем	0,02	0,32	0,11
Такировидная	0,09	0,21	0,56
Лугово-черноземовидная	0,01	0,94	0,69
Лугово-солончаковидная	0,03	1,16	0,85
Перегночно-глеевая	0,01	0,75	н.о.*

* не определяли

3. Распространение в почвах под рисом бактерий рода *Azospirillum* водородокисляющих и метилотрофных азотфиксаторов.

Аэробные азотфиксирующие бактерии являются важной частью комплекса почвенных дiazотрофов рисовняков. Имеющиеся в литературе данные об их распространении, количестве и возможной роли в азотном балансе этих почв довольно ограничены.

Полученные данные о численности бактерий рода *Azospirillum* в почвах под рисом (табл.3) вносят вклад в решение вопроса об экологии этих бактерий. Как показывают проведенные исследования, количество азоспирилл в изученных почвах было от 2 до 200 тыс. клеток на 1 г почвы, что составляет от 1 до 20% от общей численности аэробных азотфиксаторов. Наибольшие величины численности азоспирилл были определены в лугово-черноземовидной почве Краснодарского края, которая является незасоленной и содержит довольно высокое количество органического вещества. Практически не были обнаружены азоспириллы в сильнозасоленных почвах Казахской ССР.

Впервые получены количественные данные о распространении

в почвах под рисом азотфиксирующих бактерий, окисляющих водород и использующих метанол (табл. 3). Показано, что они присутствуют во всех изученных почвах под рисом, но количество их различно. В большинстве изученных образцов почв численность метилотрофных и водородокисляющих азотфиксаторов невелика и составляет от 2 до 60 тно. клеток на 1 г почвы. В тапировидной сильнозаболенной почве Казахской ССР в период вегетации риса эти азотфиксаторы являются ведущими по численности группами аэробных дiazотрофов. Количество их достигает 2,5-4,5 млн клеток на 1 г почвы.

Таблица 3. Количество аэробных азотфиксирующих бактерий в почвах под рисом.

Почва	Количество азотфиксаторов, в 10^3 клеток г ⁻¹		
	<i>Azospirillum</i>	водород- окисляющие	метанол- усваивающие
Луговая	250,0	2,5	250,0
Перегнойно-глиеая	60,0	6,0	25,0
Лугово-черноземовидная	95,0	60,0	450,0
Жилый чернозем	70,0	25,0	25,0
Тапировидная	0	2500,0	2500,0

Азотфиксирующие бактерии, учитываемые на среде с метанолом, не являются метанокисляющими. В состав активных азотфиксирующих ассоциаций, усваивающих метанол, часто входят бактерии *Xanthobacter flavus*. Кроме того, в состав ассоциаций входят представители родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, почкующие бактерии.

4. Структура комплекса азотфиксаторов в почвах под рисом.

Определение количества азотфиксаторов той или иной группы не дает однозначного ответа о ее роли в обеспечении почвы азотом. Для создания целостного представления необходимо располагать данными о большом наборе групп диазотрофов. В настоящей работе была предпринята попытка оценить различия в составе комплекса азотфиксаторов различных типов почв рисовых полей и при изменении внешних условий. Для этого определяли количество достаточно большого набора аэробных и анаэробных групп азотфиксаторов.

Использованный подход позволял выявить особенности в соотношении между изученными группами азотфиксаторов в разных типах почв под рисом (рис. 2). Для южного чернозема Украинской ССР характерно значительное преобладание анаэробных кластридиальных азотфиксаторов над аэробными группами. В лугово-черноземовидной, луговой и перегнойно-глеевой почвах Краснодарского края наблюдается примерное численное равновесие между аэробными и анаэробными группами. В такыровидных сильнозасоленных почвах Казахской ССР численно преобладают аэробные группы, среди которых ведущее место принадлежит факультативным водородоксилирующим и метилотрофным азотфиксаторам *Xanthobacter flavus*. Отмеченное различие может быть объяснено такими особенностями почв как различие в содержании гумуса, количестве растворимых солей, механическом составе.

В вегетационных и модельных опытах изучали изменения в составе комплекса азотфиксаторов почв рисовых полей при воздействии на них различных внешних факторов.

На примере сильнозасоленной такыровидной почвы Казахской ССР было показано, что при вовлечении целинной почвы в севооборот риса уже за один вегетационный сезон происходят значительные изменения в количестве и соотношении азотфиксаторов изученных

группы. В целинной почве численность всех изученных азотфиксаторов очень низка. В почве под рисом наблюдается увеличение численности всех изученных групп и, в то же время, можно выделить ведущие по численности группы. Такими группами являются аэробные мезофильные и водородокисляющие азотфиксаторы.

В вегетационных опытах на такыровидной слабозасоленной и темно-каштановой почвах изучены динамика азотфиксирующей активности и численности диазотрофов при внесении соломы.

В модельных опытах с лугово-черноземовидной почвой исследованы изменения в составе комплекса азотфиксаторов при компостировании с целлюлозой. Отмечено, что наблюдается значительное увеличение количества всех изученных азотфиксаторов. Это связано с тем, что фактором, лимитирующим развитие диазотрофов в почве, является наличие и доступность источников углерода (Мишустин, Шильникова, 1968; Hirota et al., 1978).



Рисунок 2. Структура комплекса азотфиксаторов почв под рисом.

□ аэробные диазотрофы ■ анаэробные диазотрофы
 1- на среде с малактом; 2- окисляющие водород; 3- усваивающие метанол; 4- на пептонно-дрожжевой (п-д) среде с глюкозой; 5- на п-д среде с крахмалом; 6- на 5% кукурузной среде.

Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными об увеличении численности аэробных (Востров, Долгих, 1970) и анаэробных (Rice, Paul, 1972) групп азотфиксаторов при внесении соломы и целлюлозы в почвы рисовников.

5. Азотфиксирующие бактерии, выделенные из почв, занятых посевами риса.

Чистые культуры азотфиксирующих бактерий выделяли из накопительных культур на глюкозо-автолизатной, малятной и среде с метанолом для азотфиксаторов. Для оценки нитрогеназной активности использовали ацетиленовый тест.

Из почв рисовых полей нами было выделено 36 штаммов бактерий, азотфиксирующая активность которых составляла от 10 до 280 нм C_2H_4 мг источника углерода⁻¹ сут.⁻¹. Бактерии были идентифицированы как представители родов *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* (Buchanan, Gibbons, 1974).

В коллекции кроме того имеется 4 штамма *Azospirillum brasilense* (Krieg et al., 1978) и 7 штаммов *Xanthobacter flavus* (Калининская, Ножвинникова, 1977; Wiegand, Schlegel, 1976).

Из образцов сильнозаболевших тапировидных почв Казахской ССР нами выделено 3 штамма бактерий, которые являются новой формой азотфиксаторов. По активности азотфиксации и ряду физиолого-биохимических свойств она близка к бактериям рода *Azospirillum*. Согласно определителю Берги-8 наиболее близким аналогом является *Alcaligenes eutrophia*. Сравнительная характеристика названных организмов приведена в табл. 4.

Выделенные нами чистые культуры азотфиксирующих бактерий были использованы в работе по изучению особенностей их физиологии и биохимии.

Таблица 4. Сравнение свойств азотфиксирующей культуры *Alcaligenes paradoxus* с типовыми штаммами.

№ п/п	Признаки	<i>Alcaligenes paradoxus</i> шт. T2, T4, T5	<i>Alcaligenes paradoxus</i> (Davis et al., 1969)	<i>Azospirillum brasilense</i> (Krieg et al., 1978)
I	Морфология	Палочки 1,3-2,4-1,5-2,6 мкм	Палочки 0,5-1,2-1,5-2,6 мкм	Слегка изогнутые палочки 0,3-0,8-1,1-2,3 мкм
2	Характер агутикования	2-6 перетрихальных агутика	1-2 (редко 3-4) перетрихальных агутика	Множественное перетрихальное агутикование
3	Окраска по Граму	отрицательная	Отрицательная	Отрицательная
4	Азотфиксирующая активность	6-10 мг азота на 1 г источника ка углерода	Не описана	7-12 мг азота на 1 г источника углерода
5	Образование спор	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
6	Характер метаболизма углеводов	Дыхательный	Дыхательный	Дыхательный
7	Потребность в факторах роста	Не нуждаются	Не нуждаются	Не нуждаются
8	Наличие оксидазы (тест Ковача)	Положительный	Положительный	Положительный
9	Гидролиз мелатина и крахмала	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
10	Оптимальные температуры	20-35°	30°	20-40°
II	Автотрофный рост ($N_2+O_2+CO_2$)	Не описан	Биотип I	Отдельные штаммы
12	Содержание Г+Ц в ДНК	69-70 мол.%	68-70 мол.%	67-69 мол.%

С помощью ацетиленового метода изучено влияние источников углерода на нитрогеназную активность *Azospirillum* шт. БРК и *Alcaligenes paradoxus* шт. Т2, Т4 и Т5 (табл. 5). Показано, что наибольшие величины активности получены при использовании глюкозы, яблочной и молочной кислот.

Таблица 5. Нитрогеназная активность азотфиксирующих бактерий, выделенных из сильнозасоленных тамбовских почв.

Культуры	мм C ₂ H ₄ мг ⁻¹ сут. ⁻¹				
	глюкоза	яблочная кислота	молочная кислота	уксусная кислота	масляная кислота
<i>Azospirillum brasilense</i>			0		
шт. БРК	56	235	280	37	0
<i>Alcaligenes paradoxus</i>					
шт. Т2	80	115	86	74	160
шт. Т4	240	112	194	45	60
шт. Т5	285	167	285	0	0

Изучено влияние температуры инкубации на нитрогеназную активность бактерий. Показано, что наибольшие величины активности отмечаются при 25-35°. Интересным является факт высокой нитрогеназной активности у *Azospirillum brasilense* шт. БРК при 40°. При 5 и 45° наблюдали полное подавление азотфиксации.

Так как основная часть штаммов азотфиксаторов была выделена нами из сильнозасоленных почв, особый интерес представляло изучение влияния повышенного содержания солей в питательной среде на их азотфиксирующую активность.

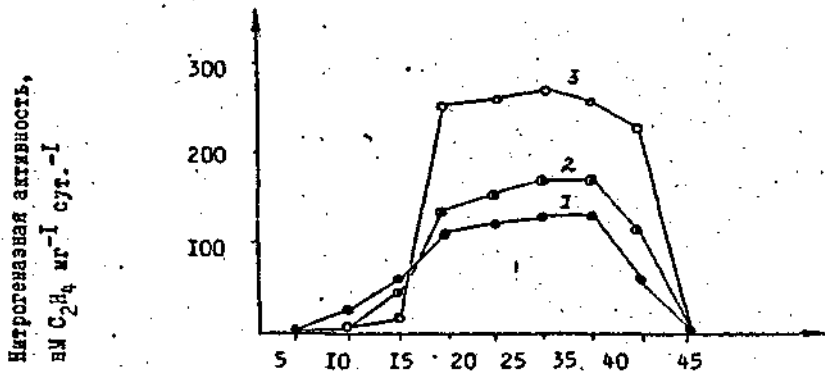


Рисунок 3. Влияние температуры инкубации на азотфиксирующую активность бактерий на среде с малатом.

- 1- *Xanthobacter flavus* шт. I2X
- 2- *Alcaligenes paradoxus* шт. T4
- 3- *Azospirillum brasilense* шт. БрК

Результаты изучения влияния повышенных концентраций NaCl на нитрогеназную активность бактерий приведены в табл. 6. Особенно интересными, на наш взгляд, представляются данные, полученные для штаммов *Xanthobacter flavus* и *Alcaligenes paradoxus*. Высокие величины азотфиксирующей активности определены на питательной среде, содержащей 2,5% NaCl. Отмеченное свойство, вероятно, обуславливает широкое распространение азотфиксаторов этих групп в сильнозасоленных почвах.

Таблица 6. Влияние концентрации хлористого натрия на нитрогеназную активность бактерий, определенную ацетиленовым методом.

Культуры	нм C ₂ H ₄ мг ⁻¹ сут. ⁻¹				
	Концентрация NaCl		в среде с малатом		
	0%	1%	2,5%	4%	6%
Azospirillum					
brasiliense					
шт. БРК	180	0	0	0	0
шт. БРВН ⁴	276	0	0	0	0
Alcaligenes					
paradoxus					
шт. Т2	144	III	12	0,9	0
шт. Т5	176	101	15	0,6	0
Xanthobacter					
flavus					
шт. 663	108	н.о. ^ж	18	2,1	0
шт. 121	69	н.о.	45	1,2	0
шт. ВНХ	84	н.о.	14	0	0
шт. К10Г	82	н.о.	2,1	0,6	0
шт. П1	56	н.о.	17	0	0

ж не определяли

6. Использование растениями риса азота, фиксированного почвенными бактериями. Интерес к симбиотической фиксации атмосферного азота в почве в значительной мере определяется тем, что азот, связанный почвенными бактериями, эффективно используется сельскохозяйственными растениями. Для получения достоверной картины распределения "биологического" азота в системе почва-растение нами были проведены вегетационные опыты с растениями риса на почве, обогащенной стабильным изотопом ¹⁵N, за счет деятельности азотфиксирующих бактерий.

Таблица 7. Включение ¹⁵N, фиксированного почвенными бактериями, в растения риса (% от исходного содержания в почве)

Почва	Сутки после посева	Первый год наблюдения			Второй год наблюдения	Сумма за два года
		15	30	60	60	
Темно-каштановая		15,54	18,42	19,67	7,54	27,21
Лугово-черноземовидная		11,21	13,04	15,80	9,31	25,11

Определение количества ¹⁵N в катришле растений показало, что наблюдается быстрое усвоение растениями азота, фиксированного почвенными дiazотрофами. Особенно активно этот процесс идет на начальных стадиях развития растений. За первые 15 суток после посева растения риса использовали более половины того количества азотного азота, который был усвоен ими за два месяца вегетации. В первый год наблюдения растения использовали от 15 до 20% "биологического" азота, а за два года - 25-27%.

Часть азота, связанного почвенными бактериями, теряется в результате деятельности нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий. Эти потери были значительно выше в вариантах опыта без растений. В опыте с растениями риса потеря составляла от 12 до 25%, а в опытах без растений - 34-40%.

Значительная часть азота, фиксированного почвенными бактериями, закрепляется в почве. После первого года наблюдения в составе органического вещества почвы закрепляется 68-83% ^{15}N , а через два года - 47-61%. Азот, связанный почвенными бактериями, распределяется примерно поровну между легко и трудногидролизуемыми фракциями почвенного гумуса (Калининская, 1978). Таким образом, азот, фиксированный микроорганизмами почвы, не только является доступным источником питания для сельскохозяйственных растений, но в значительной степени закрепляется в составе почвенного гумуса. Это ведет к стабилизации содержания гумуса в почве и способствует поддержанию и повышению плодородия почв, используемых под культуру риса.

ВЫВОДЫ

1. Наряду с традиционно изучаемыми группами дiazотрофов, такими как бактерии родов *Azotobacter* и *Clostridium*, в почвах под рисом обнаружены новые формы азотфиксаторов. Показано, что в изученных почвах широко распространены бактерии рода *Azoeripillum*, а также метилотрофные и водородокисляющие азотфиксаторы.

2. Для разных типов почв рисовых полей характерно определенное соотношение между изученными группами дiazотрофов. В южном черноземе Украинской ССР ведущее место в комплексе азотфиксаторов занимает бактерия рода *Clostridium*. В сильнозасоленных тапировидных почвах Казахской ССР преимущественное развитие получает факультативная бактерия рода *Azoeripillum*.

тивно мезофильные и водородокисляющие азотфиксаторы

Xanthobacter flavus.

3. Впервые показано, что распространенные в тапировидных почвах бактерии *Alcaligenes eutrophae* способны фиксировать молекулярный азот. Характерными особенностями их физиологии является также солеустойчивость и повышенный температурный оптимум нитрогеназной активности.

4. Дана оценка актуальной азотфиксирующей активности микрофлоры почв, используемых под культуру риса. Комплекс азотфиксаторов почв без внесения дополнительных источников углерода связывает от 60 до 120 мг азота на кг почвы за сутки, что свидетельствует о высокой азотфиксирующей активности.

5. Установлено, что наблюдается значительное увеличение азотфиксирующей активности комплекса азотфиксаторов почв рисовых полей при использовании дополнительно внесенных источников углерода и энергии, в том числе и газообразных. Продуктивность азотфиксации при использовании сахаров и органических кислот равняется 4,7-14,5 мг азота, целлюлозы - 3,0-10,3 мг, соломы - 2,8-6,9 мг, метана - 10-12 мг на 1 г источника углерода.

6. Показано, что азот, связанный почвенными бактериями, усваивается растениями на 25-27%. До 50-60% фиксированного азота закрепляется в почве, что ведет к поддержанию ее плодородия.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Чистякова И.К., Калининская Т.А., Миллер Ю.М. Метан как источник углерода и энергии для азотфиксирующих бактерий в почвах под рисом. - Изв. АН СССР Сер. Биол., 1982, № 3, с. 428-431

2. Чистякова И.К., Калининская Т.А. Определение количества мезофильных азотфиксирующих бактерий в почвах под рисом. - Микробиология, 1982, т. 51, № 6, с. 1013-1015

3. Нелидов С.Н., Чистякова И.К., Калининская Т.А. Органические микродоты в затопленной почве как энергетический субстрат для несимбиотических азотфиксаторов. - Изв. АН СС КазССР Сер. биол., 1982, № 2, с. 63-65

4. Чистякова И.К. Метилотрофные азотфиксирующие бактерии как компонент микробного ценоза почвы под рисом. - В сб.: Макроорганизмы как компонент биогеоценоза. Алма-Ата: Изд-во КазГУ, 1982, с. 167

5. Чистякова И.К., Калининская Т.А., Миллер Ю.М. Использование ¹⁵N для изучения превращений азота, связанного несимбиотическими азотфиксаторами, в системе почва-растение. - В сб.: Экологические последствия применения агрохимикатов. Пушкино: Изд-во ОНТИ НЦС, 1982, с. 43-44

6. Чистякова И.К. Анаэробные азотфиксирующие бактерии в почвах под рисом. - В сб.: Анаэробные микроорганизмы, тезисы докладов Всесоюзного совещания. Пушкино, 1982, с. 42-43

7. Чистякова И.К., Калининская Т.А. Аэробные азотфиксирующие бактерии почвы рисовых полей. - Изв. АН СССР Сер. биол., 1984, № 1, с. 149-153

8. Чистякова И.К., Калининская Т.А. Активность азотфиксации и численность дназотрофов при освоении тапировидной почвы под культуру риса. - Микробиол. ж., 1983, № 6, с. 12-16

9. Чистякова И.К., Калининская Т.А. Фиксация азота в тапировидных почвах под рисом. - Микробиология, 1984, т. 53, № 1, с. 123-128

Подписано в печать 1.02.84г. Т-04729 Вак 90 тир. 150
Типография Всесоюзного бюро пропаганды микомискусства