

О ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ АЗОТОБАКТЕРА С *CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM* В ПОЧВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Р. С. ГОЛОВАЧЕВА

Взаимоотношения азотобактера с *Clostridium pasteurianum* привлекали внимание целого ряда исследователей. Уже в первые годы изучения азотфиксирующих микроорганизмов отмечалась жизненность ассоциаций аэробных и анаэробных азотфиксаторов [1. 19–21].

Эксперименты ряда авторов [2. 9, 16, 17, 22, 23] показали, что эффективность усвоения молекулярного азота азотобактером и клостридием в смешанных культурах выше, чем в монокультурах.

При выращивании таких сельскохозяйственных культур, как овес [14], просо и пшеница [2], капуста и помидоры [4] совместное применение азотфиксаторов оказало также более сильное влияние на урожайность, чем раздельное.

Одна из основных причин высокой эффективности азотфиксации в совместных культурах азотобактера и клостридия заключается в том, что энергетическое вещество среды в силу некоторой противоположности свойств азотфиксаторов расходуется наиболее экономно [9. 16]. Азотобактер способен использовать в виде солей продукты метаболизма клостридия — уксусную и масляную кислоты, в то же время слизь, вырабатываемая азотобактером и покрывающая его клетки, может служить прекрасным энергетическим материалом для маслянокислого брожения.

Установлено, что в смешанных культурах азотобактера и клостридия стимулируется энергия размножения обоих микроорганизмов [2. 15–17].

Однако, как показывают некоторые наблюдения, взаимное благоприятное влияние азотфиксаторов имеет место лишь при определенных дозировках посевного материала [16].

То, что соотношение азотобактера и клостридия в почве имеет большое значение с точки зрения эффективности азотфиксации подчеркивается также в работе [6].

Ко всему вышеизложенному имеет непосредственное отношение вопрос о сравнительной эффективности почвенного и агарового азотобактерина.

По наблюдениям ряда авторов, почвенный азотобактерин эффективнее агарового [3. 8, 18 и др.]. Причину этого названные исследователи видят в том, что азотобактер, вследствие длительного культивирования на агаровых средах, теряет приспособленность к существованию в почвенных условиях, в связи с чем при внесении в почву значительная часть его погибает.

Нам кажется, что такое объяснение не может быть исчерпывающим. Как ни странно, но до настоящего времени микробиологами полностью игнорировался факт присутствия в почвенных препаратах азотобактера другого азотфиксатора — клостридия, развитие которого в этих пре-

паратах неизбежно, поскольку готовятся они на нестерильной почве. На интенсивное же развитие клостридиума в почвенном азотобактерине указывалось уже ранее [10, 11].

Возникает вопрос, не является ли одной из основных причин более высокой эффективности почвенного азотобактерина по сравнению с агаровым то обстоятельство, что в почвенном азотобактерине, наряду с азотобактером, развивается и клостридиум.

С целью выяснения степени развития клостридиума в почвенном азотобактерине, приготовленном различными способами, а также для того, чтобы исследовать характер взаимоотношений обоих азотфиксаторов в почвенных препаратах, нами были проведены соответствующие опыты, описание которых приводится в настоящей работе.

Опыт 1. проводился в невысоких, плоских (60×50×12 см) ящиках, каждый из которых был наполнен 12 кг просеянной через частое сито полевой дерново-карбонатной почвы, в которую было внесено 0,02% $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$. Содержание общего азота в почве составляло 0,265%. Опыт состоял из двух серий, различавшихся тем, что в одном случае в почву было добавлено 2% сахара, а в другом нет. Азотобактер предварительно выращивался на агаровой среде Эшби, клостридиум — в высоком слое жидкой среды Виноградского. Клостридиум применялся в виде накопительной культуры, полученной путем многократных пересевов на селективную среду. Обе серии опыта имели следующие варианты: контроль (без внесения азотфиксаторов), клостридиум, клостридиум + азотобактер, азотобактер. Опыт проводился при комнатной температуре, длительность его равнялась 39 дням. С целью равномерного распределения азотфиксаторов по всему почвенному слою и усиления развития азотобактера почва во всех опытах ежедневно тщательно перемешивалась. Во избежание чрезмерно быстрого высыхания земли и попадания в нее пыли ящики покрывались стеклами. Для поддержания равномерной влажности почва в ящиках периодически увлажнялась. Почвенные пробы для микробиологических анализов брались после тщательного перемешивания. Результаты микробиологических наблюдений приведены в табл. 1.

Приведенные в этой таблице данные указывают прежде всего на то, что по динамике развития азотфиксаторы резко различались между собой. В то время как азотобактер развивался наиболее интенсивно в начальный период, клостридиум, как спороносный организм, отставал от него в своем развитии и в большинстве случаев достигал максимума лишь к концу опыта. Медленное размножение клостридиума по сравнению с азотобактером объясняется еще и тем, что исходное его содержание было во много раз ниже содержания азотобактера в соответствующих вариантах.

При внесении азотобактера в почву без добавления сахара наступало быстрое отмирание его клеток вследствие недостатка углеводов. Добавление сахара резко стимулировало развитие не только внесенного, но и спонтанного азотобактера.

Клостридиум также реагировал на добавление сахара интенсивным развитием, хотя и значительно более слабым, чем азотобактер.

Интересно отметить, что во всех вариантах серии без добавления сахара, в том числе и в контроле, численность клостридиума к моменту окончания опыта возросла. По-видимому, чрезвычайно низкое его исходное содержание в почве было обусловлено недостатком влаги и в какой-то мере менее благоприятными температурными условиями, так как использовавшаяся в опыте почва в течение длительного периода хранилась

в подвале, где температура была довольно низкой. В связи с этим возможно, что и общая микробиологическая активность почвы была невысока.

В обеих сериях опыта взаимное благоприятное влияние азотфиксаторов проявилось довольно ярко. Максимальной численности как азотобактер, так и клостридиум достигли при их совместном внесении. В этих вариантах наблюдалась и лучшая выживаемость клеток азотобактера. Однако и при раздельном внесении азотобактер стимулировал развитие спонтанного клостридиума, а последний, в свою очередь (особенно при внесении сахара), способствовал лучшему развитию спонтанного азотобактера.

Опыт 2 в принципе повторял первый, однако отличался от него тем, что был поставлен на более бедной азотом почве (0,165% общего азота) и включал в себя, наряду с сериями без углеводов и с сахаром, еще и серию с крахмалом, который вносился в количестве 2%. Продолжался он в течение 38 дней. Результаты его представлены в табл. 2.

В большинстве вариантов этого опыта развитие клостридиума происходило более интенсивно, а азотобактера, наоборот, менее интенсивно, чем в соответствующих вариантах первого опыта. Объясняется это несколько худшим кислородным режимом во втором опыте по сравнению с первым, так как почва второго опыта была тяжелее почвы первого, в связи с чем условия для клостридиума стали более, а для азотобактера менее благоприятными.

Кроме того, не исключена возможность, что азотобактер, будучи более требовательным к среде, чем клостридиум, во втором опыте испытывал недостаток и в некоторых элементах питания, поскольку почва в данном случае по сравнению с землей первого опыта была менее плодородна, о чем можно судить по приведенному выше содержанию общего азота в обеих почвах. Очевидно, вследствие указанных обстоятельств, взаимное влияние азотфиксаторов в описываемом опыте проявилось не столь четко, как в первом. Клостридиум оказал наиболее сильное влияние на азотобактер лишь при раздельном внесении в серии без добавления углеводов и при совместном внесении в серии с углеводами.

Внесение азотобактера совместно с клостридиумом в большинстве случаев тормозило развитие последнего. Причиной такого явления, видимо, было то, что на фоне недостатка некоторых элементов питания, азотобактер, интенсивно размножаясь, выступал в качестве конкурента клостридиума по отношению к этим элементам. Тем не менее при раздельном внесении азотобактер несколько усиливал развитие спонтанного клостридиума.

По литературным данным, азотобактер способен использовать крахмал в качестве энергетического материала.

Известно, что при внесении в почву этого углевода размножение азотобактера усиливается, хотя и менее заметно, чем при внесении таких углеводов, как маннит, глюкоза и др. [1]. В литературе отмечалось также, что азотобактер, используя крахмал, может хорошо расти и продуктивно фиксировать азот [10].

Относительно использования крахмала клостридиумом в литературе существуют противоречивые мнения. Некоторые авторы [1, 7, 9 и др.] считают, что он не способен сбраживать этот углевод. В то же время из данных ряда других исследователей [5, 12] видно, что некоторые штаммы клостридиума, в зависимости от их экологического происхождения, обладают способностью использовать крахмал.

Результаты описываемого опыта показывают, что в серии с крахмалом развитие азотобактера происходило лучше, чем в серии без углеводов, хотя и с меньшей интенсивностью, чем в серии с сахаром. На клост-

Таблица 2

Динамика развития азотфиксирующих бактерий в почвенных препаратах
(опыт 2)

Варианты опыта	Содержание бактерий, млн на 1 г почвы												
	Исходное		Через				Через						
	4	10	22	38	4	10	22	38	4	10	22	38	
суток													
<i>Clostridium pasteurianum</i>													
Без внесения углеводов	Азотобактер												
Контроль	0,0003				0,0003				0,0003				0,0003
Клостридиум	0,25	25,0	0,0025	0,0025	0,0025	0,3	0,0025	0,0003	0,0009	0,0067	0,0009	0,0004	0,0012
Клостридиум + азотобактер	0,25	0,6	0,025	0,025	0,025	0,25	0,025	0,025	13,63	0,021	0,007	0,0079	0,0019
Азотобактер	0,0003	0,25	0,25	0,025	0,025	0,25	0,025	0,025	13,63	0,030	0,007	0,011	0,0023
С внесением крахмала	Азотобактер												
Контроль	0,0003				0,0003				0,0008	0,017	0,2	0,038	0,058
Клостридиум	0,25	25,0	0,06	0,013	0,0003	2,5	0,013	0,0003	0,0008	0,023	0,027	0,031	0,037
Клостридиум + азотобактер	0,25	0,6	0,25	0,6	0,0025	0,6	0,6	0,0025	13,63	30,0	13,8	10,0	1,7
Азотобактер	0,0003	10,0	0,6	0,6	0,0025	0,6	0,6	0,0025	13,63	18,3	2,9	3,08	1,9
С внесением сахара	Азотобактер												
Контроль	0,0003				0,025				0,0008	1,09	52,6	20,3	17,5
Клостридиум	0,25	60,0	2,5	250,0	2,5	250,0	0,25	2,5	0,0008	28,0	82,0	88,6	58,0
Клостридиум + азотобактер	0,25	25,0	25,0	2,5	0,025	2,5	0,25	0,025	13,63	230,0	11,8	11,2	6,1
Азотобактер	0,0003	25,0	25,0	0,020	0,020	0,25	0,25	0,020	13,63	32,0	20,0	19,5	9,7

ридий внесение крахмала оказало сравнительно небольшое воздействие. Наблюдавшееся увеличение его содержания в некоторых вариантах, видимо, обусловлено не прямым, а скорее косвенным влиянием этого углевода — через посредство других микроорганизмов.

В качестве иллюстрации того, как могут складываться взаимоотношения азотфиксаторов в почве, в добавление к результатам вышеописанных опытов уместно привести данные микробиологических анализов одного проведенного нами, но неудавшегося вегетационного опыта. Опыт

Таблица 3

Зависимость развития азотобактера от степени развития клостридия в ризосфере кукурузы

Варианты опыта	Содержание азотфиксаторов, тыс. на 1 г абс. сухой ризосферной почвы	
	Клостридий	Азотобактер
Контроль	31,5	16,4
Местный штамм клостридия	72,0	33,6
Московский штамм клостридия	75,0	45,0

этот был поставлен с целью выяснения влияния двух штаммов клостридия (местного и московского*) на рост и развитие кукурузы. Почва, использовавшаяся для опыта, содержала наряду со спонтанным клостридием и спонтанный азотобактер. Испытывавшиеся культуры клостридия вносились в почву вместе с семенами. Микробиологический анализ ризосферной почвы, проведенный спустя 10 суток после

постановки опыта, показал, что увеличение численности клостридия в варианте с внесением его культур способствовало лучшему развитию и азотобактера (табл. 3).

Подводя итоги проведенным исследованиям, можно прийти к следующим выводам.

1. Внесение азотобактера в почву может в значительной мере стимулировать развитие спонтанного *Clostridium pasteurianum*. С другой стороны, обогащение почвы клостридием также может способствовать лучшему развитию спонтанного азотобактера.

Наиболее интенсивное развитие как аэробных, так и анаэробных азотфиксаторов в почве наблюдается при совместном внесении обоих видов микроорганизмов.

Взаимное благоприятное влияние азотфиксаторов проявляется не только в их лучшем развитии, но и в лучшей выживаемости.

2. Добавление к почве углеводов значительно усиливает развитие не только азотобактера, но и клостридия.

3. Исходя из результатов проведенных опытов, а также принимая во внимание литературные данные о взаимном благоприятном влиянии азотобактера и клостридия, можно заключить, что одной из причин более высокой эффективности почвенного азотобактерина по сравнению с агаровым является то, что в почвенном азотобактерине, кроме азотобактера, интенсивно развивается спонтанный клостридий, с которым у азотобактера устанавливаются тесные симбиотические взаимоотношения. Высокая эффективность почвенного азотобактерина объясняется, таким образом, деятельностью не одного только азотобактерина, но совместной деятельностью азотобактера с клостридием. Кроме того, не исключена возможность, что в почвенном азотобактерине возникают также симбиоти-

* Получен от Института микробиологии АН СССР.

ческие или метабиотические отношения азотфиксаторов с другими видами микроорганизмов, содержащимися в этом бактериальном удобрении.

Отсюда вытекает, что утвердившееся в последние годы в литературе название «азотобактерин» отвечает сущности лишь агарового препарата, но не почвенного, для которого целесообразнее было бы сохранить старое название «азотоген».

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградский С. Н., Микробиология почвы. Москва, 1952.
2. Возняковская Ю. М., Роль *Clostridium Pasteurianum* как фактора, повышающего эффективность бактериализации семян азотобактером. Микробиология, т. XVII, вып. 5, 1948.
3. Гербардт А. Г., Некоторые пути повышения эффективности азотобактерина. Вопросы применения бактериальных удобрений. Киев, 1953.
4. Гусев М. И. и Ремпе Е. X., Бактеризованные компосты повышают урожай овощей. Бюллетень научно-технической информации н.-и. ин-та овощного хозяйства, № 1, 1956.
5. Имшенецкий А. А. и Абдиевич Н. М., Адсорбция мелом бактериальных ферментов. Микробиология, т. XVII, вып. 6, 1948.
6. Цит. по Новак Б., Дворжаковой Г. и Горчаковой Я., Влияние естественных симбиозов азотобактера на усвоение молекулярного азота. За социалистическую сельскохозяйственную науку, Серия А. Агрономия-зоотехния, год изд. IV, № 2. Прага, 1955.
7. Красильников Н. А., Определитель бактерий и актиномицетов. М.—Л., 1949, стр. 649.
8. Образцова А. А. и др., Почвенный азотобактерин и его эффективность. Тр. Горьковск. с/х ин-та, т. VI, вып. 2, 1950.
9. Омелянский В. Л., Избранные труды, т. I. М., 1953, стр. 294—322.
10. Рахно П. X., Роль азотобактера в повышении урожайности полевых культур в почвенных и климатических условиях Эстонской ССР. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Таллин, 1953.
11. Рахно П. X., Об эффективности азотобактера. Земледелие, № 1, 1953.
12. Рыбалкина А. В., Микрофлора тундровых, подзолистых и черноземных почв Европейской части СССР. Изд. АН СССР, М., 1957.
13. Федоров М. В., Биологическая фиксация азота атмосферы. М., 1952.
14. Шкляр М. З., Влияние совместных культур азотобактера и *Clostridium Pasteurianum* на урожай овса в вегетационных опытах. Материалы диссертации на соискание ученой степени кандидата с/х наук. Л., 1947.
15. Шкляр М. З., Влияние *Clostridium Pasteurianum* на сохраняемость азотобактера в торфе. Материалы диссертации на соискание степени кандидата с/х наук. Л., 1947.
16. Шкляр М. З., Взаимное влияние азотобактера и *Clostridium Pasteurianum* в смешанной культуре. Тр. Всес. н.-и. ин-та с/х микробиол., т. XI, вып. 2, 1951.
17. Шкляр М. З., Влияние аэробов на жизнедеятельность *Clostridium Pasteurianum* в смешанной культуре. Докл. ВАСХНИЛ, вып. 8, 1956.
18. Янкаускас И. И., Применение местного азотобактера для повышения урожайности полевых культур в Литовской ССР. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата с/х наук. Каунас, 1956.
19. Veijerinsk. Цит. по Омелянскому В. Л., Избранные труды, т. I, М., 1953, стр. 315.
20. Freudenreich, E., Über stickstoffbindende Bakterien, Zbl. Bakteriол., Abt. II, Bd. 10, 1903.
21. Kruеeger. Цит. по Омелянскому В. Л., Избранные труды, т. I, М., 1953, стр. 315.
22. Lind, C., Wilson, P., Nitrogen Fixation by Azotobacter in Association with Other Bacteria. Soil Sci., Vol. 54, No. 2, 1942.
23. Warmbold, H., Untersuchungen über die Biologie stickstoffbindender Bakterien. Landwirtschaft. Jahrb., Bd. XXXV, H. 1/2. Berlin, 1906.

AZOTOBakteri JA *CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM*'I VAHELISTEST SUHETEST MULLAS

R. Golovatšova

Resümee

Kahe tähtsama õhulämmastikku siduva mullabakteri, aeroobse azotobakteri ja anaeroobse *Clostridium pasteurianum*'i vaheliste suhete uurimisega on tegelnud rida mikrobioloogid. Nende poolt avaldatud andmete kohaselt mõjutavad kõnesolevad bakteriliigid soodustavalt vastastikust arengut ja õhulämmastiku sidumist. Samuti on olemasolevaid andmeid steriliseerimata mullast valmistatud azotobakteri preparaadiid põllukultuuride väetamisel efektiivsemad kui steriilsel agarsöötmel paljundatud azotobakteri puhaskultuur, nn. agar-azotobakteriin.

Käesolevas töös esitatud katsetulemused näitavad, et mõlema eespool nimetatud nähtuse vahel on kindel side. Ühtlasi on võimalik teha järeldusi, nimelt:

1. Azotobakteri kultuuri lisamine mulda soodustab tunduvalt suurel määral spontaanse *Clostridium pasteurianum*'i arengut ja vastupidit.

Kõige intensiivsem on aeroobsete ja anaeroobsete õhulämmastikku siduvate bakterite areng mullas siis, kui viia sinna mõlema liigi kultuure.

Nimetatud bakterite vastastikune soodustav mõju ilmneb nii nende paremas arengus kui ka paremas säilimises.

2. Süsivesikute lisamine mulda soodustab tunduvalt mitte ainult azotobakteri, vaid ka *Clostridium*'i arengut.

3. Nii meie katsete kui ka kirjanduses ilmunud seisukohtade põhjal võib teha järelduse, et azotobakteri mullapreparaatide kõrge efektiivsus, võrreldes tema agarpreparaatidega, on tingitud spontaansest *Clostridium*'ist, mis azotobakteri kõrval areneb intensiivselt mullapreparaatides.

Vastavalt sellele võib viimastel aastatel kirjanduses levinud nimetust «azotobakteriin» pidada sobivaks vaid azotobakteri agarpreparaatidele, mitte aga mullapreparaatidele, mida ka edaspidi oleks otstarbekam nimetada endiselt «azotogeeniks».

Eesti Maaviljeluse Instituut

Saabus toimetusse
21. VI 1958

THE INTERCONNECTIONS OF THE AZOTOBACTER AND THE *CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM* IN THE SOIL

R. Golovachova

Summary

A number of biologists have dealt with the interconnections of the two most important nitrogen fixing bacteria, the aerobic Azotobacter and the anaerobic *Clostridium pasteurianum*. According to the available data, the above species of bacteria mutually stimulate their development as well as the fixation of nitrogen. On the basis of these data it has been proved that the Azotobacter preparations made of unsterilized soil are more effective as fertilizers of field cultures than the pure cultures of Azotobacter on sterile agar, the so-called Azotobacterin.

The results of experiments presented in this article show that both above phenomena are closely associated. At the same time they give the possibility of drawing the following conclusions:

1. The introduction of the culture of Azotobacter into the soil stimulates, to a great extent, the development of the spontaneous *Clostridium pasteurianum*, and vice versa.

Most intensive is the development of the aerobic and anaerobic nitrogen fixers in the soil in case of introduction of both of these bacteria into the soil.

The mutually stimulating influence of the above bacteria becomes apparent in their improved development as well as in their better preservation.

2. The addition of carbohydrates to the soil influences to a better advantage not only the development of the Azotobacter, but also that of the *Clostridium pasteurianum*.

3. The results of our own experiments, as well as the opinions expressed in the publications on that subject allow us to draw the conclusion that the high efficiency of the Azotobacter soil preparations, if compared to the agar preparations (of the same microorganisms) is due to the spontaneous *Clostridium pasteurianum* that develops intensively at the side of the Azotobacter in soil preparations.

In accordance with the above facts, the term «Azotobacterin», widely spread in the literature of the recent years, may be regarded as suitable only if applied to the agar preparations of the Azotobacter, and not to soil preparations which ought to be named «Azotogen», as before.

The Estonian Scientific Research Institute
of Agriculture and Melioration

Received
June 21st, 1958