

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED  
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ  
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА  
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS  
ALUSTATUD 1893.a      Vihik 352    Выпуск      ОСНОВАНЫ В 1893.г.

---

MIKROBIOLOOGIA-ALASEID TÖID  
ТРУДЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

II



Tartu 1975

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED  
УЧЕННЫЕ ЗАПИСКИ  
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА  
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS

ALUSTATUD 1893.a

Vihik. 352 Выпуск

ОСНОВАНЫ В 1893.г.

---

MIKROBIOLOOGIA-ALASEID TÖID  
ТРУДЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

II

Denitrifikatsiooni ja mullaväsimume küsimusi  
Вопросы денитрификации и почвоутомления

TARTU 1975

Редакционная коллегия: В.Тохвер (председатель), Х.Мийдла,  
Л.Вийлеберг.

Ответственный редактор: А.Лавинг.

В настоящем сборнике опубликованы труды сотрудников кафедр физиологии и биохимии растений Тартуского государственного университета. Исследовательские работы, лежащие в основе представленных вниманию читателей статей, проведены главным образом в 1970...1973 гг.

In present collection the papers of the associates of the Chair of plant physiology and biochemistry of the Tartu State University are being published. In most part, the corresponding investigations have been carried out in years 1970... 1973.

ТРУДЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

II

Вопросы денитрификации и почвоутомления  
Ученые записки

Тартуского государственного университета  
Вып. 352

На русском языке

Резюме на английском языке

Тартуский государственный университет  
ЭССР, г.Тарту, ул.Пяксоли, 18.

Ответственный редактор А.Лавинг

Корректоры Н.Чикалова, В.Логина, О.Мутт

---

Сдано в печать 27/III. 1975 г. Бумага писчая, 30x45. 1/4.  
Печ. листов 10,0. Учетно-задат. 8,8. Тираж 400. Зак. № 454.

МВ 03263

Типография ТГУ. ЭССР, г. Тарту, ул.Пяксоли, 14.

Цена 88 коп.

2 - 8

## К ИЗУЧЕНИЮ ПОЧВЕННОЙ ДЕНИТРИФИКАЦИИ: СПЕЦИФИЧНОСТЬ АГЕНТОВ ПРОЦЕССА

В. Тохвер

### Понятие денитрификации и определение ее агентов

В широком этимологическом смысле слова под термином "денитрификация" подразумевают природные процессы восстановления нитратов, независимо от агентов, механизма и продуктов процесса. При этом нитратовосстановление, вызываемое живыми агентами, обычно называют прямой, а процесс, протекающий химическим путем без участия живых существ, косвенной денитрификацией.

Логично, что в общем смысле можно назвать денитрификаторами любые организмы, способные к редукции нитратов. Термин, однако, в таком случае теряет специфику и разграниченность и будет связывать организмы с совсем различными функциями. Поэтому область действительности понятия обычно разграничивают на основе характера процесса, вызываемого изучаемыми агентами. Это можно сделать с учетом в качестве главного критерия химического хода и природы продуктов процесса, или же с учетом, в первую очередь, биологической функции процесса. В первом случае денитрификаторами обозначают группу бактерий, в определенных условиях восстанавливающих нитратный азот до газообразных продуктов, главным образом до  $N_2$  (Помон и де Баржак, 1960, с. 146). Во втором случае денитрификаторами называем микробов, способных к нитратному дыханию, т.е. к использованию нитратов в качестве терминального акцептора электронов (вместо молекулярного кислорода) при функционировании цепи окислительно-восстановительных реакций (цепи переноса электронов, ЦПЭ), часть свободной энергии которой клетки могут запасать в виде АТФ в результате т.н. окислительного фосфорилирования. Это определение исключает из понятия микробов, использующих нитратный азот лишь в конституционных целях, но прибавляет по сравнению с первым способом определения понятия, некоторое число микробов, обычно

не проводящих восстановления нитратов до газообразных продуктов. В то же время неполное восстановление нитратов выполняет у них такую же энергетическую функцию, как и у тех, которые доводят процесс до газообразных продуктов. Дело в том, что генерирование АТФ, т.е. выполнение задачи ЦПЭ, осуществляется при нитратном дыхании в ходе только первых этапов восстановления нитратов (Hadjipetron, Stouthamer, 1965). По Эгами (Egami, 1957, 1973), Такахаши (Takahashi et al, 1963) и по другим авторам, изучавшим эволюцию энергообмена, нитратная респирация появилась в эволюции как редукция нитратов до нитритов. Вместе с тем, как указывает Яманака (Yamanaka, 1967), ядовитость нитрита почти одновременно с появлением нитратного дыхания обусловила в качестве фактора отбора сложение механизма для дальнейшего восстановления этого соединения. Следовательно, нитратное дыхание представляет собой единый процесс с различными степенями развитости. Основа и функция процесса, однако, не зависят от того, до какого уровня простираются дополнительные механизмы. Исходя из общепрохимических и эволюционных соображений следует признать предпочтительным функциональное истолкование термина "денитрификаторы", а также понятия процесса денитрификации, ибо только в этом случае сохраняется единая основа для понимания процесса.

#### Орбит денитрификаторов

В 1950-х годах признанные денитрификаторы принадлежали к шести родам, а именно к *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* и *Actinomyces* (Nason, Takahashi, 1958). Уже к 1965 г. перечень значительно расширился, в первую очередь за счет бактерий коли-аэрогенес группы (до этого восстановление нитратов, например, у *Escherichia coli* истолковывали скорее как побочный процесс метаболизма, который не имеет особого значения в жизни данной бактерии), но и за счет некоторых видов *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Chromobacterium* (= *Flavobacterium* и др. (Muller, 1965, с. 468-469).

К настоящему времени результаты таксономических исследований показывают, что способность к нитратному дыханию крайне распространена среди самых различных микробов. Кроме вышеуказанных 6 родов, диссимиляторная редукция нитратов, т.е. эквивалент дыхания в анаэробных условиях, установлена в родах *Desulfovibrio* (Senez et al., 1956), *Lactobacillus* (Four-

naud et al., 1964), *Edwardsiella*, *Providencia* (Pichinoty et al., 1966), *Alcaligenes*, *Aerobacter* (Pichinoty et al., 1969), *Serratia*, *Hafnia* (Piechaud et al., 1969), *Proteus*, *Citrobacter* (Chippaux, Pichinoty, 1970), *Enterobacter Paracolobacterium* (Davies, Torrien, 1971), окончательно доказано существование диссимильаторной денитрификации у *Hydrogenomonas* (Pfitzner, Schlegel, 1973) и т.д. Может быть, несколько неожиданно среди денитрификаторов оказались и *Haemophilus parainfluenzae* (White, Smith, 1962), *Staphylococcus epidermidis* (Jacobs et al., 1963), *Pasteurella pestis* (Яшук и др., 1965), *Corynebacterium nephridii* (Hart et al., 1965), *Salmonella typhimurium* (Piechaud et al., 1969), *Veillonella alcalescens* (Inderlied, Delwiche, 1973) и некоторые другие. Некоторая способность к нитратному дыханию обнаружена у *Clostridium welchii* (Katsura et al., 1954) и *Rhodospirillum rubrum* (Tetzuya, 1962). Следует все же отметить, что по мнению Сато (Sato, 1950), Эгами (Egami, 1957, 1973), Такахаши (Takahashi et al., 1963) и других японских авторов, восстановление нитрата у *Clostridium* в сущности является нитратным орожением, так как за счет редукции нитрата реокисляется  $NADH$ , восстановленный в стадии анаэробного гликолиза.

Со временем расширился и список видов, принадлежащих к "традиционным" родам денитрификаторов. Так, например, в роде *Pseudomonas* в настоящее время их можно перечислить не менее 18 видов, у *Achromobacter* не менее 6 видов, у *Bacillus* - 8 видов. Представленный перечень неполный, но хорошо иллюстрирует то обстоятельство, что таксономические ряды денитрификаторов со временем все возрастают, а способность к нитратному дыханию обнаруживается и там, где ее раньше вряд ли думали искать.

Особый интерес представляют данные, доказывающие существование и у высших растений возможности перехода к нитратному дыханию при относительно длительном недостатке или отсутствии кислорода (Кудрявцева, 1929, Kessler, 1964, Beevers, Hagemann, 1969). В частности, такая способность указана у ячменя (Willis, Gemm, 1955), у шпината (Panneque et al., 1965) и даже у некоторых древесных растений (Чиркова, 1971).

Можно сказать, что способность к нитратному дыханию очень широко распространена, по таксономическому признаку,

среди сапрофитных бактерий, но может встречаться и у высших организмов. При этом денитрификация является для ее агентов всегда лишь альтернативной возможностью. В природе не найдено организмов, способных получать нужную для жизнедеятельности энергии только по типу нитратного дыхания. Учитывая данные, по которым нитратное (или нитритное) дыхание как процесс, использующий в качестве терминального акцептора электронов неорганическое окисленное соединение, является прямым предшественником кислородной респирации (Egami, 1973), в переходе сапрофитных бактерий к использованию нитратов вместо молекулярного кислорода можно видеть какое-то атавистическое обращение к более раннему типу осуществления ЦПЭ при попадании в анаэробные условия. Возникает вопрос: какими являются границы круга денитрификаторов среди сапрофитных бактерий, т.е. как и чем ограничена способность к переходу на нитратное дыхание? Для получения ответа нужно разобраться в появлении денитрификационной способности в естественной обстановке, в специфичности т.н. физиологической группы денитрификаторов.

#### Специфичность денитрификаторов

Как указано в первой части настоящей статьи, список денитрификаторов со временем расширяется. Общий же подход к расшифровке понятия денитрификаторов среди почвенных микробиологов оставался почти неизменным: денитрификаторы истолковывают как более-менее определенно ограниченную, специализированную группу микробов, поровну с целлюлозными бактериями, нитрификаторами и другими "физиологическими группами" микроорганизмов. Свое крайнее выражение такой подход нашел в учении о биоорганических комплексах почвы. По мнению авторов этого учения, денитрификаторы в разрыве от сапрофитных бактерий (аммонификаторов) помещены в определенную "сферостадии" развития почвенной микрофлоры, они отнесены к ассоциации микробов, якобы разлагающих гумусовые вещества (к "автохтонной микрофлоре Б") (Лазарев, 1939, Былинкина, 1940, 1949, Шамин, Былинкина, 1970). Обращаем, однако, внимание на некоторые факты, заставляющие скептически относиться к традиционному истолкованию.

Уже в 1950-х годах было указано, что денитрификаторы в почве действуют и как аммонификаторы (Березова, 1953, Мишустин, 1954, Scharrer, Burke, 1955). Отмечено также, что

групповые анализы обеих групп перекрываются (Корсакова, 1953), или же, по крайней мере, сильно коррелируются (Мишустин, 1954). По некоторым расчетам до 80% из всех почвенных сапрофитных бактерий способны к нитратовосстановлению (Федоров, 1954). Все эти данные согласуются с более поздними данными (Ristanovic, 1969; Семенова, Хидыралиева, 1970).

Для изучения специфичности и индуцируемости денитрификаторов нами в сентябре 1970...1973 гг. предприняты специальные исследования. Их методика:

Общее число сапрофитных бактерий определяли по высеву 0,05...0,10 мл четвертого разведения на МПА в чашке Петри (поверхностный посев). Инкубация продолжалась 48 часов при температуре +27,5° С. После указанного времени материал выросших колоний переносили по способу отпечатков, т.е. по методу, предложенному Ледербергами (Lederberg, Lederberg, 1952) для генетического исследования мутантных форм, в новую чашку Петри на Гильтэй-агар. Новую инкубацию производили в строго анаэробных условиях в атмосфере аргона. После 48-ч. инкубации подсчитывали выросшие колонии, которые, как это следует из условий культивации, принадлежат к бактериям, способным к нитратному дыханию, и которые относительно легко могут перейти на этот тип энергообмена. Анализировали 4 разновидности эстонских почв:

1. Дерново-карбонатная почва из совхоза Винни, Раквереского района;
2. Дерново-подзолистые почвы южной Эстонии:
  - 2.1. супесчаная почва из Тартуского образцового опытного совхоза и
  - 2.2. песчаная почва из стационара Эстонской сельскохозяйственной академии в Моосте, Пылваского района;
3. Буроземная почва из Михклиского стационара ЭСХА, Пярнуского района.

Полученные результаты представлены в табл. I.

Видно, что метод отпечатков позволяет получать значительно более высокие численности денитрификаторов, чем их учет по методу предельных разведений (при учете только пробирок, где появляются пузырьки газа). Значит, при стандартных групповых анализах по методу предельных разведений численность денитрификаторов как дефинитной группы не определя-

ется, а устанавливается лишь количество сапрофитных бактерий, легко переключающихся на этот процесс. Сколько же в изучаемой почве сапрофитов, более трудно индуцируемых к нитратной респирации, обычно не выясняется. Не выясняется и численность "неполных" денитрификаторов, доводящих восстановление только до нитритов или других растворимых интермедиатов.

Таблица I

Удельная часть сапрофитных бактерий,  
способных к нитратному дыханию,  
в некоторых почвах Эстонии

(Средние данные за 1970...1972 гг.)

П о ч в а	Состояние окультуренности	С а п р о ф и т ы		
		Общее число, млн. на 1 г сухой почвы	Способные к нитратному дыханию Млн. на 1 г сухой почвы	% от общего числа
Дерново-карб.: легко суглин.	Ельник, не-окультур.	1,1±0,2	0,38±0,04	35
	Старопахотное поле	4,8±0,5	2,6±0,4	55
Дерново-подз., супесчаная	Смеш. лес, не-окультур.	1,8±0,2	0,79±0,1	44
	Целина (6-ой год)	2,9±0,3	1,5±0,2	54
Дерново-подз., песчаная	Старопахотное поле	0,9±0,2	0,64±0,08	68
	Сосновый лес	0,18±0,03	0,04±0,005	24
Буроземная, среднесуглин.	Старопахотное поле	0,95±0,07	0,30±0,04	46
	Дубовник, не-окультур.	6,0±0,3	2,7±0,4	45
	Ельник, не-окультур.	2,7±0,1	0,8±0,1	29
	Старопахотное поле	4,6±0,2	3,5±0,2	76

Индукция нитратного дыхания у сапрофитных бактерий пассажирами на Гильтэй-агар  
в атмосфере аргона

Почва	Состояние окультуренности	Общее число изученных сапрофитных колоний	Переключение на нитратное дыхание				
			При первом пассаже		При 2...5 пассажах		Всего,
			Число колоний	%	Число колоний	%	
Дерн.-подзол., супесчаная	Смеш. лес, неокульт.	165	69	42	22	13	55
	Целина, 6-ой год осв.	171	89	52	20	12	64
	Старопахотное поле	154	92	60	17	11	71
Буроземная, суглинистая	Дубовник, неокульт.	152	68	45	11	7	52
	Ельник, неокульт.	119	41	35	16	13	48
	Старопахотное поле	192	136	71	11	6	77

По данным табл. I видно также, что относительные и абсолютные размеры микрофлоры, способной к нитратному дыханию, существенно зависят от типа почвы, растительного покрова и состояния окультуренности почвы. Как правило, удельная часть денитрификаторов возрастает вместе с продолжительностью сельскохозяйственного использования почвы, по-видимому, в связи с длительным воздействием нитратных удобрений в качестве фактора отбора. При этом окультуривание как таковое не во всех случаях увеличивает общую численность сапрофитов, в том числе и денитрификаторов.

Дальнейшее изучение вопроса на примере дерново-подзолистой супесчаной и буроземной почв показывает, что первым пассажем с МПА на ГА выявляются не все сапрофиты, способные к переключению на нитратное дыхание. При последующих повторных пассажах на ГА в анаэробных условиях еще некоторая часть сапрофитных бактерий адаптируется к нитратной респирации. Соответствующие данные изложены в табл. 2. Механизм появления соответствующих колоний, по всей вероятности, состоит как в индукции, так и в отборе клеток (возможно мутантных), способных к нитратной респирации.

Можно сделать вывод, что вместе с сапрофитными бактериями, как бы "нормально" способными к нитратному дыханию и легко переходящими на этот тип энергообмена, в почвах имеется множество бактерий, более трудно индуцируемых к денитрификации. Потенциально же они к этому способны. Трудно сказать, сколько в почвах сапрофитных бактерий, потенциально неспособных к денитрификации и существуют ли такие вообще.

В связи с оценкой удельной части денитрификаторов среди сапрофитных бактерий почвы следует обратить внимание еще на одно обстоятельство. Общеизвестно, что стандартный метод определения численности денитрификаторов в почвах по методу предельных разведений на среде Гилтэя дает многократно меньшие показатели, чем параллельные определения общего числа сапрофитных бактерий, несмотря на то, что не меньше половины всех почвенных сапрофитных бактерий обладают денитрифицирующими способностями, выявляемыми по методу отпечаток (табл. I). Возникает вопрос о значении метода и критериев роста при определении численности денитрификаторов. Для ориентации в данном вопросе нами проведено сравнение отдельных методов. За 1970...1972 гг. определяли численность денитрификаторов в

дерново-подзолистой целинной почве (Ильматсалу, Тартуский район, ЭССР) тремя методами:

а) по стандартному методу предельных разведений в жидкой среде Гилтэя (5 параллельных пробирок для каждого разведения) с учетом в качестве решающего критерия появления пузырьков газа и параллельно с учетом в качестве достаточных критериев ясно положительной реакции Грисса на нитриты и подделачивания среды при условии появления четких признаков (помутнение среды и др.) в анаэробных условиях инкубации;

б) по методу отпечаток с МПА + 0,1%  $\text{KNO}_3$  на Гилтэй-агар с последующей инкубацией в атмосфере аргона;

в) по методу Омелянского (Омелянский, 1940, с. 195) путем высевания на пептонно-крахмально-нитратный агар с последующим проявлением колоний денитрификаторов соляной кислотой.

Средние данные, полученные по всем трем методам, представлены в табл. 3. Видно, что наименьшие результаты получились именно по стандартному методу предельных разведений. Значения численности денитрификаторов повышаются до 40 ... 60% от общей численности сапрофитов, если при таких анализах, проведенных, однако, в анаэробно-анаэробно, учитывают как положительные и те пробирки, где появились нитриты и повысился рН, несмотря на то, что пузырьков газа не наблюдали. Результаты при этом хорошо совпадают с данными анализов по методу отпечатков, который можно считать наиболее надежным методом установления относительной части денитрификаторов среди сапрофитных бактерий.

Если при проведении анализа численности денитрификаторов по методу предельных разведений решающим критерием считать появление пузырьков газа, то в учет взяты будут только те агенты процесса, которые доводят восстановление нитратного азота до молекулярного. Это только часть всех сапрофитов, способных переключаться на нитратное дыхание. Исходя из функционального истолкования понятия денитрификаторов следует учитывать и те бактерии, которые при нитратной респирации ограничиваются первыми ступенями нитратредукции. Именно этому соответствует интерпретация появления нитритов и повышение рН среды как критериев положительного эффекта анализа.

Таблица 3

Зависимость результатов определения  
численности денитрификаторов в почве  
от методики проведения анализов

20-см слой дерново-подзоли-  
той почвы целины в Тартуском  
районе Эст. ССР

Состояние окультуренности	Численность денитрификаторов, $10^6/\text{г}$ , определенная по методу			
	предельных разведений на среде Гилтэя критерий - появл. газа	критерии - газ, нитриты, реакция	отпеча- ток с МПА на Гилтэй- агар	Омеляно- кого
Смеш. лес, неокультур.	$0,23 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,11$	$0,79 \pm 0,10$	$0,11 \pm 0,03$
Целина, 6-ой год осв.	$0,46 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,18$	$1,50 \pm 0,20$	$0,22 \pm 0,04$
Старопахотное поле	$0,41 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,12$	$0,64 \pm 0,08$	$0,24 \pm 0,04$

### В а к л ю ч е н и е

Из всего сказанного следует, что денитрификаторы поч-  
вы не представляют собой специфической, четко разграничен-  
ной физиологической группы микробов. В зависимости от кон-  
кретных условий большинство почвенных сапрофитов может пе-  
рейти на нитратное дыхание. По легкости переключения на  
этот тип энергообмена в природе имеется целая градация. "Фи-  
зиологическую группу" денитрификаторов нельзя сравнивать с  
действительно специализированными группами микробов, как  
например, целлюлозоразлагающие бактерии.

## Л и т е р а т у р а

- Березова Е.Ф. О роли микроорганизмов в питании растений. В сб.: Роль микроорганизмов в питании растений. М., Сельхозгиз, 1953.
- Былинкина В.Н. К познанию почвенной микрофлоры как конституционной части биоорганического комплекса почв. - "Микробиология", 1940, т. 9, №2.
- Былинкина В.Н. Микроорганизмы, минерализующие гумусовые вещества почв. - Труды ВНИИСХМ за 1941-1945 гг., 1949, вып. I.
- Корсакова М.П. Денитрифицирующие микроорганизмы. - "Микробиология", 1953, т. 22, № 2, с. 215-219.
- Кудрявцева А. Потребность корней растений в кислороде. - "Научно-агрон. журнал", 1929, № I.
- Лазарев Н.М. Биоорганические комплексы почв и возможности повышения агрономической эффективности известкования. В сб.: Известкование почв. М., 1939.
- Лазарев Н.М. Экологическая микробиология и изучение почвенного плодородия. - Труды ВНИИСХМ за 1941-1945 гг. Л., 1949, вып. I.
- Мишустин Е.Н. Закон зональности и учение о микробных ассоциациях почвы. - "Успехи совр. биологии", 1954, т. 37, вып. I.
- Омельянский В.Д. Практическое руководство по микробиологии. 2-ое, перераб. и дополн. изд. М.-Л., Изд-во АН СССР, 1940. 432 с. с ил.
- Пошон И. и Баржак Г. де. Почвенная микробиология. Перевод с англ. М., Изд-во ИЛ, 1960, 561 с. с ил.
- Семенова В.И., Хыдыралиева С. Аммонифицирующая способность некоторых денитрифицирующих бактерий. В сб.: Физиология микроорганизмов". Ташкент, "Фан", 1970, с. 193-198.

- Федоров М.В. Почвенная микробиология. М., "Советская наука", 1954, 484 с. с ил.
- Чиркова Т.В. Роль нитратного дыхания корней в жизнедеятельности некоторых древесных растений в условиях временного анаэробноза. - Вестн. Ленингр. ун-та, 1971, вып. 21.
- Шамин А.А., Былинкина В.Н. Экологическая почвенная микробиология и теория Н.М. Лазарева о биоорганоминеральном комплексе почвы. - В сб.: Микробиология земледелия. Л., 1970, с. 192-211.
- Яцук А.М., Дружинина И.П., Космочева Н.А. Нитрифицирующая и денитрифицирующая способность чумного микроба. - В сб.: Вопросы микробиол. и лаборат. диагностики инф-ий, Саратов, 1965, с. 79-81.
- Beevers, L., Hageman, R.H. Nitrate Reduction in Higher Plants. - "Ann. Rev. Plant Physiol.", 1969, v. 20, p. 495.
- Chippaux, M., Pichinoty, F. Les nitrateréductases bactériennes. V. Induction de la biosynthèse de l'enzyme A par l'azoture. - "Arch. Mikrobiol.", 1970, B. 71, N. 4, S. 361-366.
- Davies, T.R., Toerien, D.F. Population Description of a Denitrifying Microbial System. - "Water Res.", 1971, v. 5, No 8, pp. 553-564.
- Egami, F. Biochemistry of Nitrate Reduction. - "Svensk. kem. Tidskr.", 1957, v. 69, p. 652.
- Egami, F. A Comment to the Concept on the Role of Nitrate Fermentation and Nitrate Respiration in an Evolutionary Pathway of Energy Metabolism. - "Z. allg. Mikrobiol.", 1973, v. 13, No 2, pp. 177-181.
- Egami, F., Ishimoto, M., Taniguchi, S. The Electron Transfer from Cytochromes to Terminal Electron Acceptors in Nitrate Respiration and Sulphate Respiration. In: Haematin Enzymes. New York, Pergamon Press, 1961, p. 392.
- Fournaud, J., Raibaud, P., Macquot, G. Etude de la réduction des nitrites par une souche de Lactobacillus lactis. - Ann. Inst. Pasteur, 1964, v. 15, N° 4, p. 213-224.

- Hadjipetron, L.P., Stouthamer, A.H. Energy Production During Nitrate Respiration in *Aerobacter aerogenes*. J. Gen. Microbiol., 1965, v. 38, No 1, pp. 29-34.
- Hart, L.T., Larson, A.D., McCleskey, C.S. Denitrification by *Corynebacterium nephridii*. - J. Bacteriol., 1965, v. 89, No 4, pp. 1104-1108.
- Inderlied, C.B., Delwiche, E.A. Nitrate Reduction and the Growth of *Veillonella alcalescens*. - J. Bacteriol., 1973, v. 114, No 3, pp. 1206-1212.
- Jacobs, N.J., Johantges, I., Deibel, R.H. Effect of Anaerobic Growth on Nitrate Reduction by *Staphylococcus epidermidis*. - J. Bacteriol., 1963, v. 85, No 4, pp. 782-787.
- Katsura, T., Ito, H., Nozima, T., Egami, F. Nitrate Reduction by *Clostridium welchii*. - J. Biochem., 1954, v. 41, No 6, pp. 745-756.
- Kessler, E. Nitrate Assimilation by Plants. - Ann. Rev. Plant Physiol., 1964, v. 15, p. 57.
- Ledeberg, J., Ledeborg, E. Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants. - J. Bacteriol., 1952, v. 63, No 3, pp. 399-406.
- Müller, G. Bodenbiologie. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag, 1965. S. 468-469.
- Nason, A., Takahashi, H. Inorganic Nitrogen Metabolism. - Ann. Rev. Microbiol., 1958, v. 12.
- Paneque, A., del Campo, F.F., Ramirez, J.M., Losada, M. Flavine Nucleotide Nitrate Reductase from Spinach. - Biochim. Biophys. Acta, 1965, v. 109, No 1, pp. 79-85.
- Pfützner, J., Schlegel, H.G. Denitrifikation bei *Hydrogenomonas eutropha*, Stamm H.16. - Arch. Mikrobiol., 1973, B. 90, H. 3, S. 199-211.
- Pichinoty, F., Rigano, C., Bigliardi-Rouvier, J., de Minor, L., Piechaud, M. Recherche des nitrate-réductases A et B chez les Enterobacteriaceae. - Ann. Inst. Pasteur, 1966, v. 110, N° 1, p. 126-130.
- Pichinoty, F., Bigliardi-Rouvier, J., Rimassa, R. La dénitrification bactérienne. I. Utilisation des amines aromatiques comme donneuses d'électrons dans la réduction du nitrite. - Arch. Mikrobiol., 1969, B. 69, H. 4, S. 314-329.

- Piechaud, M., Pichinoty, F., Azoulay, E., Couchoud-Beaumont, P., Gendre, J. Recherches sur des mutants bactériens ayant perdu les activités catalytiques liées à la nitrate-réductase A. I. Description des méthodes d'isolement. - Ann. Inst. Pasteur, 1969, v. 116, N° 3, p. 276-287.
- Ristanović, B. Fisiološko-ekološke karakteristike dominantnih populacija bakterija i aktinomiceta brakičnih voda Donje Heretve. - "Mikrobiologia" (SPRJ), 1969, v. 6, No 2, s. 253-259.
- Sato, R. Fisiologia oksidado per nitrato. - Scientia Revuo, 1950, v. 2, p. 122.
- Scharrer, K., Bürke, R. Fortschritte der Agrikulturchemie. Dresden - Leipzig, "Techn. Fortschrittsberichte", 1955, B. 56.
- Senex, J.C., Pichinoty, F., Konovaltchikoff-Mazover, M. Réduction des nitrates et de l'hydroxylamine par les suspensions et les extraits de *Desulfovibrio desulfuricans*. - C. r. Acad. Sci., 1956, v. 242, N° 4, p. 570-573.
- Takahashi, H., Taniguchi, S., Egami, F. Inorganic Nitrogen Compounds: Distribution and Metabolism. - In: Comparative Biochemistry, 1963, vol. 5, p. 91.
- Tetzuya, K. Nitrate Reductase in *Rhodospirillum rubrum* Cells Adapted to Nitrate. Review. Symp. Enzyme Chem., 1962, v. 17, pp. 122.
- White, D., Smith, L. Haematin Enzymes of *Haemophilus parainfluenzae*. - J. Biol. Chem., 1962, v. 237, p. 1332.
- Willis, A.J., Gemm, E.W. The Respiration of Barley Plants. VIII. Nitrogen assimilation and the Respiration of the Root System. - "New Phytologist", 1955, v. 54, No 2.
- Yamanaka, T. Cytochrome c and Evolution. - "Nature", 1967, March 25, pp. 1183-1186.

UPON THE INVESTIGATIONS OF SOIL DENITRIFICATION:  
SPECIFICITY OF THE AGENTS OF THE PROCESSUS

V. TOHVER

Summary

On the basis of literary and original experimental data the conclusion is drawn that soil denitrifying bacteria do not represent a specific, clearly defined physiological group of micro-organisms. In dependence on existing conditions the major part of the ordinary soil saprophytes may turn to nitrate respiration. In the facility of the switch-over there exists in nature a real gradation. The "physiological group" of denitrifiers must not be equalized with really specialized groups of microbes, e.g. aerobic cellulose decomposing bacteria. The inequality has an enzymological basis, discussed in another paper of the author.

## ОБ ЭНЗИМОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВАХ ПОДХОДА К ИЗУЧЕНИЮ ПОЧВЕННОЙ ДЕНИТРИФИКАЦИИ

В. Тохвер

В последнее время все шире и успешнее в почвенно-микробиологических исследованиях развивается биохимический подход к проблемам, до сих пор изученных "классическими" наблюдательными и содерцательными методами. Особенно благоприятную роль в этом выполняет, по-видимому, объединение энзимологических и наблюдательных методов исследования (представление проблем почвенной микробиологии в энзимологических терминах). Дело в том, что многие проблемы почвенной микробиологии представляют собой энзимологические проблемы, применительно к плохо регулируемым природным условиям. В частности, сказанное относится к проблемам почвенной денитрификации. Главными в этом аспекте является вопрос о природе и свойствах денитрификационных энзимных систем и вопрос об индуцируемости нитратовосстановления. В настоящем обзоре сделана попытка дать анализ соответствующих современных данных на фоне эволюции энергообмена.

### I. О месте денитрификации в эволюции энергообмена

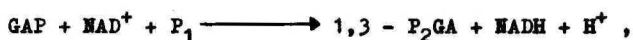
Главные проблемы почвенной биологической денитрификации не могут быть решены без участия места денитрификации, стало быть и денитрификаторов, в эволюции энергообмена. Поэтому следует и в рамках настоящей статьи обсуждать этот вопрос.

В настоящее время довольно хорошо обосновано общее положение о нитратном дыхании как об эволюционном предшественнике кислородной респирации. Эта гипотеза выдвинута и развита главным образом японскими авторами (например, Egami, 1957, Ishimoto, Egami, 1959, Egami et al., 1961, Takahashi et al., 1963, Egami, 1973). По их трактовке один из путей от анаэробных брожений к кислородному дыханию можно представить в последовательности следующих этапов: I) истинное бро-

жение (терминальными акцепторами электронов являются эндогенные органические соединения), 2) нитратное брожение, 3) нитратное дыхание, 4) кислородное дыхание.

В приведенной схеме особое внимание заслуживает выделение, по идее Сато (Sato, 1950), ступени нитратного брожения и ее отделение от нитратного дыхания. В частности, новое, более точное значение приобретает в результате этого и само понятие о нитратном дыхании.

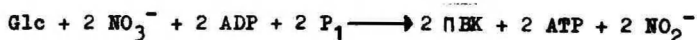
С нитратным брожением имеем дело, если  $\text{NAD(P)H}$ , восстановленный в стадии анаэробного гликолиза по уравнению



в окисленную форму возвращается за счет восстановления нитрата без участия цитохромов:



"Денитрификаторы", еще не обладающие цитохромной системой, этим и ограничиваются. Для них весь процесс денитрификации, непосредственно исходящий из глюкозы (или же из соединения, которое в ходе метаболизма превращается в глюкозу или в один из промежуточных продуктов гликолиза), можно суммировать по уравнению:



(в котором ПВК - пировиноградная кислота).

По общей трактовке процесса денитрификации как процесса нитратредукции в энергетических целях, микробов, вызывающих нитратное брожение, безусловно, можно квалифицировать как денитрификаторы, несмотря на то, что они не ведут восстановления нитратов до  $\text{N}_2$ . Без учета их деятельности нельзя полностью понять процессы трансформации азота в почве.

Следующая ступень эволюции энергообмена станет по Сато и Эгамы возможной вместе с появлением цитохромов. Дальнейшее развитие окислительно-восстановительных процессов, после появления нитратного брожения стало необходимостью в связи с накоплением ядовитой ПВК и ее инертных продуктов. Появляется нитратное дыхание, предпосылкой которого является метаболизация ПВК и ее продуктов через нитратный цикл. Как извест-

но, функционирование последнего невозможно без деятельности какой-то формы цепи переноса электронов (ЦПЭ), определяющей частью которой являются цитохромы. У некоторых микробов (*Escherichia coli* и др.) нитратное дыхание как процесс восстановления нитратов с участием цитохромной системы не идет дальше редукции  $\text{NO}_3^-$  до  $\text{NO}_2^-$ , у большинства же известных денитрификаторов появляется вместе с нитратным дыханием и нитритное дыхание и формируются следующие ступени восстановления азота, вплоть до образования  $\text{N}_2$ . Как указывает Яманака (Yamanaka, 1967), ядовитость нитрита почти одновременно с появлением нитратного дыхания обусловила в качестве фактора отбора сложение механизма для дальнейшего восстановления этого соединения. Вместе с тем интересно отметить, что именно нитритное дыхание стало, по мнению некоторых авторов, прямым предшественником кислородного дыхания. На это указывают данные о свойствах отдельных звеньев цитохромной системы бактерий и сравнительные исследования по реактивности отдельных цитохромов, в частности цитохромоксидазы (Yamanaka a. Okunuki, 1967).

Работы Эгами, опубликованные в 1957-1963 гг. подверглись критике, главным аргументом которой служил тезис, по которому аккумуляция атмосферного кислорода в результате фотосинтеза должна была предшествовать формированию нитратов (Broda, 1971 а, б). В действительности же не исключена возможность как абиотического, так и биотического образования нитратов еще до появления свободного атмосферного кислорода. Для абиотического возникновения нитратов такая возможность была по существу доказана уже исследованиями Сугавара. Им были обнаружены в "остаточной воде магматической дифференциации", найденной в трещинах японских нефелиновых базальтов, как нитраты (4,4...97 мг/л), так и нитриты (0,54...21 мг/л) (Sugawara et al., 1949). Исследования по эволюции фотосинтеза показывают, что крайне вероятно и биотическое образование нитратов без наличия  $\text{O}_2$ . Так, например, Ольсон на основе своих результатов делает вывод, что фотохимическое окисление нитритов в нитраты и обратная темновая реакция (нитратное дыхание) предшествовали выделению кислорода и появлению кислородного дыхания (Olson, 1970). В дополнение к этому Танигучи (Taniguchi, 1971) выдвигает заключение о существовании в эволюционном прошлом "фотосинте-

тического нитрификатора", который мог продуцировать нитраты за счет аммиака, находящегося в избытке в первичной атмосфере:



Как известно, очень трудно найти прямые доказательства для реконструкции биохимического прошлого. Обычно исследователи должны удовлетворяться анализом и сопоставлением существующего современного материала, т.е. косвенными доказательствами. Некоторые косвенные доказательства могут быть при этом совсем убедительными. Нам кажется, что к ряду таких убедительных доказательств в пользу концепции о нитратном дыхании как предшественнике кислородного дыхания принадлежат и твердо установленные факты о химической структуре цитохромов у разных организмов, а также факты о колебании функциональной специфичности цитохромов на более низких ступенях эволюции. Для всего сказанного приобретает в этом смысле большое значение установление идентичности цитохромоксидазы и нитратредуктазы у факультативных анаэробов из рода *Pseudomonas* (Yamanaka, 1964). Особенно связывающим станет этот факт, если учесть химическую природу простетической группы данного энзима — это гем  $\text{I}^{\text{d}}$  или  $\text{a}_2$ , который по некоторым признакам является близким к хлорофиллу (Yamanaka, 1967, Yamanaka, Okumuki, 1971).

К настоящему времени выяснено широкое колебание специфичности цитохромов, функционирующих в нитратредукции. Речь идет не только о возможности переключения факультативных анаэробов от денитрификации к кислородному дыханию и обратно, или же об одновременном протекании обоих процессов. Теперь известно, что по крайней мере у некоторых денитрификаторов терминальными акцепторами для ЦПЭ могут служить, кроме нитратов и продуктов их восстановления, различные минеральные соединения, такие как сульфаты и сульфиты (Kemp et al., 1963), соединения трехвалентного железа (Ottow, 1969), тетрагидраты (Kaprálék et al., 1973), хлораты, перхлораты (Itagaki et al., 1963, Hackenthal, Eichler, 1967). Все это, вместе взятое, свидетельствует о биохимической неразвитости (в эволюционном смысле) ЦПЭ бактерий, о возможности относительного легкого перемещения специфичности их окислительно-восстановительных энзимных систем. На этой основе легко понять переключение

сапрофитных бактерий, обсуждаемое на стр. 10 наст. сборника, на нитратное или кислородное дыхание, а также широкое распространение среди сапрофитов "денитрификаторов" и условность границ этой группы микробов.

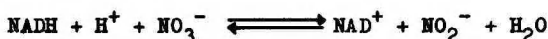
В заключении по эволюционному положению денитрификации и денитрификаторов следует, на наш взгляд, признать промежуточное место этого процесса на пути эволюции энергообмена. Это не обособленная ветвь эволюционного дерева, отходящая от общего ствола, а "сегмент" самого ствола на относительно низком уровне развития энергообмена. Такой вывод согласуется со всеми известными фактами. Он объясняет, почему денитрификаторы не представляют собой разграниченной, особой группы и почему "атавистическое" возвращение к нитратному дыханию встречается даже у высших растений. Денитрификация — это только одна возможность, наиболее яркое выражение эволюционной ступени энергообмена, на которой в качестве терминальных акцепторов электронов для цепей окислительно-восстановительных реакций преимущественно использовались различные экзогенные окисленные минеральные соединения. Все живое когда-то прошло этот этап. При изучении почвенной денитрификации, в частности при истолковании полученных данных, это обстоятельство нужно принять во внимание.

## 2. О природе и свойствах энзимных систем денитрификации

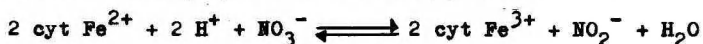
В 1953 г. была выдвинута гипотеза об участии в денитрификации двух обособленных энзимных систем редукции нитратов (Nason, Evans, 1953). В 1954-56 гг. эта гипотеза была развита в цельную концепцию о двух функциональных путях нитратовосстановлении (Kluyver, 1954, Клуйвер, 1956). Первый путь — это восстановление нитратов до  $\text{NH}_3$  в целях усвоения азота или т.н. ассимиляторная нитратредукция. На втором пути нитраты выступают в роли функционального эквивалента молекулярного кислорода. Здесь т.н. диссимиляторная редукция нитратов выполняет энергетическую функцию и доходит до  $\text{N}_2$ . При этом по данной концепции различны не только терминальные, но и промежуточные продукты восстановления. Из этого вытекает, что ассимиляторный и диссимиляторный пути катализируются различными энзимами, несмотря на общий начальный субстрат восстановления. К сожалению, для проверки этого вывода за последние двадцать лет было сделано мало, хотя интенсивно изуча-

лись и связанные вопросы сосуществования и одновременной работы обеих систем, проблемы специфичности и индуцируемости соответствующих энзимов и т.д.

Не останавливаясь на истории изучения природы нитратредуктаз, выделенных из различных объектов, отмечаем, что к настоящему времени можно считать доказанным существование в природе нитратредуктаз двух основных типов - флавопротеидной и цитохромной природы. В соответствии с этим, в международную "Номенклатуру ферментов" (1966) под шифрами ЕС I.6.6.1-ЕС I.6.6.3 включено три флавопротеидных нитратредуктазы, а под шифром ЕС I.9.6.1 приведена нитратредуктаза цитохромного типа. Главным функциональным различием между ними можно считать их отношение к донорам электронов. *In vivo* флавопротеидные НР акцептируют электроны от восстановленных пиридиннуклеотидных коэнзимов (от НАДН, НАДФН или от обоих). В случае ЕС I.6.6.1 катализируемая реакция следующая:



Цитохромная НР прямо не может взаимодействовать с НАДН или НАДФН. Для нее нормальным донором электронов является какой-то другой цитохром, в большинстве случаев типа b в частности b<sub>1</sub> (Taniguchi et al., 1956, Heredia, Medina, 1960, Itagaki et al., 1963, Lam, Nicholas, 1969, Ruiz-Herrera, De Moss, 1969, Miyata, 1971). Только в единичных случаях обнаружен в этой роли цитохром типа a (White, Smith, 1962) или типа c (Lam, Nicholas, 1969, Prakash, Sadana, 1973). В общей форме катализируемую реакцию можно представить так:



В соответствии с приведенными уравнениями находится факт, что ассимиляторная и диссимиляторная НР работает при значниях  $E_0'$ , характерных соответственно для флавопротеидных и цитохромных переносчиков электронов (Tohver, 1970). Это обстоятельство определяет различное положение обеих нитратредуктаз в цепи переноса электронов (ЦПЭ).

Для обнаружения в микробах различных нитратредуктазных систем, часто отмечаемых как А (цитохромная "диссимиляторная") и Б (флавопротеидная "ассимиляторная"), применяют различные приемы. Наиболее надежным является, по полученным до сих

пор данным, хлорат-тест, предложенный Пишноти (Pichinoty) в 1964-1965 гг. Дело в том, что  $\text{ClO}_3^-$  является субстратом для цитохромных систем и ингибитором для флавопротеиновых редокс-систем. Этим методом изучены сотни штаммов денитрификаторов относительно наличия НР А и Б. Оказывается, что три возможности представленности (в микроорганизме имеется А, или Б, или обе редуктазы одновременно) встречаются почти в одинаковой мере, при некотором доминировании А перед Б (Pichinoty et al., 1966, 1971). В особенности следует отметить, что в типичных почвенных денитрификаторах (*M. denitrificans*, *Pseudomonas* sp. sp.), по этим данным, обычно имеются обе системы.

Окончательные доказательства в пользу одновременного существования в микробном мире различных нитратредуктаз получены при изучении хлоратрезистентных мутантов денитрификаторов. Это мутанты, утратившие цитохромы, т.е. системы, для которых хлорат может быть субстратом (Stouthamer, 1967, Pischaud et al., 1969) и в результате восстановления дать ядовитые соединения, приводя микробы к быстрому самоотравлению. Хлоратрезистентные мутанты денитрификаторов, в отличие от диких типов, могут расти в анаэробных условиях в присутствии хлората за счет восстановления нитратов, но не могут расти в аэробно-зе с использованием кислорода. Особенно хорошо (бесшумно) можно изучать деятельность нитратредуктазных систем в бесклеточных суспензиях, полученных от диких и мутантных штаммов денитрификаторов. В качестве примера приводим результаты, полученные в нашей лаборатории при изучении почвенного денитрификатора *Achromobacter agile* (табл. I). Видно, что по редокс-активности система А (активность при  $\text{ClO}_3^-$ ) составляет около 65% от суммарной активности А + Б (исходная культура,  $\text{NO}_3^-$ , без ингибитора). Активность системы Б выявляется как по данным активности хлоратрезистентного мутанта (системы А нет), так и по активности суспензии исходной культуры с уретаном, но ее можно вычислять и по разнице активности А + Б и А исходной культуры. Все значения вполне удовлетворительно совпадают. В особенности следует отметить отсутствие эффекта от уретана в суспензии мутантной культуры, в то время, когда его эффект в суспензии исходной культуры значителен.

Таблица I

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ  
БЕСКЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ *Achromobacter agilis*  
В АТМОСФЕРЕ АРГОНА  
(В НМ ОКИСЛЕННОГО НАДФН НА МГ БЕЛКА В МНН.)

Терминальный акцептор электронов	Ингибитор, отражающий терминальную (цитохромную) часть ЦПФ	Источник суспензии	
		Исходная нормальная культура	Хлорат-ре- зистентный мутант
$\text{NO}_3^-$	-	$10,6 \pm 0,30$	$3,4 \pm 0,18$
$\text{NO}_3^-$	уретан	$3,0 \pm 0,12$	$3,0 \pm 0,10$
$\text{ClO}_3^-$	-	$6,9 \pm 0,23$	0

Прямым продуктом реакции восстановления нитрата является нитрит как в системе А, так и в системе Б. Пока не совсем ясно, когда и почему начинаются различия по путям до  $\text{N}_2$  или  $\text{NH}_3$ . Промежуточные продукты с нужной определенностью не установлены. Имеются лишь данные о деятельности тех или иных энзимов, катализирующих предполагаемые промежуточные продукты восстановления. Их обособление начинается, по всей вероятности, на уровне деятельности нитритредуктаз, два представителя которых имеются в Международной номенклатуре энзимов. Это металлосодержащая флавопротеидная нитритредуктаза ЕС I.6.6.4 (продуктом восстановления нитрита является гидроксилламин) и не содержащая металла флавопротеидная нитритредуктаза ЕС I.7.99.3 (продуктом восстановления нитрита является окись азота). Для первой непосредственным донором электронов служит НАДФН или НАДФН<sub>2</sub>, для второй эту же функцию выполняют *in vitro* различные соединения, кроме восстановленных пиридиннуклеотидных коэнзимов. *In vivo* ЕС I.7.99.3 работает, по литературным данным, вместе с цитохромной нит-

ратредуктазой, а донорами электронов для нее являются цитохромы типа с (Straat, Nason, 1965, Cole, 1968, Miyata, Mori, 1969). Следовательно, по характеру деятельности ЕС I.6.6.4 принадлежит к системе Б, а ЕС I.7.99.3 - к системе А. Такой вывод находит добавочное подтверждение в метаболической судьбе продуктов реакций, катализуемых данными энзимами. Гидроксиламинредуктаза ЕС I.7.99.1, выделенная из различных микробов, способных к ассимилятивному усвоению  $N - NO_3^-$ , как раз катализирует переход гидроксиламина в  $NH_3$ . Продукт же каталитической деятельности ЕС I.7.99.3 ( $NO$ ) восстанавливается редуктазой окиси азота в  $N_2$ .

Несмотря на логичность приведенных выводов, принадлежность признанных нитритредуктаз к той или другой системе восстановления нитратов экспериментально строго не доказана. В особенности можно предполагать, что круг нитритредуктаз не ограничивается вышеуказанными двумя флавопротеидными представителями. Указано, что по крайней мере в некоторых денитрификаторах (*Ps. aeruginosa*, *M. denitrificans*) наряду с флавопротеидной нитритредуктазой работает и цитохромный энзим типа с (Yamanaka et al., 1962, Newton, 1969).

По всей вероятности, число промежуточных продуктов варьируется как в пути  $NO_3^- - N_2$  (система А), так и в пути  $NO_3^- - NH_3$  (система Б). Кроме  $NO_2^-$  и  $NO$  для первого и  $NO_2^-$  в  $NH_2OH$  для второго, у отдельных денитрификаторов в качестве промежуточных продуктов нитратовосстановления предположены еще гипонитрит, нитрамид, нитроксилят и закись азота. Соответствующих энзимов все же не выделено, кроме гипонитритредуктазы (I.6.6.6), которая катализирует восстановление гипонитрита в гидроксиламин. Из числа вышеприведенных "добавочных" продуктов особый интерес представляет закись азота, которая для многих денитрификаторов фактически доказана в качестве субтерминального продукта пути А.  $N_2O$  способна к дальнейшему восстановлению до  $N_2$ , но в зависимости от природы денитрификатора и условий восстановления она может встречаться вместе с  $N_2$  и среди терминальных продуктов денитрификации (Nommik, 1956, Matsubara, 1971, Tan, 1973).

Характерной особенностью нитратредуктазных систем в целом, а также их отдельных звеньев является колебание их специфичности и функции. В литературе представлены данные, показывающие, что нитратредуктаза А многих бактерий может при

определенных условиях переключаться на альтернативные акцепторы (вместо  $\text{NO}_3^-$  на  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{O}_2$ ) (Ottow, 1969, Sinclair, White, 1970, Knook et al., 1973). Заключение, что у *Ps. aeruginosa* нитрат:нитрит-оксиредуктаза (т.е. нитратредуктаза) и цитохром: $\text{O}_2$ -оксидоредуктаза (т.е. цитохромоксидаза) являются идентичными ферментами (Yamanaka, Okunuki, 1963). Такое же колебание специфичности в еще большей мере обнаружено относительно нитритредуктазы, что легко понятно, если учесть, что нитритредуктаза эволюционно моложе нитратредуктазы (Yamanaka, 1964). У *Pseudomonas sp. sp.*, *M. denitrificans* и других бактерий нитритредуктаза системы А обладает как нитритредуктазной, так и цитохром-с-оксидазной активностью (Yamanaka, Okunuki, 1963, Newton, 1969, Lam, Nicholas, 1969) и наоборот: выделенная из аэробных клеток цитохромоксидаза выполняет в анаэробии нитритредуктазную функцию (Yamanaka et al., 1962, Yamanaka, Okunuki, 1963). Ферменты идентичны, но по сродству относительно  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{O}_2$  различны:  $K_m$  для  $\text{NO}_2^-$  4,6 мкМ, а для  $\text{O}_2$  27 мкМ (Lam, Nicholas, 1969).

В литературе довольно много данных, по которым нитратредуктазные системы в целом могут колебаться в физиологической функции. Что касается системы Б, то ее двойная роль вне сомнений. Кроме основной ассимиляторной функции, эта система у большинства денитрификаторов выполняет и энергетическую роль (Richinoty, 1966). Это связано с фактом, что окислительное фосфорилирование происходит только в связи с первой ступенью нитратовосстановления — в ходе редукции нитратов в нитриты (Nadjetroun a. Stouthamer, 1965). Дальнейшие этапы восстановления, по крайней мере по пути Б, выигрыша полезной энергии не дают. Они сложились, по-видимому, в эволюции процесса как механизм обезвреживания крайне ядовитых нитритов. Убедительным доказательством в пользу выполнения системой Б энергетической функции можно считать результаты, полученные в работах с хлоратрезистентными мутантами денитрификаторов, утратившими цитохромную систему ЦПЭ. В наших опытах хлоратрезистентные мутанты *Achr. agile* успешно росли в атмосфере аргона в полном анаэробии в присутствии нитратов, которые энергично восстанавливались. При таких условиях цитохромдефицитные мутанты лишь на 20...30% уступали в интенсивности роста диким штаммам. В аэробии такие мутанты, в си-



### 3. Об индуцируемости нитратовосстановления и процесса денитрификации

Ориентация в проблеме о двух относительно самостоятельных экзимных системах нитратовосстановления, рассмотренной нами в предыдущей части настоящей статьи, имеет для почвенной микробиологии большое значение в связи с изучением индуцируемости денитрификации различными факторами среды, что в первую очередь связано с отсутствием или наличием в среде обитания молекулярного кислорода.

Как известно, по своей природе денитрификация является анаэробным процессом. Тем не менее, экспериментальные данные по воздействию кислорода воздуха на этот процесс противоречивы. Некоторые авторы получали результаты, показывающие подавление денитрификации и сокращение продукции молекулярного азота в аэробных условиях (т.н. отрицательную индукцию денитрификации), другие такого эффекта в существенной мере не наблюдали. Причины такой противоречивости, по нашему анализу, могут быть методическими, но это не устраняет проблемы о воздействии анаэробных условий на денитрификацию.

Главные методические недостатки заключаются в следующем:

1) При применении растущих культур не всегда учитывают изменение начального количества денитрификаторов, а результаты нитратовосстановления выражают лишь в валовом виде, при этом за неопределенный, произвольно взятый промежуток времени. Такой подход не позволяет получить представления об активности процесса, что требует выражения результатов на единицу численности клеток или на единицу количества действующего белка за единицу времени. В случае растущих культур следует применять метод интегрального вычисления (Тохвер, 1965, 1972, Tohver, Laving, 1973).

2) При количественных исследованиях не всегда обращают внимание на линейную зависимость процесса от времени, т.е. на основное требование характеристики активности энзиматического процесса, и применяют слишком длительные экспозиции.

3) Если результаты опыта регистрируют по уменьшению количества (или концентрации) нитратов или же по накоплению нитритов, то источником ошибочных истолкований может стать и неучтено существование в большинстве денитрификаторов двух систем нитратовосстановления.

4) При оценке влияния  $O_2$  возникает недоразумения также от не совсем точного применения терминов "индукция" и "репрессия", которые обозначают явления, связанные с белковым синтезом и которые следует отличать от терминов "активации" и "ингибирование", обозначающих явления, связанные с изменением активности уже существующих белков.

Интегральное поведение денитрификатора складывается из деятельности отдельных энзимных систем. При анализе данных о воздействии молекулярного кислорода на жизнедеятельность денитрификаторов целесообразно поэтому начинать с рассмотрения влияния кислорода на функционирование отдельных нитратредуктазных энзимов и систем.

Результаты по изучению влияния  $O_2$  на нитратредуктазную систему А различных микробов (*A. aerogenes*, *M. denitrificans*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *Sp. itersonii*, *M. halodenitrificans*, *Achr. agile*, *Ps. denitrificans*) однозначно свидетельствует о подавлении в анаэробии биосинтеза главного компонента системы - цитохромной нитратредуктазы (Pichinoty, D'Ornano, 1961, Pichinoty, 1965, Lam, Nicholas, 1969, Downey et al., 1969, Schulp, Stouthamer, 1970, Gauthier et al., 1970, Pichinoty, 1971, Tohver, Laving, 1973). Такой эффект хорошо согласуется с данными об усилении биосинтеза цитохромов в анаэробии (Rosenberger, Kogut, 1958; Clark-Walker et al., 1967, Тохвер и Лавинг, 1972).

Для выяснения механизма воздействия  $O_2$  на биосинтез нитратредуктазы I.9.6.I сделаны первые успешные шаги. Указано, что контролирующим фактором является внутриклеточное значение окислительно-восстановительного потенциала, а не сам молекулярный кислород как конкурентный терминальный акцептор электронов (Wimpenny, Cole, 1967; Showe, De Moss, 1968). Следовательно, в клетке должен существовать редокс-чувствительный фактор, который передает "отрицательную индукцию" от  $O_2$  системам биосинтеза белка. Таким фактором может быть специфический апорепрессор, активирующийся под влиянием высоких значений  $E_0$ . О генетической природе рассматриваемых механизмов свидетельствуют данные, показывающие плеiotропный, одновременный контроль биосинтеза нитратредуктазного белка и соответствующих мембранных элементов (Azoulay et al., 1969). Можно считать вполне вероятным, что при переходе популяции денитрификаторов из анаэробии в анаэробии происходит не

просто индукция биосинтеза нитратредуктазы, а отбор соответствующих мутантов (Downey et al., 1969).

$O_2$  выступает не только как генетический репрессор биосинтеза цитохромов, в том числе и нитратредуктазы А. Под его влиянием происходит также инактивация уже существующей нитратредуктазы (Pichinoty, 1965; Schulp, Stouthamer, 1970; Тохвер и Лавинг, 1972). Следует отметить, что соотношение эффектов от кислорода как от репрессора и как от инактиватора у различных денитрификаторов сильно варьирует. У более "аэробных" представителей (например у *Ps. denitrificans*) обычно доминирует репрессивный эффект, у представителей же с менее развитыми аэробными механизмами (цитохромная система, цикл Кребса и др.), например, у *Achr. agile*, наоборот, инактивирующее воздействие кислорода может маскировать его генетическую роль (Тохвер, Лавинг, 1972). Из всего сказанного следует, что при испытании различных чистых и смешанных культур нужно учитывать как их происхождение, так и условия предварительной маточной культивации. В зависимости от условий культивации изменяется (в противоположных направлениях) активность нитратного и кислородного дыхания (Downey et al., 1969, Тохвер, 1972). В некоторых случаях (*Aer. aerogenes*) отмечено, что образующаяся в анаэробных условиях нитратредуктаза не может функционировать в аэробных условиях (Van't Riet et al., 1968).

Публикации, в которых описывается отношение нитритредуктаз к воздействию  $O_2$ , в частности на фоне их принадлежности к системам А или Б, не очень многочисленны. Судя по имеющимся данным, поведение нитритредуктазы системы А аналогично поведению соответствующей нитратредуктазы (Lam Ying, Nicholas, 1969, Downey et al., 1969). Детали эффекта  $O_2$  в данном случае, однако, еще слабо изучены.

При рассмотрении воздействия степени аэробности среды на сложение и активность нитратредуктазных систем в целом нельзя не упомянуть о роли нитратов как индукторов биосинтеза соответствующих энзимов. В анаэробиие присутствие нитратов для образования нитратредуктаз является абсолютным условием — без нитратов нитратредуктазная система А не формируется (Downey et al., 1969; Payne, Riley, 1969). Для объяснения такого эффекта предложена гипотеза, согласно которой нитратредуктаза принимает участие в регуляции собственного

синтеза: молекулы НР, не находящиеся в форме комплекса с нитратами, являются репрессорами для соответствующей генетической регуляторной системы (Cove, 1967). Крайне интересным является факт, что под влиянием нитрата по существу одновременно индуцируется биосинтез всех редуцтаз системы А ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$ - и  $\text{H}_2\text{O}$ -редуктазы) (Paune, Riley, 1969). Такой факт показывает (в полном согласии с современными представлениями молекулярной биологии), что биосинтез указанных энзимов управляется одним опероном и что они действительно образуют одно функциональное целое.

Не только терминальные акцепторы цепи переноса электронов, но и доноры электронов, т.е. органические вещества, имеют значение в индукционных явлениях нитратовосстановления. Существенным является при этом не просто концентрация донорных веществ, а их качество. Наиболее положительный эффект в смысле активации нитратной респирации проявляют промежуточные кислоты цикла Кребса (Rhodes et al., 1963, Toit et al., 1970). Положительный эффект соединений цикла Кребса хорошо понятен, так как функционирование цикла как катаболического механизма (т.е. окисление его промежуточных продуктов) предполагает функционирование ЦПЭ.

Часто в опытах по изучению денитрификации в качестве органического вещества (в качестве донора электронов) применяется глюкоза или какой-то другой сахар. Следует, однако, отметить, что глюкоза не имеет прямой связи с ЦПЭ и поддерживает нитратную респирацию лишь через промежуточные механизмы, имеющие довольно много альтернативных биохимических возможностей. В частности, в отдельных случаях денитрификаторы могут удовлетворяться теми количествами АТФ, которые возникают в результате эндогенного или нитратного брожения. Указано даже, что глюкоза может снимать денитрификационную активность и выступать как репрессор биосинтеза нитратредуктаз (Schulp, Stouthamer, 1970, Kaprálek и др., 1973).

Индукционные явления в связи с биосинтезом нитратредуктазной системы В не так глубоко изучены, как такие же явления при системе А. Указано, что главным индуктором биосинтеза ассимиляторных нитратредуктаз является сам нитрат, а главным репрессором — конечный продукт системы —  $\text{NH}_4^+$  или  $\text{NH}_3$  (Pichinoty, Méténier, 1967, Cove, Pateman, 1969, Garret, 1972). При этом  $\text{NH}_4^+$  в концентрациях, еще не подавляющих

биосинтез данных энзимов, уже уменьшает их активность (Jussim, Joneg, 1965). Относительно влияния кислорода можно указать в качестве прямых данных лишь на результаты наших опытов с хлоратрезистентными мутантами *Achr. agile* и *Ps. denitrificans* (т.е. с формами, не обладающими системой А). Они показывают, что при аэробном выращивании культур (продувание среды воздухом) получается, по сравнению с анаэробными культурами (атмосфера аргона), повышение нитратредуктазной активности примерно на 30...70%.

О стимулирующем влиянии  $O_2$  на систему В можно судить, также по данным, показывающим значительное, иногда многократное повышение меры ассимиляции нитратного азота денитрификаторами при аэрировании жидких или почвенных сред (Tohver, 1958, Walker, Nicholas, 1960, Tohver, 1973). Наоборот, при переходе от аэробноза в анаэробноза ассимиляторная функция ослабляется, вместе с усилением респираторного восстановления нитратов (там же). Следовательно, в аэробнозе редукция нитратов может усиливаться без увеличения газообразных потерь.

Прекращается ли нитратная респирация, т.е. диссимиляторная денитрификация при переходе от анаэробноза в аэробнозе? В большинстве случаев, по-видимому, полного подавления денитрификации кислородом воздуха не происходит. Это совсем естественно в свете изложенных энзимологических данных. Размеры "остаточной денитрификации" в аэробнозе определяются, прежде всего, средством соответствующих цитохромных энзимов к  $NO_3^-$  и  $O_2$ . Как указано в настоящей статье по Ламу и Николасу, значения  $K_m$  для обоих акцепторов электронов не очень различны и позволяют одновременную реакцию с  $NO_3^-$  и  $O_2$ . Следует только отметить, что по тем же данным т.н. конститутивная цитохромоксидаза имеет значительно более низкое значение  $K_m$  по отношению к  $O_2$  (около 0,1 мкМ), чем т.н. общая цитохромоксидаза. В случае *M. denitrificans* доля конститутивной оксидазы составляет около 10% от "общей" цитохромоксидазы, но в силу около 270 раз более высокого средства к  $O_2$  она существенно определяет суммарные соотношения кислородного и нитратного дыхания в аэробных условиях. Следовательно, кроме имеющихся внешних условий (концентрация нитратов, парциальное давление  $O_2$ ) значительную роль при определении эффекта от аэрирования среды должны играть генетичес-

кие свойства денитрификаторов, которые определяют количественные соотношения между энзимными фракциями, а реакция к воздействию  $O_2$  у отдельных видов денитрификаторов должна различаться. Существование таких различий показано нами относительно *Ps. denitrificans* и *Achr. agile* (Tohver, Laving, 1973). Что касается первого вида, то при аэробной экспозиции бесклеточных суспензий нами обнаружен адитивный эффект в деятельности  $NADH$ -оксидазы и  $NADH$ -нитратредуктазы - окисление  $NADH$  усиливается на 17...20% при добавлении в среду нитрата. У *Achr. agile* такой эффект еще выше и доходит в отдельных случаях до 40...50%.

Нам кажется, что противоречивые данные по воздействию кислорода воздуха (аэрации) на денитрификацию в почвенных условиях могут в определенных случаях объясняться и различным составом микрофлоры в различных почвах. Для характеристики такой зависимости нужны сравнительные данные о качественном составе денитрифицирующей микрофлоры. К сожалению, соответствующих исследований пока крайне мало и, кроме того, отсутствуют одновременные данные о денитрификационных способностях почв. Это не позволяет сделать сколько-нибудь широкие выводы о зависимости индукции естественных почв от видового состава денитрификаторов. Дальнейшие исследования в этом направлении крайне нужны, ибо, по выражению Е.Н. Мишустина, "...наиболее существенные отличия в составе микрофлоры различных почв можно надеяться найти именно при изучении видового состава низших существ почвы" (Мишустин, 1958).

#### Л и т е р а т у р а

Ильина Т.К. Ферментные системы микроорганизмов, участвующие в восстановлении нитратов. - "Агробиология", 1973, № 6, с. 136.

Клюйвер А. Метаболизм микробов и энергетическая основа жизни. - В сб.: Вклад микробов в биологию. Перевод с английского. М., Изд-во ИЛ, 1956, с. 7-38.

Мишустин Е.Н. Учение о микробных ассоциациях почвы и его развитие. Труды Ин-та микробиологии АН СССР. I. М., 1958, с. 116-127.

Опарин А.И. Жизнь, ее природа, происхождение и развитие. М., "Наука", 1968, 174 с. с ил.

Тохвер В. О стимуляции жизнедеятельности некоторых бактерий гуминовыми кислотами. = Изв. АН ЭССР, серия биол., 1965, т. I4, № 2, с. 247-255.

Тохвер В. Некоторые современные проблемы изучения денитрификации. - В сб.: Экология и физиолого-биохимические основы микробиол. превращ. азота. Тарту, 1972, с. 34-46.

Тохвер В. О перемещении нитратного азота в торфяно-болотной почве в связи с развитием денитрификаторов. - В сб.: Экология и физиолого-биохимические основы микробиол. превращ. азота. Тарту, 1972, с. 237-243.

Тохвер В., Лавинг А. Индуцируемость нитратредуктазных систем у некоторых типичных денитрификаторов. - В сб.: Экология и физиолого-биохимические основы микробиол. превращ. азота. Тарту, 1972, с. 303-309.

Azoulay, E., Puig, J., Martins Rosado de Sousa, M.L. Régulation de la synthèse de la nitrate-reductase chez *Escherichia coli* K 12. - Ann. Inst. Pasteur, 1969, v. 117, No 4, p. 474-485.

Broda, E. The Origins of Bacterial Respiration. - In: Molecular Evolution, vol. 1. North-Holland, 1971, pp. 446.

Broda, E. Bioenergetic Evolution. - In: Molecular Evolution, vol. 2. North-Holland, 1971, pp. 224.

Chang, J., Lascelles, J. Nitrate Reductase in Cell-free Extracts of a Haeminrequiring strain of *Staphylococcus aureus*. - Biochem. J., 1963, v. 89, No 3, pp. 503-510.

Clark-Walker, G.D., Linnane, A.W. A Comparison between Cytoplasmic Respiratory Deficient Mutant Yeast and Chloroamphenicol-inhibited Wild Type Cells. - J. Cell Biol., 1967, v. 34, No 1, pp. 1-14.

Cole, J.A., Wimpenny, J.W.T. Metabolic Pathways for Nitrate

- Reduction in *Escherichia coli*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, v. 162, No 1, pp. 39-48.
- Cove, D.J. Kinetic Studies of the Induction of Nitrate Reductase and Cytochrome c Reductase in the Fungus *Aspergillus nidulans*. I. - *Biochem. J.*, 1967, v. 104, No 3, pp. 1033-1039.
- Cove, D.J., Pateman, I.s. Autoregulation of the Synthesis of Nitrate Reductase in *Aspergillus nidulans*. - *J. Bacteriol.*, 1969, v. 97, No 3, pp. 1374-1378.
- Downey, R.I., Kiskiss, D.F., Huner, J.H. Influence of Oxygen on Development of Nitrate Respiration in *Bacillus stearothermophilus*. - *J. Bacteriol.*, 1969, v. 98, No 3, pp. 1056-1062.
- Egami, F. Biochemistry of Nitrate Reduction. - *Svensk kem. Tidskr.*, 1957, v. 96, p.652.
- Egami, F. A Comment to the Concept on the Role of Nitrate Fermentation and Nitrate Respiration in an Evolutionary Pathway of Energy Metabolism. - *Z.Allg. Mikrobiol.*, 1973, B. 13, No 2, S. 177-181.
- Egami, F., Ishimoto, M., Taniguchi, S. The Electron Transfer from Cytochromes to Terminal Electron Acceptors in Nitrate Respiration and Sulphate Respiration. - In: *Haematin Enzymes*. New York, Pergamon Press, 1961, p. 392.
- Garrett, R.H. The Induction of Nitrite Reductase in *Neurospora crassa*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, v. 264, No 3, pp. 481-489.
- Gauthier, D.K., Clark-Walker, G.D., Garrard, W.T., Lasaller, J.R., Lasaller, J. Nitrate Reductase and Soluble Cytochrome c in *Spirillum itersonii*. - *J. Bacteriol.*, 1970, v. 102, No 3, pp. 797-803.
- Hackenthal, E., Eichler, I. Substrate und kompetitive Inhibitoren der assimilatorischen Nitratreduktase aus *Aerobacter aerogenes*. - *Z. med. Mikrobiol. und Immunol.*, 1967, B. 153, H. 3, S. 215-224.
- Hadjipetron, L.P., Stouthamer, A.H. Energy Production During Nitrate Respiration by *Aerobacter aerogenes*. - *J. Gen. Microbiol.*, 1965, v. 38, No 1, pp. 29-34.

- Heredia, C.F., Medina, A. Nitrate Reductase and Related Enzymes in *Escherichia coli*. - *Biochem. J.*, 1960, v. 77, No 1, pp. 24-30.
- Inderlied, C.B., Delwiche, E.A. Nitrate Reduction and the Growth of *Veillonella alcalescens*. - *J. Bacteriol.*, 1973, v. 114, No 3, pp. 1206-1212.
- Ishimoto, M., Egami, F. Meaning of Nitrate and Sulfate Reduction in the Process of Metabolic Evolution. - In: *The Origin of Life on the Earth* ( *Acad. Sci. U.S.S.R.* ). New York, Pergamon Press, 1959, p. 555.
- Itagaki, E., Fudjita, T., Sato, R. Reactions of Cytochrome b, and Nitrate Reductase in a Preparation Solubilized from *Escherichia coli*. - *J. Biochem.*, 1963, v. 33, No 5, pp. 389-397.
- Jyssum, K., Joner, P.E. Hydroxylamine as a Possible Intermediate in Nitrate Reduction by *Bacterium anitratum* (B5W). - *Acta Pathol. et microbiol. scand.*, 1966, v. 67, No 1, pp. 139-148.
- Kaprálek, F., Doležal, J., Drahoňovská, I. Effect of Glucose on the Induced Synthesis of Bacterial Respiratory Nitrate Reductase and Tetrathionate Reductase. - "*Folia microbiol.*", 1973, v. 18, No 1, pp. 1-6.
- Kemp, J.D., Atkinson, D.E., Ehret, A., Lazzarini, R.A. Evidence for the Identity of the NADP Specific Sulfite and Nitrite Reductases of *Escherichia coli*. - *J. Biol. Chem.*, 1963, v. 238, No 10, pp. 3466-3471.
- Kluyver, D.J. Some Aspects of Nitrate Reduction. Symp. VI Intern. Congr. Microbiol: *Microbiol Metabolism*, 1954, p. 71-91.
- Knook, D.L., Riet, J. van'T, Planta, R.J. The Participation of Cytochromes in the process of Nitrate Respiration in *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, v. 292, No 1, pp. 237-245.

- Lam, Y., Nicholas, D. A Nitrate Reductase from *Micrococcus denitrificans*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, v. 178, No 2, pp. 225-235.
- Lam, Y., Nicholas, D.J.D. A Nitrate Reductase with Cytochrome Oxidase Activity from *Micrococcus denitrificans*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, v. 180, No. 3, pp. 459-472.
- Matsubara, T. Studies on Denitrification. XIII. Some Properties of the  $N_2O$ -anaerobically Grown Cell. - *J. Biochem.*, 1971, v. 69, No 6, pp. 991-1001.
- McCollum, Hopkins, J. Symposium on Metabolism of Inorganic Compounds. II. Enzymatic Pathways of Nitrate, Nitrate, and Hydroxylamine Metabolism. - *Bact. Reviews*, 1962, v. 26, No 1, pp. 16-41.
- Myata, M., Mori, T. Studies on Denitrification. I. The "Denitrifying Enzyme" as a Nitrite Reductase and the Electron Donating System for Denitrification. - *J. Biochem. (Jap.)*, 1969, v. 66, No 4, pp. 463-471.
- Myata, M. Studies on Denitrification. XIV. The Electron Donating System in the Reduction of Nitrite Oxide and Nitrate. - *J. Biochem. (Jap.)*, 1971, v. 70, No 2 pp. 205-213.
- Murray, E.D., Sanval, B.D. An Immunological Inquiry into the Identity of Assimilatory and Dissimilatory Nitrate Reductase from *Escherichia coli*. - *Canad. J. Microbiol.*, 1963, Vv. 9, No 6, pp. 781-790.
- Nason, A., Evans, H.J. Triphosphopyridine-Nucleotide Nitrate Reductase in *Neurospora*. - *J. Biol. Chem.*, 1953, v. 202, No 2, pp. 655-673.
- Newton, N. The Two-Haem Nitrite Reductase of *Micrococcus denitrificans*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, v. 185, No 2, 316-331.
- Nonnik, H. Investigations on Denitrification in Soil. - *Acta agric. scand.*, 1956, v. 6, No 1, pp. 195-228.
- Olson, J.M. The Evolution of Photosynthesis. - *Science*, 1970, v. 168, P. 438.

- Ottow, J.C. Mechanism of Iron Reduction by Nitrate Reductase Inducible Aerobic Microorganisms. - "Naturwissenschaften", 1969, B. 56, H. 7, S. 371.
- Pateman, J.A., Cove, D.J., Rever, B.M., Roberts, D.B. A Common Co-Factor for Nitrate Reductase and Xanthine Dehydrogenase which also Regulates the Synthesis of Nitrate Reductase. - "Nature", 1964, v. 201, No 4914, pp. 58-60.
- Payne, W.J., Riley, P.S. Suppression by Nitrate of Enzymatic Reduction of Nitric Oxide. - Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 1969, v. 132, No 1, pp. 258-260.
- Pichinoty, F. Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B: methodes. - Bull. Soc. chim. biol., 1965, v. 47, No 7, p. 1526-1528.
- Pichinoty, F. Contribution à l'étude des nitrate - réductases respiratoires bactériennes. - C.R. Soc. Biol., 1964, v. 158, p. 1122.
- Pichinoty, F. L'inhibition par l'oxygène de la dénitrification bactérienne. - Ann. Inst. Pasteur, 1965, v. 109, N° 3, Suppl., pp. 248-255.
- Pichinoty, F. Propriétés, régulation et fonctions physiologiques des nitrate-réductases bactériennes A et B. - Bull. Soc. Franc. Physiol. Vég., 1966, v. 12, N° 2, p. 97-104.
- Pichinoty, F. Les nitrate-réductases bactériennes. VIII. Etude préliminaire de l'enzyme de Micrococcus halodenitrificans. - Arch. Mikrobiol., 1971, B. 76, H. 1, S. 83-90.
- Pichinoty, F., D'Ornano, L. Inhibition by Oxygen of Biosynthesis and Activity of Nitrate Reductase in Aerobacter aerogenes. - "Nature", 1961, v. 191, No 4791, pp. 879-881.
- Pichinoty, F., Rigano, C., Bigliardi-Rouvier, J., Minor, L. de, Picchaud, M. Recherche des nitrate-réductases A et B chez les Enterobacteriaceae. - Ann. Inst. Pasteur, 1966, v. 110, N° 1, p. 126-130.

- Pichinoty, F., Méténier, G. Régulation de la biosynthèse et localisation de la nitrate-réductase d'*Hansenula anomala*. - Ann. Inst. Pasteur, 1967, v. 112, N° 6, p. 701-711.
- Pichinoty, F., Mucchielli, A., Pelatan, C. Les nitrate-réductases bactériennes. VII. Mesure de l'activité des enzymes A et B par une méthode colorimétrique. - Arch. Mikrobiol., 1971, B. 75, H. 4, S. 353-359.
- Piéchaud, M., Pichinoty, F., Azoulay, E., Couchoud-Beaumont, P., Gendre, J. Recherches sur des mutants bactériens ayant perdu les activités catalytiques liées à la nitrate-réductase A.I. Description des méthodes d'isolement. - Ann. Inst. Pasteur, 1969, v. 116, N° 3, p. 276-287.
- Prakash, O., Sadana, J.C. Metabolism of Nitrate in *Achromobacter fischeri*. - Canad. J. Microbiol., 1973, v. 19, No 1, pp. 15-25.
- Rhodes, M., Best, A., Payne, W.J. Electron Donors and Cofactors for Denitrification by *Pseudomonas perfectomarinus*. - Canad. J. Microbiol., 1963, v. 9, No 6, pp. 799-807.
- Riet, van 'T, J., Stouthamer, A.H., Planta, R.J. Regulation of Nitrate Assimilation and Nitrate Respiration in *Aerobacter aerogenes*. - J. Bacteriol., 1968, v. No 5, 1455-1464.
- Rosenberger, R.F., Kogut, M. The Influence of Growth Rate and Aeration in the Respiratory and Cytochrome System of a Fluorescent *Pseudomonad* Grown in Continuous Culture. - J. Gen. Microbiol., 1958, v. 19, No 2, pp. 228-243.
- Ruiz-Herrera, I., De Moss, J.A. Nitrate Reductase Complex of *Escherichia coli* K-12: Participation of Specific Formate Dehydrogenase and Cytochrome b<sub>1</sub> Components in Nitrate Reduction. - J. Bacteriol., 1969, v. 99, No 3, pp. 720-729.
- Sato, R. Fisiologia oksidado per nitrato. - Scientia Revuo, 1950, v. 2, p. 122.

- Schlp, I., Stouthamer, A. The Influence of Oxygen, Glucose, and Nitrate upon the Formation of Nitrate Reductase and the Respiratory System in *Bacillus licheniformis*. - *J. Gen. Microbiol.*, 1970, v. 64, No 2, pp. 195-203.
- Showe, M., De Moss, J.A. Localization and Regulation of Synthesis of Nitrate Reductase in *Escherichia coli*. - *J. Bacteriol.*, 1968, v. 95, No 4, pp. 1305-1313.
- Sinclair, P.R., White, D.C. Effect of Nitrate, Fumarate, and Oxygen on the Formation of the Membran-Bound Electron Transport System of *Haemophilus parainfluenzae*. - *J. Bacteriol.*, 1970, v. 101, No 2, pp. 365-372.
- Stouthamer, A.H. Nitrate Reduction in *Aerobacter aerogenes*. I. Isolation and Properties of Mutant Strains Blocked in Nitrate Assimilation and Resistant against Chlorate. - *Arch. Mikrobiol.*, 1967, B. 56, H.1. S. 68-80. - II. Characterization of Mutants Blocked in the Reduction of Nitrate and Chlorate. - *Arch. Mikrobiol.*, *ibid.*
- Strat, P.A., Mason, A. Characterization of a Nitrate Reductase from the Chemoautotroph *Nitrobacter agilis*. - *J. Biol. Chem.*, 1965, v. 240, No 3, pp. 1412-1427.
- Sugawara, K., Oana, S., Koyama, T. Chemistry of the Aqueous Inclusion in Nepheline-Basalt from Nagahama, Hamada-si, Simane Prefecture. I. - *Proc. Japan. Acad.*, 1944, v. 20, p. 721. - II - *ibid.*, 1949, v. 25, p. 103.
- Takahashi, A., Taniguchi, S., Egami, F. Inorganic Nitrogen Compounds: Distribution and Metabolism. - In: *Comparative Biochemistry*, v.V., New York, Acad. Press, 1963, p. 91.
- Tan, T.L. Physiologie der Nitratreduktion bei *Pseudomonas aeruginosa*. - *Z. Allg. Mikrobiol.*, 1973, B. 13, H. 1, S. 83-94.
- Taniguchi, S. Cell and Nitrate Development in the Study of Nitrate-Respiring Systems. - In: *Different Slices of Biochemistry (in Japanese)*. Tokyo, Kodansha, 1971, p. 122.

- Taniguchi, S., Sato, R., Egami, F. The Enzymatic Mechanisms of Nitrate and Nitrite Metabolism in Bacteria. - In: A Symp. of Inorg. Nitrogen Metabolism, Baltimore, p. 87.
- Toit, P.J. du, Taezien, D.F., Davies, T.R. Enzymatic Patterns into Denitrifying Microbial Populations. - Water Res., 1970, v. 4, No 2, pp. 149-156.
- Tohver, V. Denitrifikatsioonist kuivendatud turvasmullas. - TRÜ Toimetised, 1958, vihik 55, lk. 88-96.
- Tohver, V. Lämmastikuringe iseärasused kui bioproduktiooni limiteerivad faktorid. - IX Eesti Loodusuurijate Põeva ettekanded. Tartu, 1970, lk. 84-90.
- Tohver, V. The Character of Nitrate Transformation and the Development of Denitrifying Bacteria in Peat Soil in Dependence on Some Ecological Factors. - In: Nitrogen Supply for Plant Growth. Tartu, 1973, p. 50-68.
- Tohver, V., Laving, A. A Comparative Study of the physiology and Biochemistry of Some Typical Soil Denitrifiers. - In: Nitrogen Supply for Plant Growth. Tartu, 1973, pp. 69-87.
- Walker, G., Nicholas, D.J.D. An Iron Requirement for a Dissimilatory Nitrate Reductase in *Neurospora crassa*. - "Nature", 1960, v. 189, No 4759, pp. 141-142.
- White, D., Smith, L. Haematin Enzymes of *Haemophilus parainfluenzae*. - J. Biol. Chem., 1962, v. 237, pp. 1332
- Wimpenny, J.W.T., Cole, J.A. The Regulation of Metabolism in Facultative Bacteria. III. The Effect of Nitrate. - Biochim. Biophys. Acta, 1967, v. 148, No 1, pp. 233-242.
- Yamanaka, T. Identity of *Pseudomonas* Cytochrome Oxidase with *Pseudomonas* Nitrite Reductase. - "Nature", 1964, No 4955, pp. 253-255.
- Yamanaka, T. Cytochrome c and Evolution. - "Nature", 1967, March 25, pp. 1183-1186.
- Yamanaka, T., Ota, A., Kidzimoto, S., Miki, K. Sympos. Enzyme Chem., 1962, v. 17, pp. 123-130 in Japanese, Engl. Rev. - pp. 130-131.

Yamanaka, T., Okunuki, K. Biochim. Biophys. Acta, 1963, v. 67, p. 379 (after Yamanaka, t., 1967).

Yamanaka, T., Okunuki, K. Comparative Studies on Reactivities of Cytochrome c with Cytochrome oxidases. - In: Structure and Functions of Cytochromes. Tokyo, 1967, p. 390.

Yamanaka, T., Okunuki, K. Comparative Biochemistry of Cytochromes and Biological Evolution. - In: Cytochromes (in Japanese). Tokyo, Asakura Publ. Co, 1971, p. 238.

## UPON THE ENZYMOLOGY OF DENITRIFICATION

V. TOHVER

### Summary

In the present paper the evolutionary situation of the enzyme systems of denitrification in energy metabolism, the nature and properties of these systems, and the inducibility of nitrate and nitrite reduction by anaerobic resp. aerobic conditions are discussed on the basis of literary and original data.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НИТРАТРЕДУКТАЗНЫХ СИСТЕМ  
*Achromobacter agile* И *Pseudomonas denitrificans*

А. Лавинг, А. Лаазмер, В. Тохвер

Восстановление нитратов денитрификаторами выполняет две функции - ассимиляторную и диссимиляторную. Уже более двадцати лет назад некоторые авторы предполагали существование различных окислительно-восстановительных систем, выполняющих названные функции (Nason, Evans, 1953; Nicholas, Stevens, 1955). Эти системы, впоследствии идентифицированные как флавопротеидная и цитохромная нитратредуктазные системы, часто называют, по Пичиноти, соответственно "система Б" и "система А" (Pichinoty, 1964). У представителей *Enterobacteriaceae* (изучали 102 штамма) цитохромная система выполняет диссимиляторную, флавопротеидная - ассимиляторную и, в большинстве случаев, также диссимиляторную функцию (Pichinoty et al, 1966). Среди видов *Enterobacteriaceae* цитохромная "система А" является более распространенной, чем флавопротеидная система; даже в пределах одного рода некоторые виды могут иметь две, некоторые только одну систему. Так, *Pseudomonas aeruginosa* и *Ps. stutzeri* содержат обе системы, в то же время *Ps. fluorescens*, *Ps. multivorans*, *Ps. acidovorans*, *Ps. maltophila* - "А". *Ps. testosteroni*, *Ps. pseudoalcaligenes* - только систему "Б". (Pichinoty et al., 1966, Pichinoty et al., 1969).

Следует отметить, что все эти данные получены при помощи т.н. "хлоратного теста", который, однако, имеет известные недостатки: при развитой цитохромной системе, флавопротеидную систему этим тестом обнаружить не удастся (Pichinoty, Chipraux, 1969).

По мнению некоторых авторов, ассимиляторную и диссимиляторную функции нитровосстановления выполняет только одна нитратредуктаза (Van't Riet et al. 1968). Иммунологическими методами продемонстрирована почти полная идентичность двух нитратредуктаз у *Escherichia coli* (Murray, Samval, 1963).

Высказано предположение об одновременном наличии нескольких диссимиляторных нитратредуктаз в одном организме (Taniguchi et al. 1955).

По имеющимся литературным данным, цитохромная и флавопротеидная нитратредуктазные системы отличаются друг от друга по чувствительности к кислороду. Цитохромная система, во всяком случае у представителей *Enterobacteriaceae*, синтезируется только в анаэробных условиях (Pichinoty et al. 1969). Зато чувствительность флавопротеидной нитратредуктазной системы к кислороду колеблется в широких пределах. Кислород подавляет синтез "системы Б" у *Providencia alcalifaciens*, *Pr. stuartii*, *Aeromonas hydrophila* и *Edwardsiella tarda*. Синтез флавопротеидной системы у *Micrococcus denitrificans* не зависит от присутствия кислорода (Pichinoty, 1970).

Ассимиляторные нитратредуктазы *Azotobacter vinelandii* а также водорослей (*Chlorella*) являются строго аэробными (Taniguchi, Ohmachi, 1960; Relimpio et al. 1971; Jetschmann et al. 1972).

Следовательно, не существует закономерностей, по которым можно судить о том, какие нитратредуктазные системы имеет данный организм и каким образом реагируют нитратредуктазные системы на действие кислорода.

Целью настоящей работы было изучение нитратредуктазных систем двух типичных денитрификаторов — *Achromobacter agile* и *Pseudomonas denitrificans*. Для выяснения наличия цитохромной и флавопротеидной нитратредуктазных систем у этих бактерий был выбран иной подход к решению проблемы в отличие от применяемого обычно "хлоратного теста". Чтобы различить цитохромную и флавопротеидную нитратредуктазные системы были проведены опыты с ингибиторами переноса электронов и с хлоратрезистентными мутантами, дефицитными по "системе А". О природе хлоратрезистентности существует несколько мнений. Кейс предполагает, что в результате мутации происходят перестройки структуры мембран, где локализуется цитохромная нитратредуктазная система (Casse, 1970). По Макгрегору и Шнайман, в мутагенезе исчезает белок ("organizational protein"), ответственный за монтаж "системы А" в мембране (MacGregor, Schnaitman, 1971).

Опыты, результаты которых излагаются в настоящей статье, являются продолжением работ над теми же денитрификаторами, где применялись окислительно-восстановительные красители с различными значениями  $E_0$ . В этих опытах были получены предварительные данные, позволяющие сделать заключение о существ-

вовании двух систем нитратовосстановления в обоих денитрификаторах (Тохвер, Лавинг, 1972).

## М е т о д и к а

### Объекты исследований

Объектами исследования служили два вида денитрификаторов - *Pseudomonas denitrificans* (Christ.) Bergey, 1923 и *Achromobacter agile* Bergey et al., 1923, чистые культуры которых были получены в 1967 году из Московского филиала Всесоюзного научно-исследовательского института почвенной микробиологии. Из-за высокой денитрифицирующей активности и способности к интенсивному росту на синтетических средах эти денитрификаторы представляют собой удобные объекты исследования. Музейные культуры выдерживают на МПА с 0,1%  $\text{KNO}_3$  при температуре +2... +4°C.

### Получение хлоратрезистентных мутантов

Хлоратрезистентные мутанты изолировали по Макгрегору и Шнайтман (MacGregor, Schnaitman, 1971) на МПА с прибавкой 0,2%  $\text{NaClO}_3$ . Исходные культуры (суспензии клеток) инкубировали на этой среде в строго анаэробных условиях в атмосфере аргона. Полученные мутантные колонии повторно пересевали на указанную среду и выдерживали в дальнейшем в холодильнике при температуре +2... +4°C, как и исходные культуры.

### Получение клеточной массы

Маточные культуры для получения биомассы изучаемых бактерий (как исходных, так и мутантных) выращивали в аэробных и анаэробных условиях в модифицированной среде Гилл-тэя (дист. вода - 1000 мл,  $\text{Na}$ -цитрат - 2 г.,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1 г.,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1 г.,  $\text{KNO}_3$  - 3 г.,  $\text{MgSO}_4$  - 2 г.,  $\text{CaCl}_2$  - 0,2 г.,  $\text{FeCl}_3$  - следы, раствор бромтимолового синего - каплями до ясной зеленой окраски).

При аэробном выращивании 1-литровые колбы с 750 мл среды продували в течение инкубации (24 часа) стерильным

воздухом с интенсивностью 1,2 объема в минуту, что обеспечивало насыщение среды кислородом за весь цикл инкубации (5... 7 мг  $O_2$ /л). При анаэробном выращивании такие же колбы с 1000 мл среды непосредственно после заражения последней продували в течение 5 минут аргоном. Затем колбы присоединяли к резиновым резервуарам, наполненным очищенным от кислорода аргоном, и помещали в термостат. Инкубация продолжалась 48 часов. Температура инкубации культур обоих типов  $+27,5^{\circ}C$ .

Физиологически омоложенный инокулят для получения маточных культур биомассы во всех случаях выращивали в одинаковых микроаэрофильных условиях без экранирования доступа воздуха под ватными пробками в 100-мл Эрленмейеровских колбах с 50 мл вышеуказанной среды при  $27,5^{\circ}C$  в течение 24 часов.

После назначенного времени инкубации содержимое колб быстро охлаждали на льду до  $0^{\circ}C$ . Биомассу собирали центрифугированием при температуре  $0^{\circ}C$  в течение 20 мин, при 3800 г. Полученную массу промывали три раза 0,1М фосфатным буфером pH 6,8.

#### Получение бесклеточных экстрактов

Отцентрифугированную массу доводили до пастообразной консистенции путем прибавления 0,1М фосфатного буфера pH 6,8 и разрушали клетки в дезинтеграторе типа Hughes при температуре  $-60^{\circ} \pm 5^{\circ}C$ .

Разрушенную гомогенную массу суспендировали в 5-кратном объеме фосфатного буфера с  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O (10^{-4}M)$   $MgCl_2 \cdot 6H_2O (5 \cdot 10^{-3}M)$  и центрифугировали при  $\pm 0^{\circ}C$  с фактором разделения 16000g в течение 20 мин. Надосадочная жидкость служила белковым препаратом для дальнейших операций. Микроскопический контроль показал полное отсутствие неразрушенных клеток.

Белковый раствор диализовали против фосфатного буфера (1 : 500) в течение 10 часов с прибавкой в буфер  $10^{-4}M$   $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ;  $5 \cdot 10^{-3}M$   $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ;  $2 \cdot 10^{-3}M$  ЭДТА. Диализованный белок продували охлажденным аргоном и выдерживали в ледяной ванне в холодильнике при  $0... +1^{\circ}C$ .

Концентрацию белка в бесклеточных экстрактах разрушенных клеток определяли по Лоури (Lowry et al., 1951).

Определение нитратредуктазной и хлоратредуктазной  
активности

Нитратредуктазную, соотв. хлоратредуктазную активность определяли косвенно по интенсивности окисления  $\text{NADH}$  (или  $\text{NADPH}$ ) в условиях, где единственным экзогенным акцептором электронов служил нитрат или хлорат.

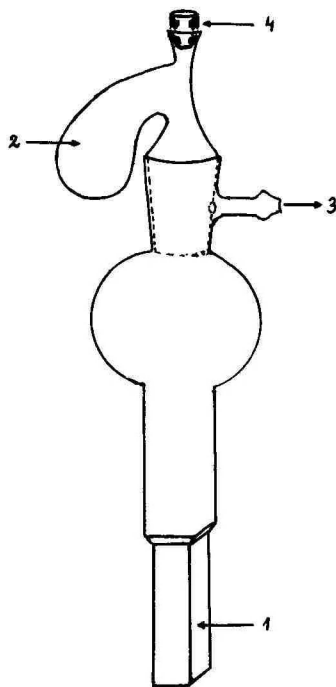


Рис. 1. Схема кварцевой трубки Тунберга

- 1 - киветная часть
- 2 - боковой сосуд
- 3 - в насос
- 4 - резиновая пробка

Обе активности определяли спектрофотометрически при  $\lambda = 339 \text{ нм}$ , т.е. при длине волны, соответствующей максимальному поглощению  $\text{NAD(P)H}$ . Определения производили в I-см кварцевых трубках Тунберга, снабженных боковым сосудом (см. схему на рис. 1) в вакууме порядка  $10^{-3}$ . При подготовке трубок к экспозиции их вначале наполняли аргоном при помощи стеклянного капилляра. После наполнения трубки газом в ее киветную часть вносили 1 мл белкового раствора с 0,2 мг белка в миллилитре и 1,25 мл фосфатного буфера pH 6,8 с прибавкой нитрата или хлората (8,0 мг/мл), в соответствующих вариантах и с предусмотренными ингибиторами цепи переноса электронов (см. ниже). В боковой сосуд вносили 0,25 мл раствора  $\text{NADH}$  или  $\text{NADPH}$  с концентрацией 1 мг/мл. После этого в трубках создавали вакуум. Экспозицию в спектрофотометре начинали после 10-минутной предварительной инкубации подготовленной трубки при  $30^{\circ} \text{C}$ .

В качестве ингибиторов ЦПЭ применяли уретан или барбитурат, оба в концентрации  $10^{-3}$  М. Как известно, эти препараты блокируют ЦПЭ в первых звеньях цитохромной части цепи. Их воздействие позволяет выключить "диссимиляторную" цитохромную нитратредуктазу I. 9.6.I в исходных культурах (см. стр. 22 настоящего сборника).

Все растворы, применяемые в работе, сразу после изготовления продувались аргоном и термостатировались при температуре дальнейшей работы ( $+30^{\circ}$  С). В контрольных опытах с денатурированным белком (нагревание выше  $50^{\circ}$  С) окисления не наблюдалось.

#### Установление оптимальной среды экспозиции

Уже предварительные разведочательные работы показали большое значение состава экспозиционной среды для получения достоверных (стабильных) результатов. Для установления среды, позволяющей получать стабильные максимальные значения, были проведены специальные работы. В основу сравнения брали скорость окисления NADH или NADPH в базисной среде, содержащей кроме коэнзима и компонентов 0,1 М фосфатного буфера только 8,04 мг/мл  $KNO_3$  или  $NaClO_3$  (обозначаемая как 100%-ная активность). Прибавление в базисную среду молибдата, хлорида магния и ЭДТА в концентрациях, указанных в предыдущей части статьи, приводило к значительному повышению скорости окисления коэнзима. Обычно рекомендуемый же восстановленный глутатион ( $10^{-3}$  М) дал очень нестойкие результаты. Поэтому в дальнейшем его не применяли. (См. табл. I).

Таблица I

#### Значение состава экспозиционной среды для результатов определения нитратредуктазной активности белковых растворов

Состав экспозиционной среды	Скорость окисления коэнзима, %
№ 1 Базисная (буфер, коэнзим, $KNO_3$ )	100
№ 2 Базисная + молибдат + хлорид магния	206
№ 3 Базисная + ЭДТА	228
№ 4 Базисная + молибдат + хлорид магния+ ЭДТА	283
№ 5 Базисная + восст. глутатион	70... 130

### Определение NADH - оксидазной (акцептор O<sub>2</sub>) активности

NADH-оксидазную (акцептор O<sub>2</sub>) активность определяли спектрофотометрически в обычных 1-см кварцевых кюветках (длина волны, как и в предыдущем, 339 нм, температура 30° С). Экспозиционная среда содержала 1 мл (0,2 мг/мл) - белкового раствора, 0,25 мл (1 мг/мл) раствора NADH и 1,25 мл 0,1 М фосфатного буфера с 10<sup>-4</sup> М NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O и 5·10<sup>-3</sup> М MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. В некоторых опытах добавляли ЭДТА в концентрации 2·10<sup>-3</sup> М. Перед экспозицией и в течение экспозиции среду продували кислородом. В контрольных опытах с денатурированным белком окисления NADH не наблюдали.

### Определение K<sub>m</sub>

Для выяснения зависимости нитратредуктазной активности от концентрации субстрата (нитрата, хлората), применяли экспозиционные среды с различным содержанием KNO<sub>3</sub> (0,01... 8,0 мг/мл). Регистрировали динамику окисления NADH при длине волны 339 нм, при температуре 30° С. Применяли экспозиционную среду № 4 (табл. I). K<sub>m</sub> определяли графически (Lineweaver, Burk, 1934).

## Результаты и обсуждение

### Определение нитратредуктазной активности

Результаты определения нитратредуктазной активности представлены в таблицах 2 и 3 и на рисунках 2 и 3.

Опыты с никотинамидными донорами электронов показывают, что активность бесклеточных экстрактов *Achr. agile* и *Pe. denitrificans* обнаруживается только с NADH, а не с NADPH.

На рис. 2 и 3 представлены данные о влиянии степени аэрируемости маточных культур на нитратредуктазную активность полученных экстрактов. При сравнении результатов выявляется, что нитратредуктазная активность белка дикого штамма *Achr. agile* при предварительной культивации в аэробных условиях (10... 16 нМ/мг мин) выше активности бел-

ка, полученного из анаэробной маточной культуры (3,55... 7,78 нМ/мг мин).

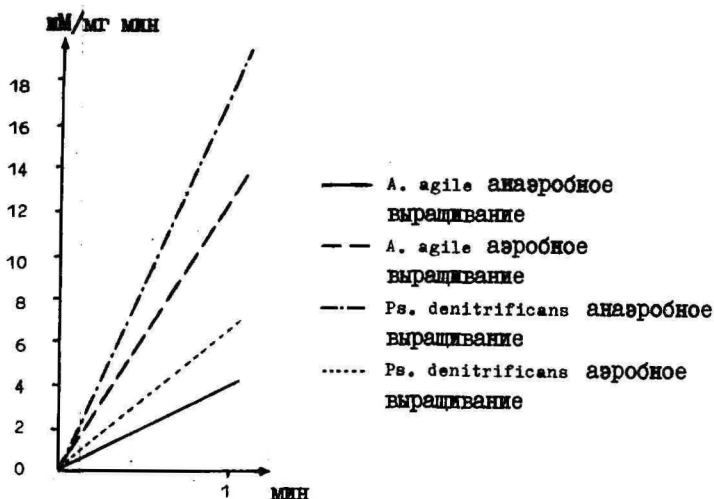


Рисунок 2. Динамика окисления NADH бесклеточными экстрактами диких штаммов *Achromobacter agile* *Pseudomonas denitrificans* при анаэробной экспозиции с нитратом

У дикого штамма *Ps. denitrificans* наблюдается противоположный эффект: нитратредуктазная активность бесклеточных экстрактов, полученных из анаэробно выращенных клеток (10,8 ... 26,0 нМ/мг мин) значительно превышает активность белка из аэробно выращенных клеток (6,12 ... 7,34 нМ/мг мин).

Такой эффект согласуется с нашими более ранними результатами. В опытах с клеточными суспензиями аэробное выращивание маточных культур (по сравнению с анаэробным выращиванием) приводило к 4...5-кратному повышению нитратредуктазной активности у *Achr. agile*. У *Ps. denitrificans* в аналогичных опытах наблюдался (как и в опытах с бесклеточными экстрактами, лежащих в основе настоящей статьи) противоположный эффект: нитратредуктазная активность клеточных суспензий, полученных из анаэробно выращенных культур, поч-

ти в 2 раза превышала нитратредуктазную активность клеточных суспензий, полученных из аэробно выращенных культур. Как известно, нитратное дыхание тесно связано с функционированием цитохромов, поэтому вполне закономерно, что обнаружены различия и в цитохромных спектрах изученных денитрификаторов: у *Ps. denitrificans* количество цитохромов при анаэробном выращивании в 9 ... 10 раз, а у *Achr. agile* всего лишь в два раза выше, чем при аэробном выращивании маточных культур. Следовательно, режим выращивания, обуславливающий более высокое содержание цитохромов, вызывает и более высокую нитратредуктазную активность клеточных суспензий и бесклеточных экстрактов (Тохвер, Лавинг, 1972).

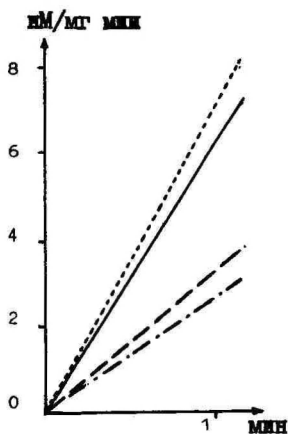


Рисунок 3. Динамика окисления NADH бесклеточными экстрактами хлоратрезистентных мутантов *Achromobacter agile* *Pseudomonas denitrificans* при анаэробной экспозиции с нитратом  
 — *A. agile* мутантный, анаэробное выращивание  
 --- *A. agile* мутантный, аэробное выращивание  
 - - - *Ps. denitrificans* мутантный, анаэробное выращивание  
 ..... *Ps. denitrificans* мутантный, аэробное выращивание

На рис. 3 представлены данные о влиянии режима выращивания на нитратредуктазную активность хлоратрезистентных мутантов *Achr. agile* и *Ps. denitrificans*. По приведенному графику видно, что зависимость нитратредуктазной активности хлоратрезистентных мутантов от аэрирования маточных культур отличается от этой зависимости у диких штаммов *Achr. agile* и *Ps. denitrificans*. Нитратредуктазная активность хлоратрезистентных мутантов *Achr. agile* более высокая при анаэробном выращивании (анаэробное выращивание — 4,33 ... 8,55 нМ/мг мин,

аэробное выращивание - 3,0 ... 3,7 нМ/мг мин). Нитратредуктазная активность белка хлоратрезистентных мутантов *Ps. denitrificans*, наоборот, более высокая при аэробном выращивании маточных культур (аэробное выращивание - 5,48 ... 8,72 нМ/мг мин, анаэробное выращивание - 2,11 ... 3,27 нМ/мг мин).

По литературным данным, аэрирование маточных культур не подавляет, а в некоторых случаях даже повышает активность флавопротеидных нитратредуктаз (Taniguchi, Ohmachi, 1960, Pichinoty, Metenier, 1966, Jetschmann et al., 1972). Поэтому высокая NADH:нитратредуктазная активность бесклеточных экстрактов хлоратрезистентных мутантов *Achr. agile*, полученных из аэробно выращенных культур, является неожиданной.

Следовательно, аэрируемость маточных культур диких штаммов и хлоратрезистентных мутантов *Achr. agile* и *Ps. denitrificans* различным образом влияет на нитратредуктазную активность полученного из этих культур белка.

Следует обратить внимание на варьирование значений полученных результатов в широких пределах (табл. 2). По нашему мнению, такой диапазон колебаний зависит не от свойств белка, а от длительности и многоэтапности процедур анализа, что неизбежно влияет на состояние термолабильной и кислородчувствительной NADH:нитратредуктазы.

Что касается эффектов примененных ингибиторов (табл. 2), то их влияние является совсем стабильным. Ингибирующее действие уретана и барбитурата зависит от режима выращивания маточных культур. Особенно наглядно это выявляется у дикого штамма *Ps. denitrificans*: при анаэробном выращивании маточных культур барбитурат ингибирует нитратредуктазную активность на 68...70%, при аэробном выращивании на 12...18%. Уретан ингибирует эту же активность соответственно на 35...52% и на 40...46%.

Наблюдаемая закономерность - нитратредуктазная активность белка анаэробно выращенных диких штаммов изученных видов бактерий подавляется ингибиторами в большей мере, чем нитратредуктазная активность белка аэробно выращенных культур - наблюдается и у хлоратрезистентных мутантов.

Оба примененных ингибитора подавляют нитратредуктазную активность у диких штаммов значительно больше, чем у хлоратрезистентных мутантов (табл. 3).

Таблица 3

Подавление окисления NADH ингибиторами в процентах  
(по сравнению с контролем без ингибиторов)

Организм	Меры ингибирования	
	уретан	барбитурат
<i>Achr. agile</i>	57...82	68...83
<i>Achr. agile</i> мутантный	18...43	1...49
<i>Ps. denitrificans</i>	35...62	12...70
<i>Ps. denitrificans</i> мутантный	17...49	6...15

Определение хлоратредуктазной активности

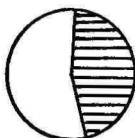
Хлоратредуктазная активность диких штаммов *Achr. agile* и *Ps. denitrificans* количественно намного ниже, чем нитратредуктазная активность тех же объектов (табл. 2, рис. 4 и 5).

У диких штаммов обоих видов хлоратредуктазная активность белка одинаково зависит от аэрирования маточных культур: хлоратредуктазная активность более высокая при анаэробном выращивании маточных культур. Если принимать нитратредуктазную активность соответствующего вида равной 100%, то хлоратредуктазная активность у *Achr. agile* при анаэробном выращивании равняется 78%, при аэробном выращивании - 43%. У *Ps. denitrificans* эти показатели соответственно 78...81% и 56%.

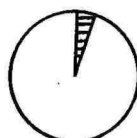
Хлоратредуктазная активность изучена также у хлоратредуктазистентных мутантов. Выяснилось, что мутанты восстанавливают хлорат только в незначительной мере, что доказывает утрату соответствующей окислительно-восстановительной системы. Хлоратредуктазная активность составляет от нитратредуктазной активности у мутантов *Achr. agile* 1,5...6,6%, а у мутантов *Ps. denitrificans* 2,6...5,2% (рис. 4 и 5).



дикий штамм,  
анаэробное  
выращивание

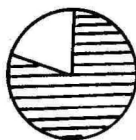


дикий штамм,  
аэробное  
выращивание

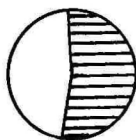


хлоратрезис-  
тентный  
мутант

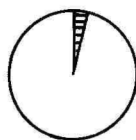
Рисунок 4. Хлоратредуктазная и нитратредуктазная активности бесклеточных экстрактов *Achromobacter agile* (полный круг - нитратредуктазная активность, заштрихованная часть - хлоратредуктазная активность)



дикий штамм,  
анаэробное  
выращивание



дикий штамм,  
аэробное  
выращивание



хлоратрезис-  
тентный  
мутант

Рисунок 5. Хлоратредуктазная и нитратредуктазная активности бесклеточных экстрактов *Pseudomonas denitrificans* (полный круг - нитратредуктазная активность, заштрихованная часть - хлоратредуктазная активность)

Так как изолированные нами мутанты при этом хорошо растут в анаэробии в среде, содержащей хлорат (при наличии нитрата), то их хлоратрезистентность экспериментально доказана. Кроме того, ингибиторы действуют на мутанты в меньшей мере, чем на дикие штаммы, что в свою очередь косвенно указывает на утрату цитохромной нитратредуктазы.

СКОРОСТЬ ОКИСЛЕНИЯ НАДН (НМ/МГ МИН) БЕЗКЛЕТОЧНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ ДЛИХ ШТАММОВ  
И ХИРОТРЕЗИСТЕНТНЫХ МУТАНТОВ *Achromobacter agile* *Pseudomonas denitrificans*  
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ВЫРАЩИВАНИЯ И ЭКСПОЗИЦИИ

Организм	Режим выращивания	Акцепторы и ингибиторы							
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +уретан		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +барбитурат		ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
		нм/мг мин	%	нм/мг мин	%	нм/мг мин	%	нм/мг мин	%
<i>Achr. agile</i>	анаэробный	3,55...7,78	100	1,53...3,37	43	0,89...2,15	25	2,78...6,0	78
<i>Achr. agile</i>	аэробный	10,0...16,0	100	1,8...3,0	18...29	1,68...5,11	17...32	4,3...6,9	43
<i>Achr. agile</i> мутантный	анаэробный	4,33...8,55	100	3,75...5,65	57...66	4,31...8,49	99	0,13...0,22	1,5...5,1
<i>Achr. agile</i> мутантный	аэробный	3,0...3,7	100	2,46...3,0	82	1,53...1,90	51	0,20	5,4...6,6
<i>Ps. denitrificans</i>	анаэробный	10,8...26,0	100	7,17...12,20	48...65	3,5...7,8	30...32	8,75...20,3	78...81
<i>Ps. denitrificans</i>	аэробный	6,12...7,34	100	3,32...4,41	54...60	5,4...6,0	82...88	3,44...4,12	56
<i>Ps. denitrificans</i> мутантный	анаэробный	2,11...3,27	100	1,08...1,67	51	1,99...2,98	91...94	0,11	3,4...5,2
<i>Ps. denitrificans</i> мутантный	аэробный	5,48...8,72	100	4,55...6,90	75...83	5,18...7,4	85...93	0,22...0,23	2,6...4,0

То, что дикие штаммы *Achr. agile* и *Ps. denitrificans* способны использовать в качестве единственного внеклеточного терминального акцептора электронов хлорат и обстоятельство, что ингибиторы подавляют  $\text{NADH}$ :нитратредуктазную активность, указывает на существование цитохромной нитратредуктазы у диких штаммов обоих денитрификаторов.

Как указано в табл. 2, хлоратрезистентные мутанты изученных видов обнаруживают в анаэробно-анаэробии четкую нитратредуктазную активность. Это доказывает существование второй системы нитратвосстановления ("системы Б") уже в диких штаммах этих видов, кроме цитохромной, которая утрачивается в мутагенезе. Нам кажется маловероятным, что "система Б" появляется в результате мутации. Этой причиной объясняется и факт, что у диких штаммов нитратредуктазная активность количественно значительно выше, чем хлоратредуктазная активность (первая выявляется в результате работы двух, вторая - в результате работы лишь одной системы).

Поскольку ингибиторы влияют на нитратредуктазную активность анаэробно выращенных культур *Achr. agile* и *Ps. denitrificans*, в большей мере, чем на активность аэробно выращенных культур, и поскольку хлоратредуктазная активность подавляется аэрацией, постольку можно предполагать, что цитохромная "система А" активнее синтезируется в анаэробных условиях. Активность "системы Б", во всяком случае у *Ps. denitrificans*, наоборот, более высокая в аэробных условиях (табл. 2).

Обильный рост хлоратрезистентных мутантов обоих денитрификаторов в анаэробии доказывает, что не только "система А", но и "система Б" может выполнять энергетическую функцию.

#### Опыты с альтернативными акцепторами электронов

Наши сравнительные исследования влияния режима выращивания на  $\text{NADH}$ :нитратредуктазную и  $\text{NADH}$ -оксидазную (акцептор  $\text{O}_2$ ) активности бесклеточных экстрактов диких штаммов *Achr. agile* и *Ps. denitrificans* показывают, что у обоих денитрификаторов обнаруживается т.н. аддитивный эффект при одновременном присутствии двух основных терминальных акцепторов электронов -  $\text{O}_2$  и  $\text{NO}_3^-$ . При добавлении нитрата в экспозиционную среду при аэробном экспонировании мера окисления  $\text{NADH}$

повышается. Соответствующие данные изложены в табл. 4. Аддитивный эффект наблюдается при этом независимо от режима выращивания маточных культур. Скорость окисления NADH бесклеточными экстрактами *Achr. agile* в экспозиционных средах с двумя акцепторами электронов превышает скорость окисления донора электронов в анаэробнозе (акцептор нитрат на 193%. Скорость окисления NADH бесклеточными экстрактами *Ps. denitrificans* в аэробных условиях экспонирования (в присутствии двух акцепторов электронов) отличается от скорости окисления донора в анаэробнозе менее значительно - на 152%.

Таблица 4

Скорость окисления NADH ( % )  
бесклеточными экстрактами *Achromobacter agile*  
и *Pseudomonas denitrificans* при различных режимах  
выращивания и экспозиции

организм, режим выращивания маточной культуры	экспозиция		
	$\text{NO}_3^-$	$\text{O}_2$	$\text{O}_2 + \text{NO}_3^-$
<i>Achr. agile</i> анаэробный	100	238	293
<i>Achr. agile</i> аэробный	100	134	252
<i>Achr. agile</i> аэробный экспозиция без ЭДТА	100	312	478
<i>Ps. denitrificans</i> анаэробный	100	74	109
<i>Ps. denitrificans</i> аэробный	100	112	139

Надо учитывать, что NADH:нитратредуктазная и NADH - оксидазная активности различным образом зависят от режима экспозиции: например в присутствии ЭДТА в экспозиционной среде NADH:нитратредуктазная активность понижается, NADH -

-оксидазная активность повышается. Адитивность при этом не изменяется (табл. 4).

У дикого штамма *Ps. denitrificans* адитивности в действии хлората и кислорода не обнаружено (табл. 5).

Таблица 5

Скорость окисления  $\text{NADH}$  (%)  
бесклеточными экстрактами *Pseudomonas denitrificans*  
при различных режимах выращивания и экспозиции

Организм, режим выращивания	Экспозиция		
	$\text{ClO}_3^-$	$\text{O}_2$	$\text{ClO}_3^- + \text{O}_2$
<i>Ps. denitrificans</i> анаэробный	100	129	122
<i>Ps. denitrificans</i> аэробный	100	106	100

Определение  $K_m$

Результаты определения  $K_m$  представлены в табл. 6. Величины  $K_m$  зависят от режима выращивания. В диких штаммах и хлоратрезистентных мутантах обоих денитрификаторов величины  $K_m$  более высокие при аэробном выращивании, притом величины  $K_m$  хлоратрезистентных мутантов более высокие, чем у диких штаммов.

**В ы в о д ы**

Экспериментальный материал позволяет сделать следующие выводы:

1. Дикие штаммы *Achromobacter agile* и *Pseudomonas denitrificans* характеризует наличие двух нитратредуктаз ("системы А и Б").

2. Активность нитратредуктазных систем в различной мере подчиняется влиянию кислорода: кислород подавляет актив-

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ОКИСЛЕНИЯ ВАНИ (ММ/МГ. МЕН) БОЖЕКОЧУЩИМИ ВНУТРИКОЖНЫМИ ДУМКАМИ ШТАММОВ  
 И ДУМКАМИ ОТВЕТСТВЕННЫХ КУЛЬТУР Аспергиллусов аспергиллус и Рендзомонас денитрифициans  
 ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ НИТРАТА В АНОДИОННОЙ СРЕДЕ

организм, режим вы- ращивания	Asch. asile		Asch. asile культуры		Pe. denitrificans		Pe. denitrificans культуры	
	анаэроб.	аэроб.	анаэроб.	аэроб.	анаэроб.	аэроб.	анаэроб.	аэроб.
4,02	7,70	23,70	9,1	4,08	5,56	12,50	6,66	12,2
0,50	6,65	20,00	8,67	2,40	4,66	10,13	4,07	7,41
0,375	6,46	18,90	6,25	2,04	4,35	9,09	3,56	5,89
0,25	5,89	17,10	5,26	1,61	3,85	8,32	2,78	5,0
0,125	4,59	13,23	3,58	1,00	2,91	5,27	1,74	3,08
0,0625	3,28	9,05	2,13	0,56	1,92	3,12	0,99	1,73
$K_m$	$8,85 \cdot 10^{-4} M$	$1,05 \cdot 10^{-3} M$	$2,18 \cdot 10^{-3} M$	$4,15 \cdot 10^{-3} M$	$1,24 \cdot 10^{-3} M$	$2,0 \cdot 10^{-3} M$	$3,92 \cdot 10^{-4} M$	$4,18 \cdot 10^{-3} M$

КНО<sub>3</sub> мг/мл в экс-  
позиционной среде

ность "системы А", и даже повышает (*Ps. denitrificans*) активность "системы Б".

3. В бесклеточных экстрактах *Achr. agile* и *Ps. denitrificans* является донором электронов при нитровосстановлении  $\text{NADH}$ , а не  $\text{NADPH}$ .

4. Нитратредуктазная активность *Achr. agile* и *Ps. denitrificans* зависит от режима выращивания. В бесклеточных экстрактах *Achr. agile* более высокая нитратредуктазная активность наблюдается при аэробном выращивании, у *Ps. denitrificans*, наоборот, при анаэробном выращивании.

5. В бесклеточных экстрактах *Achr. agile* и *Ps. denitrificans* обнаружен в совместном влиянии кислорода и нитрата адитивный эффект.

6. Физиологические функции нитратредуктазных систем мало дифференцированы: "система Б" может выполнять кроме ассимиляторной и диссимиляторную функцию.

#### Л и т е р а т у р а

Тохвер В., Лавинг А. Индуцируемость нитратредуктазных систем у некоторых типичных денитрификаторов. В сб.: Экология и физиолого-биохимические основы микробиологического превращения азота. Тарту, 1972. с. 303-309.

Casse, F. Mapping of the gene *chl B* controlling membrane-bound nitrate reductase and formic hydrogenlyase activities in *Escherichia coli* K12. - "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1970, vol. 39, p. 429-436.

Jetschmann, K., Solomonson, L.P., Venneqland, B. Activation of nitrate reductase by oxidation. "Biochim. Biophys. Acta", 1972, vol. 275, p. 276-278.

Lineweaver, H., Burk, D. "J. Amer. Chem. Soc.", 1934, vol. 56, p. 658.

- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, K. Protein measurement with the Folin phenol reagent. - "J. Biol. Chem.", 1951, vol. 193, p. 265.
- MacGregor, C.H., Schnaitman, C.A. Alterations in the cytoplasmic membrane proteins of various chlorate-resistant mutants of *Escherichia coli*. - "J. Bacteriol.", 1971, vol. 108, p. 564-570.
- Murray, E., Samval, B. An immunological enquiry into the identity of assimilatory and dissimilatory nitrate reductase from *Escherichia coli*. - "Canad. J. Microbiol.", 1963, vol. 9, p.6.
- Nason, A., Evans, H. Triphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase in *Neurospora*. - "J. Biol. Chem.", 1953, vol. 202, p. 655.
- Nicholas, D., Stevens, H. Valency changes of molybdenum during the enzymatic reduction of nitrate in *Neurospora*. - "Nature", 1955, vol. 176, p. 1066.
- Pichinoty, F. Contribution a l'étude des nitrate-réductases respiratoires bactériennes. - "C. R. Soc. Biol.", 1964, vol. 158, p. 1122-1125.
- Pichinoty, F. Les nitrate-réductases bactériennes. IV. Régulation de la biosynthèse et de l'activité d l'enzyme B. - "Arch. Mikrobiol.", 1970, vol. 71, p. 116-122.
- Pichinoty, F., Méténier, G. Contribution a l'étude de la nitrate reductase assimilatrice d'une levure. - "Ann. Inst. Pasteur", 1966, vol. 111, p. 282-313.
- Pichinoty, F., Rigano, C., Bigliardi-Rouvier, J., Le Minor, L., Piéchaud, M. Recherche des nitrate-réductases A et B chez les *Enterobacteriaceae*. - "Ann. Inst. Pasteur", 1966, vol. 110, p. 126-130.
- Pichinoty, F., Azoulay, E., Couchoud-Beaumont, P., Le Minor, L., Rigano, C., Bigliardi-Rouvier, J., Piéchaud, M. Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B: résultats. - "Ann. Inst. Pasteur", 1969, vol. 116, p. 27-42.
- Pichinoty, F., Chippaux, M. Recherches sur des mutants bactériens ayant perdu les activités catalytiques liées a la nitrate-réductase A. III. Caractères biochim-

ques. - "Ann. Inst. Pasteur", 1969, vol. 117, p. 145-178.

Pichinoty, F., Puig, J., Chippaux, M., Bigliardi-Roivier, J., Gendre, J. Recherches sur des mutants bactériens ayant perdu les activités catalytiques liées à la nitrate-réductase A. II. Comportement envers le chlorate et le chlorite. - "Ann. Inst. Pasteur", 1969, vol. 116, p. 409-432.

Relimpio, A.M., Aparicio, P.J., Paneque, A., Losada, M. Specific protection against inhibitors of the NAD-nitrate reductase complex from *Chlorella*. - "FEBS Letters", 1971, vol. 17, p. 226-230.

Taniguchi, S., Sato, R., Egami, F. Inorganic nitrogen metabolism. Ed. by W.D. McElroy and B. Glass. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1955.

Taniguchi, S., Ohmachi, K. Particulate nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*. - "J. Biochem.", 1960, vol. 48, p. 50-62.

Van't Riet, J., Stouthamer, A., Planta, R. Regulation of nitrate assimilation and nitrate respiration in *Aerobacter aerogenes*. - "J. Bacteriol.", 1968, vol. 96, p. 1455.

A COMPARATIVE STUDY IN NITRATE REDUCTASE SYSTEMS  
OF ACHROMOBACTER AGILE AND PSEUDOMONAS DE-  
NITRIFICANS

A. LAVING, A. LAASIMER, V. TOHVER

Summary

The dependence of the nitrate reductase activity of wild and chlorate-resistant mutant strains of *Achromobacter agile* and *Pseudomonas denitrificans* on the aeration regime of precultivation and exposition was investigated. The nitrate reductase activity was measured spectrophotometrically in cell-free extracts with NADH as the electron donor. It was ascertained that in the wild strains of both denitrifiers the reduction of nitrates is the result of the activity of two discrete enzyme systems - the flavoproteinic and cytochromic one. At that the systems in investigated species are subjected to the influence of the aeration of enrichment cultures in two opposite directions: aeration in the course of precultivation inhibits the activities of the cytochromic system, while the activities of the flavoproteinic system are favoured by the same means. As regards the sum activity of nitrate reduction, in *A. agile* a higher rate of activity was observed as a result of aerobic, in *Ps. denitrificans* - as a result of anaerobic precultivation.

If the cell-free extracts were exposed in aerobic conditions, an additive effect could be observed in the activities of  $O_2$  and  $NO_3^-$  as terminal electron acceptors.

In mutant strains the flavoproteinic nitrate reductase system functions as an assimilatory as well as a dissimilatory one.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЛЮКОЗЫ ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИЕЙ

*Achromobacter agile*

Я. Симискер, Л. Кухлберг, Э. Рулл

Пути метаболизма глюкозы в денитрифицирующих бактериях определяются как видовой спецификой бактерий, так и физиологическими условиями. Наиболее ярко различия в углеродном обмене различных денитрификаторов проявляются в размерах участия реакций цитратного цикла в окислении глюкозы в анаэробных условиях в присутствии нитрата. У *Micrococcus denitrificans* и *Pseudomonas denitrificans* дегидрогеназы цитратного цикла участвуют в переносе электронов на нитрат, и цитратный цикл у этих видов выполняет энергетическую функцию как при кислородном, так и при нитратном дыхании (Lam, Y., Nicholas, 1969). У некоторых представителей *Enterobacteriaceae* в анаэробных условиях при использовании нитрата в качестве конечного акцептора электронов цитратный цикл не имеет энергетической функции и выполняет лишь конституционную функцию (Forget, Pichinoty, 1964; Gray et al., 1966; Wimpenny, Cole, 1967).

В настоящей статье приведены данные об участии цитратного цикла в конечном окислении глюкозы и в восстановлении нитрата у денитрифицирующей бактерии *Achromobacter agile*.

### М е т о д и к а

Выращивание культур. Культуры бактерий выращивали в модифицированной среде Гильгэя следующего состава: дистиллированная вода - 1000мл,  $K_2HPO_4$  - 1,1 г,  $KH_2PO_4$  - 0,9 г,  $MgSO_4$  - 2 г,  $CaCl_2$  - 0,2 г,  $KNO_3$  - 1 г,  $FeCl_3$  - следы. Аэробные условия создавали путем продувания питательной среды во время инкубации стерильным воздухом. Для создания анаэробных условий кислород вытесняли из питательной среды аргоном и инкубации проводили в атмосфере аргона. В процессе роста бактерий из культуры отбирали пробы. В пробах определяли нитраты колориметрически сульфифеноловой кислотой, глюкоза 2,3-динит-

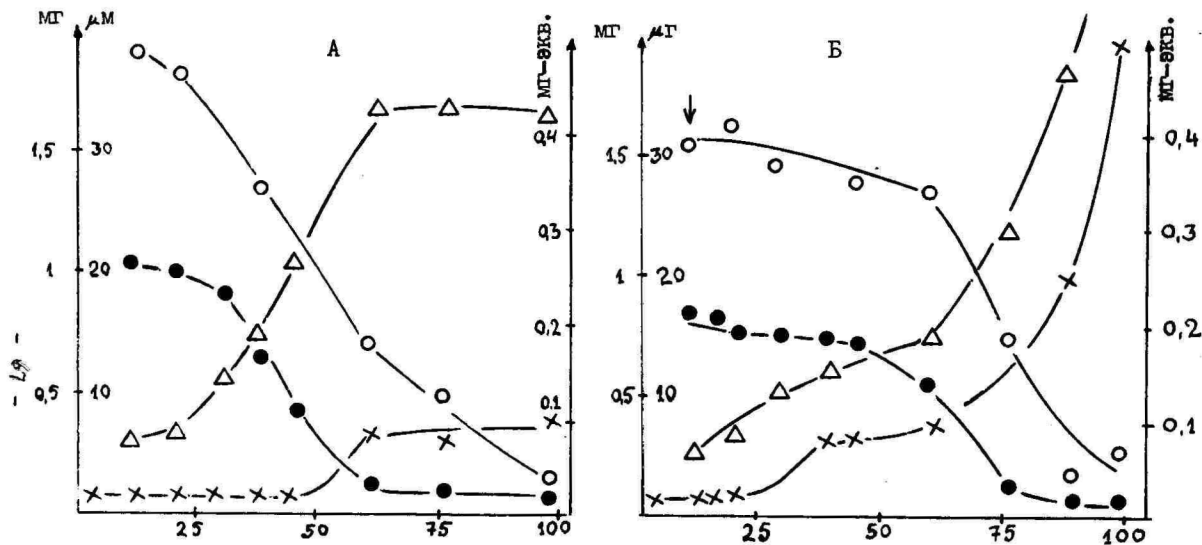


Рис.1. Использование глюкозы и нитрата растущими культурами *Acetobacter agile*.

А - без добавления фторацетата, Б-с добавлением фторацетата ( $5,5 \times 10^{-3} M$ ),  
 ↓ - время добавления фторацетата, о-о - глюкоза (мг/мл), Δ-Δ - белок (μг/мл),  
 ●-● - нитрат (мг/мл), х-х - летучие кислоты (мг-эквиваленты NaOH/мл).

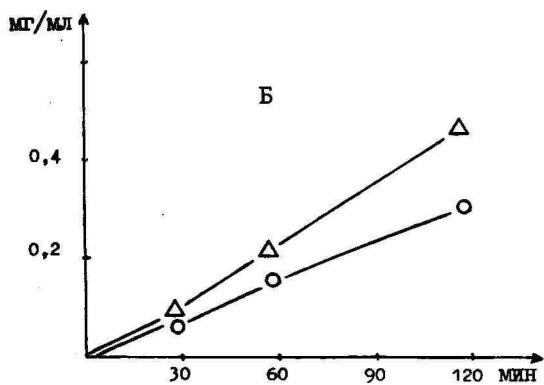
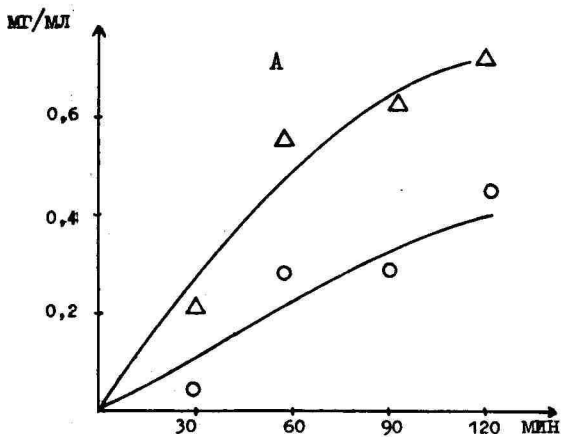


Рис.2. Влияние фторацетата на использование глюкозы (А) и нитрата (Б) суспензиями клеток в анаэробиие.  $\Delta$ - $\Delta$  - без добавления фторацетата,  $\circ$ - $\circ$  - с добавлением фторацетата  $5,5 \times 10^{-3}$  М.

росалициловой кислотой (Fischer, 1964), белок по Лоури (Lowry et al., 1951) и летучие кислоты титрованием 0,01N NaOH после отгонки кислот водяными парами.

Приготовление суспензии клеток. В экспоненциальной фазе развития культуры бактерий охлаждали до  $+3 \dots +5^{\circ}\text{C}$ , и собирали центрифугированием при  $+2 \dots +3^{\circ}\text{C}$ . Клеточную массу промывали в 0,01M фосфатном буфере и суспендировали в среде следующего состава: дистиллированная вода 1000 мл,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1 г,  $\text{MgSO}_4$  - 2 г,  $\text{CaCl}_2$  - 0,2 г. В опытах применяли приблизительно 1%-ные суспензии объемом 90 мл. Опыты проводили в двухгорловых колбах, в которых в зависимости от типа опыта создавали либо анаэробные условия продуванием азота, либо аэробные - продуванием воздуха. Для устранения влияния эндогенных запасных веществ на усвоение глюкозы суспензиями оказалась необходимой предварительная инкубация клеток в среде, не содержащей источника углерода. Глюкозу (в концентрации 1,5 г/л) вводили в среду после 90-минутной предварительной инкубации клеток. Одновременно глюкозой в опытную колбу вводили 1 мл раствора фторацетата натрия. Фторацетат в качестве ингибитора цитратного цикла применяли в концентрации  $5,5 \times 10^{-3}$  M. Через 10 или 20 мин. отбирали из суспензий пробы по 7 мл для определения глюкозы и нитрата. Пробы фиксировали 5-минутным нагреванием на кипящей водяной бане и сохраняли в замороженном виде до анализа.

## Результаты и обсуждения

Усвоение глюкозы и нитрата растущими культурами. Результаты опытов по исследованию усвоения глюкозы и нитрата растущими культурами *Achr. agile* представлены на рисунке 1. Наблюдения динамики расходования глюкозы и нитрата в анаэробных условиях показывают, что в экспоненциальной фазе развития культур динамики использования этих соединений совпадают. При этом в культуре накапливается белок (рис. 1а).

В экспоненциальной фазе развития использование глюкозы не связано с накоплением в культуральной жидкости летучих органических кислот. Так же не было обнаружено в культуральной жидкости накопления промежуточных продуктов цитратного цикла.

По указанному признаку *Achromobacter agile* четко отличается от представителей *Enterobacteriaceae* у которых использование глюкозы в анаэробных условиях в присутствии нитрата сопровождается накоплением в среде ацетата (Verhoeven, 1956) (Forget, Pichinoty, 1964). Причиной накопления ацетата является подавление синтеза энзимов цитратного цикла при переходе *Enterobacteriaceae* из аэробноз в анаэробноз, где конечным акцептором электронов является нитрат (Gray et al., 1966).

В наших опытах некоторое накопление летучих органических кислот наблюдалось в стационарной фазе развития культур, после практически полного расходования нитрата (рис. 1А).

При добавлении фторацетата в растущую культуру в начале экспоненциальной фазы рост культуры подавляется примерно на 20 часов. В то же время введение в культуру фторацетата вызывает накопление в среде летучих органических кислот (рис. 1Б).

Приведенные здесь результаты показывают, что в примененных условиях развития использование глюкозы культурами *Achromobacter agile* происходит без накопления продуктов неполного окисления глюкозы. Последние образуются в заметном количестве лишь при торможении цитратного цикла специфическим ингибитором, или же в отсутствии нитрата в качестве конечного акцептора электронов (безнитратные условия создавались, как видно по рис. 1, в поздние периоды развития).

Влияние фторацетата на использование глюкозы и нитрата суспензиями клеток. Для выяснения участия цитратного цикла в окислении глюкозы и в восстановлении нитрата изучали влияние фторацетата на скорость использования указанных веществ суспензиями клеток *Achr. agile* в анаэробных условиях. Результаты соответствующих опытов представлены на рисунке 2. Видно, что фторацетат оказывал ингибирующее воздействие на использование как глюкозы, так и нитрата. Эти наблюдения, как и результаты, полученные при исследовании фторацетатного ингибирования у растущих культур, подтверждают участие цитратного цикла в окислении глюкозы и в восстановлении нитрата у *Achr. agile*. В то же время, в присутствии фторацетата продолжается некоторое использование глюкозы и нитрата суспензиями *Achr. agile*. Восстановление нитрата за счет окисления глюкозы в присутствии фторацетата свидетельствует о

том, что процесс восстановления нитрата у *Achr. agile* может связываться не только с реакциями цитратного цикла, но и с другими возможными путями превращения глюкозы, неингибируемые фторацетатом. Нитратредуктазные системы *Achr. agile* являются NAD-специфическими (Лавинг и др., стр. 51 в наст.сб.). Вопрос о том, какие метаболические реакции превращения глюкозы связаны с регенерацией восстановленного NAD, требуют дополнительного исследования.

Заметное фторацетатное ингибирование использования глюкозы обнаруживали и в аэробном варианте опыта (рис. 3). Примерно одинаковое воздействие фторацетата на использование глюкозы в анаэробных и аэробных условиях показывает, что переключение клеток с кислородного дыхания на нитратное не влияет существенно на функционирование цитратного цикла.

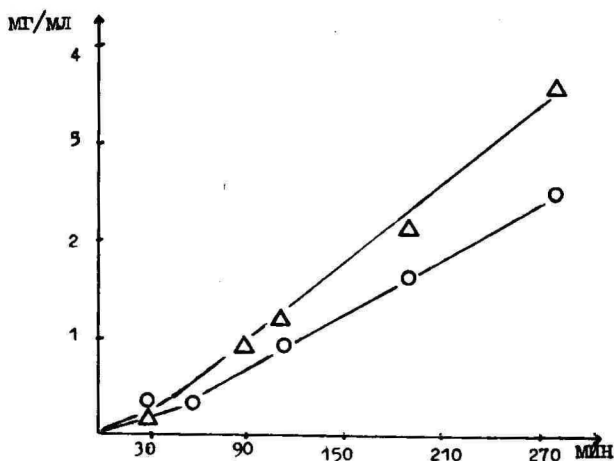


Рис.3. Влияние фторацетата на использование глюкозы суспензиями клеток в аэробно-анаэробном режиме.  
 Δ-Δ- без добавления фторацетата, ○-○ - с добавлением фторацетата  $5,5 \times 10^{-3}$  М.

Полученные нами результаты показывают, что по характеру использования глюкозы в анаэробных условиях в присутствии нитрата *Achr. agile* резко отличается от представителей *Enterobacteriaceae* и приближается к типичным денитрификаторам типа *Pseudomonas denitrificans*.

## Выводы

1. В анаэробных условиях в присутствии нитрата использование глюкозы растущими культурами и суспензиями клеток *Achromobacter agile* происходит без заметного образования продуктов неполного окисления.

2. В процессе конечного окисления глюкозы и в восстановлении нитратов *Achr. agile* участвуют реакции цитратного цикла.

## Литература

- Fischer, K. Purification de l'invertase de levure. *Helv. Chim. Acta*, 1964, vol. 34. p. 1123.
- Forget, P., Pichinoty, F. Influence de la respiration anaérobie du nitrate et du fumarate sur le métabolisme fermentaire d'*Aerobacter aerogenes*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, vol. 82. No. 2. p. 441-444.
- Gray, C.T., Wimpenny, J.W.T., Hughes, D.E.a., Romosson, M. Regulation of Metabolism in Facultative Bacteria. 1. Structural and Functional Changes in *Escherichia coli* Associated with Shifts Between the Aerobic and Anaerobic states. - *Biochim. Biophys. Acta*. 1966, vol.117, No 1, pp. 22-32.
- Lam, Y. a. Nicholas, D.J.D. Aerobic and Anaerobic Respiration in *Micrococcus denitrificans*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, vol. 172, No 3, pp. 450-461.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Randall, K. Protein measurement with the Polinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, vol. 193. p. 265.
- Verhoeven, W. Some Remarks on Nitrate and Nitrite Metabolism in Microorganisms. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism. Function of Metalloflavoproteins.* Baltimore, Johns Hopkins, Press 1956, pp. 61-108.
- Wimpenny, J.W.T. a. Cole, J.A. The Regulation of Metabolism in Facultative Bacteria. III. The Effect of Nitrate. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, vol. 148, No 1, pp. 233-242.

UPON THE UTILIZATION OF GLUCOSE  
AND NITRATE BY ACHROMOBACTER AGILE

J. SIMISKER, L. KUHLEBERG, E. RULL

Summary

The utilization of glucose and nitrate in growing cultures and cell suspensions of *Achromobacter agile* was investigated. It could be ascertained that in anaerobiosis in the presence of nitrate the utilization of glucose proceeds without accumulation of the products of incomplete oxidation. Fluoroacetate in the concentration of  $5.5 \times 10^{-3}$  M inhibits the utilization of glucose and of nitrate both in growing cultures and in cell suspensions. A conclusion is drawn that the enzymes of TCA participate in the oxidation of glucose as well as in the reduction of nitrate.

**О КРУГЛОГОДИЧНОЙ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ДИНАМИКЕ  
ПОЧВЕННЫХ САПРОСИТНЫХ БАКТЕРИЙ,  
В ЧАСТНОСТИ ДЕНИТРИФИКАТОРОВ**

**В. Тохвер**

Как известно, количественные анализы различных групп почвенных микроорганизмов обычно проводят за вегетационные периоды в поясе умеренного климата примерно с апреля по октябрь. Ограничение периода анализов обусловлено не только зимними неудобствами взятия почвенных проб, но соображениями по сути дела. Жизнедеятельность почвенных микроорганизмов теснейшим образом связана с вегетацией растений. В весенне-летне-осенний период обычно для жизнедеятельности микроорганизмов имеются приемлемые температурные и водные условия. Кроме того, многочисленные исследования показывают, что максимальные титры почвенных микроорганизмов в зоне умеренного климата встречаются или весной, или осенью. Биохимические исследования почв же демонстрируют, что соответствующие активности (выделение  $\text{CO}_2$ , поглощение  $\text{O}_2$ , денитрификация и др.) в зимнее время в промерзших почвах находятся в минимуме или совсем отсутствуют. Эта точка зрения проникла и в новейшие учебники по почвоведению ("Почвоведение", 1972). Считается общепринятым также положение, что в зимнее время жизнедеятельность микроорганизмов в почве затухает.

В противоположность вышеприведенным взглядам за последние 10...15 лет группой эстонских микробиологов, возглавляемой П. Рахно, опубликованы работы, в которых авторы утверждают, что в промерзших почвах, т.е. при  $t^{\circ}$  ниже точки затвердения воды, происходит активное размножение микробов, в том числе и бактерий. Взгляды данной группы исследователей суммированы в двух монографиях (Рахно, 1964; Рахно и др., 1971). По существу дела их положения основаны на получении в зимнее время, по сравнению с летне-осенним периодом, несколько повышенных данных при изучении количественной динамики почвенных микробов. Сторонники этой точки зрения упрека-

ют авторов, которые не проводят "круглогодичных" анализов за неполную работу, считая зимние анализы по обычной, выработанной для летнего периода методике обязательными в работе почвенных микробиологов. Проблема поэтому приобретает принципиальное значение. Для проверки заключений П. Рахно и его сотрудников нами в 1970...1973 гг. предпринята попытка выяснить сущность получения данных, якобы свидетельствующих об активном размножении бактерий в промерзших почвах. В качестве объекта изучения мы выбрали сапрофитные бактерии, как наиболее многочисленные почвенные микроорганизмы, обращение с которыми более удобно, чем с более специализированными малочисленными микробами. В лабораторных опытах мы применяли культуру *Pseudomonas denitrificans*, т.е. сапрофит, который обладает значительными денитрифицирующими способностями.

Результаты исследований по размножению бактерий в промерзшей почве представляются в настоящей статье.

#### М е т о д и к а

Круглогодичная количественная динамика почвенных сапрофитов изучалась нами в 1970...1971 гг. в Ильматсалу, Тартуского района, ЭССР, на территории Тартуского образцового опытного совхоза. Для наблюдений брали целинную почву, освоенную в 1965...1968 гг. В 1970 г. подопытный участок находился под культурой ячменя. Объект-почва принадлежит к дерново-подзолистому типу, по механическому составу - супесчаная. Почвенные пробы брали из одного и того же места саперной лопатой на глубине гумусового горизонта (1...15 см.). В январе 1971 г., когда почвенная температура в нижней части данного горизонта снижалась до  $-4, 9^{\circ} \text{C}$ , при взятии проб пользовались маленьким полевым топором. Во всех пробах определяли содержание воды и объемный вес почвы. Подготовку разведений для микробиологических анализов проводили по стандартной методике. Взвешивание проб промерзшей почвы проводили в мерзлом состоянии, взбалтывание - после растаяния пробы в колбочке первого разведения при  $+1...+2^{\circ} \text{C}$ . Анализы проводили на МПА в чашках Петри. При всех анализах использовали четвертое разведение, варьируя количество инокулята от 0,05 до 0,20 мл.

Результаты микробиологических анализов выражали на единицу массы (на 1 г сухой почвы), как это обычно делают, и на единицу объема сырой почвы (на 1 см<sup>3</sup> почвы). Перерасчет проводился по формуле

$$N_v = N_M \cdot 0,01 \cdot p \cdot m,$$

где  $N_v$  - число бактерий в 1 см<sup>3</sup> сырой почвы;  
 $N_M$  - число бактерий на 1 г сухой почвы;  
 $P$  - содержание сухого вещества в %-ах;  
 $m$  - объемный вес почвы в г/см<sup>3</sup>.

Вместе с анализами на чашках Петри производили микроскопический счет бактериальных клеток, используя 1-ое разведение. Каплю разведения наносили на пластинку Горяева, где и производили фиксацию материала абсолютным этанолом и окрашивание эритрозин (эритрозин позволяет дифференцировать белковые тела, окрашивающиеся этой окраской, и минеральные частички почвы, не окрашивающиеся этой окраской). По камерам на пластинке подсчитывали количество цельных клеток в 0,04-мм<sup>3</sup> объеме.

Кроме вышеописанных исследований, в 1973 г. было изучено воздействие низких температур на размножение бактерий в лабораторных условиях на примере *Pseudomonas denitrificans* 0,3-кг образца почвы (супесчаная, среднесуглинистая, тяжело-суглинистая) обогащали 10 мл суспензии указанного микроба (центрифугат культуры, выращенной в жидкой среде Гильтэя, полученный при 4800\*g в течение 15 минут). После тщательного смешивания почвы с суспензией клеток псевдомонада образцы помещали в холодильник при температуре -6° С, где они выдерживались при влажности 44% в течение 4 недель. Контрольные же образцы хранили в это время при комнатной температуре 20 ± ± 1,5° С. До и после выдерживания производили высевы в количестве 0,5 мл седьмого разведения, при глубинном посеве, на МПА в чашки Петри. После 72-часовой инкубации при 27,5° С подсчитывали выросшие колонии и установили их принадлежность.

Таблица I

Динамика сапрофитных бактерий в 1970/71 гг.

Дерново-подзолистая супесчаная  
целинная почва, Ильматсалу, ЭССР

Год, месяц	Темпе- ратура почвы, °C	Содержа- ние су- хого вещ-ва, %	Объем- ный вес г/см <sup>3</sup>	Численность са- профитных бак- терий*, млн.		Число ин- тактных клеток в 0,04 мм <sup>3</sup> 1-го разв. (прямой счет)
				на 1 г сухой почвы	в 1 см <sup>3</sup> почвы	
1970						
IУ	1,8	71,0	1,37	0,82	0,79	2...5
У	7,7	78,9	1,41	2,3	2,6	6...9
УI	13,0	83,7	1,43	8,4	10,1	24...30
УII	15,1	78,2	1,40	4,1	4,5	15...21
УIII	16,8	79,2	1,41	10,8	12,0	53...71
IX	13,0	75,6	1,38	8,8	9,2	36...51
XI	1,0	68,3	1,35	5,2	4,8	13...20
XII	-0,3	60,2	1,31	6,0	4,7	10...18
1971						
I	-4,9	53,4	1,28	7,6	5,2	1...5
II	-2,5	54,8	1,28	1,4	0,98	±0

\*

Определение по традиционной мето-  
дике высевами на МПА в чашки Петри

Таблица 2

Влияние промерзания почвы на сапрофитные бактерии

0,3-кг образца дерново-подзолистых почв, обогащенных суспензией

Влажность почвы за время экспозиции 44%.

П о ч в а	Среднее число колоний при высеве 0,5 мл 7-го разведения на МПА			Среднее число клеток в 0,0025 мм <sup>3</sup> первого разв.		
	в нача- ле опы- та	после 4-нед. выдерживания при		в нача- ле опы- та	после 4-нед. выдерживания при	
		+20°C	-6°C		+20°C	-6°C
Супесчаная	112	83	18	550	510	
Средне-суглинистая	134	91	50	646	474	еди- нич- ные
Тяжело-суглинистая	122	100	92	587	410	

## Результаты исследований

В табл. I приведены результаты по количественному исследованию динамики сапрофитных бактерий, а также интактных клеток бактерий в дерново-подзолистой суглинистой почве Иль-матсалу в природных условиях за 1970/71 гг. Видно, что при использовании традиционного способа выражения численности бактерий на 1 г сухой почвы в декабре-январе изученного периода, при замерзании почвы, действительно обнаруживается некоторый подъем в соответствующих значениях, но такой эффект практически исчезает при пересчете полученных данных

на  $1 \text{ см}^3$  почвы. При таком пересчете, кроме того, более ярко выступает июньский и августовские максимумы.

Сопоставляя данные, полученные по посевам на МПА, с данными подсчета интактных клеток в почвенном разведении, выявляется противоречие: в промерзшей за зиму почве целые клетки просто исчезают, но посевам на питательные среды продолжают показывать довольно высокие значения численности сапрофитных бактерий. Для выяснения этого вопроса в 1973 г. были организованы специальные лабораторные опыты, техника которых описана в методической части настоящего сообщения. Результаты изложены в табл. 2. Эти данные опять-таки демонстрируют исчезновение интактных клеток при промерзании почвы. Из-за обогащенности среды микробными клетками легче наблюдать происходящее, чем в природной почве. Обнаружено, что вместе с исчезновением интактных клеток в почвенном растворе появляется большое количество различных карликовых форм, по размерам меньших, чем интактные клетки. Эти формы легко окрасиваются эритрозином. Многие из этих карликовых форм напоминают большие клеточные фрагменты. Если это так, то возможно, что это результат дезинтеграции клеток под влиянием ледяных кристаллов. Учитывая, что при посевах на питательные среды колонии все же продолжают появляться, можно предположить, что часть возникших карликовых форм сохраняет способность к регенерации в целые клетки, которые и дают начало колониям.

### Обсуждение

Полученные данные показывают, что традиционный способ выражения численности микробов на  $1 \text{ г}$  сухого вещества почвы не работает при сравнении даже образцов одной и той же почвы с существенно (более, чем на 10...20%) различной влажностью и, в зависимости от этого, с различным объемным весом. При таких условиях, тем более при изучении различных по типу или механическому составу почв, традиционный метод не позволяет получать сравниваемые данные. Дело в том, что микробы населяют прямо не массы, а поверхности различных почвенных частиц и почвенный раствор. Для них относительно безразличен удельный вес материала почвенных частиц, который, однако, существенно определяет объем единицы сухой мас-

сы почвы, т.е. определяет суммарную площадь адсорбирующих поверхностей и объем почвенного раствора. Последние даже в пределах одной почвы являются пропорциональными количеству сухой массы только при условии, что влажность сравниваемых образцов более или менее одинакова. Наоборот, в определенном объеме более влажной почвы меньше сухой массы, чем в более сухой почве. Зимняя же промерзшая почва как раз является переувлажненной, со значительно меньшим объемным весом, чем летняя, более сухая почва. Именно поэтому нельзя применять методику, разработанную для работы с почвами весенне-летне-осеннего периода, для зимних анализов, если хотят получать сравниваемые данные. При количественных анализах исследователи имеют дело с сырой почвой и лишь потом пересчитывают цифровые данные на 1 г сухой почвы. Поэтому искажения являются неизбежными.

В литературе убедительно показано, что пересчет непосредственных данных количественных анализов по разведениям приводит к дополнительным искажениям результатов (Абатуров и др., 1970). Ясно, что для получения сравниваемых данных следует в ходе исследований применять при высевах на твердые среды одну и ту же степень разведения, варьируя в случае необходимости лишь количество инокулята. Не всегда это требование принимается в учет.

При оценке зимних аналитических данных нельзя забывать о значении десорбции клеток под влиянием низких температур, как это обстоятельно изучено Д.Г. Звягинцевым (1970, 1973).

Главной же причиной получения П. Рахно и др. данных, якобы свидетельствующих об активном размножении бактерий в промерзших почвах, по нашему мнению, является фрагментация клеток бактерий под влиянием льда и последующая регенерация определенной части фрагментов.

Если исследователь встречается с неожиданными парадоксальными результатами в своей работе, то их нужно подвергать многостороннему критическому анализу. П. Рахно и его сотрудники этого не сделали. Биохимия изучаемых явлений ими вообще не затронута. Однако известно, что многие процессы жизнедеятельности микробов и других организмов невозможны без участия жидкой воды. Это процессы, основывающиеся на деятельности таких энзимов, как гидролазы, некоторые оксидоредуктазы, многие трансферазы, лиазы и — что особенно важно — многие синтетазы. Катализуемые этими энзимами реакции нуж-

даются в воде или в качестве растворителя и дисперсионной среды, или же в качестве прямого участника реакций. Без жидкой воды не быть ни питанию микробов, ни белковой синтезу. Как же в таких условиях "активно размножаться"? Ясно, что при получении аналитических данных, будто бы доказывающих размножение микробов в среде без свободной воды, исследователь обязан относиться к своим результатам с сомнением. По нашему мнению, П. Рахно со своими сотрудниками в этом вопросе работает на артефактах. Его выводы следует признать ошибочными.

Нельзя не отметить и тот факт, что при сопоставлении данных П. Рахно оперирует средними значениями, полученными для очень широких диапазонов времени, характеризующихся широким варьированием природных условий и, стало быть, активности микроорганизмов. П. Рахно различает лишь "осень", "зиму", "весну" и "лето", причем его времена года не совпадают ни с астрономическими, ни с биолого-астрономическими "сезонами". Все времена года для П. Рахно всегда трехмесячные, всегда охватывают одни и те же месяцы целиком, от первого до последнего календарного дня, независимо от конкретных условий года. С такой негибкостью связано и то, что для характеристики "зимней" численности микробов в учет взяты как данные, полученные при  $+8^{\circ}\text{C}$ , так и данные, полученные при  $-30^{\circ}\text{C}$  (Рахно, 1964, с. 88). Ясно, что репрезентативность "средних данных" П. Рахно и сотрудников о численности микробов по отдельным "сезонам" очень низка. Эти данные не могут быть взяты за основу для заключений о возможности активного размножения бактерий в промерзшей почве.

## В ы в о д ы

1. При замерзании почвы численность интактных бактериальных клеток в ней резко снижается, доходя в отдельных случаях до нуля. Это результат дезинтеграции (фрагментации) клеток в замерзшей почве.

2. Часть клеточных фрагментов, возникших в промерзшей почве, сохраняет способность к регенерации в цельные клетки. При высеве определенных количеств почвенных разведений на питательные среды, с последующей инкубацией при благоприятных условиях, это обстоятельство может стать причиной полу-

чения кажущегося эффекта активного размножения бактерий в промерзшей почве.

3. Традиционные методы количественного анализа почвенных бактерий непригодны для изучения микробиологии промерзших почв.

4. Выводы некоторых авторов о возможном активном размножении бактерий в промерзших почвах по существу основываются на артефактах.

#### Л и т е р а т у р а

Абатуров Ю.Т., Кашкина Г.Б. Влияние разведения при количественном учете микроорганизмов почв. - В сб.: Микроорганизмы в сельском хозяйстве. М., Изд-во МГУ, 1970, с. 80-87.

Звягинцев Д.Г. Оценка количества микроорганизмов в почвах разных типов. В сб.: Микроорганизмы в сельском хозяйстве. М., Изд-во МГУ, 1970, с. 74-79.

Звягинцев Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. М., Изд-во МГУ, 1973, 174 с. с ил.

Почвоведение. Под ред. А.С. Фатянова и С.Н. Тайчинова. М., "Колос", 1972, 480 с. с ил.

Рахно П.Х. Сезонная динамика почвенных бактерий и факторы, обуславливающие ее. Таллин, АН ЭССР, 1964, 236 с. с ил.

Рахно П., Аксель М., Сирп Л., Рийс Х. Динамика численности почвенных микроорганизмов и соединений азота в почве. Таллин, "Валтус", 1971, 208 с. с ил.

UPON THE YEAR ROUND QUANTITATIVE DYNAMICS OF SOIL  
SAPROPHYTIC BACTERIA, ESPECIALLY OF THE DENIT-  
RIFIERS

V. TOHVER

Summary

The year-round quantitative dynamics of the soil saprophytic bacteria, especially of the denitrifiers, was investigated in natural conditions in freshly raised virgin soil and in laboratory conditions, using a culture of *Pseudomonas denitrificans*. It was ascertained that in the course of the freezing of soil the numbers of intact bacteria cells dropped abruptly. At the same time many small involution forms (possibly subcellular fragments) appear. A certain part of them are capable of regeneration into intact cells. This may give an impression of active multiplication of the cells, if judged by the results of the inoculation of nutritive media with the suspensions of frozen soils. The inadequacy of traditional methods of the estimation of the numbers of bacteria in frozen soils is shown.

## ИЗМЕНЕНИЕ ДЕНИТРИФИКАЦИОННЫХ СПОСОБНОСТЕЙ ПОЧВ ПРИ ИХ ОКУЛЬТУРИВАНИИ

В. Тохвер

В общем виде в литературе принято положение о том, что окультуривание различных типов почв неизбежно ведет к повышению их биогенности — к увеличению общей численности микроорганизмов, к "улучшению" видового состава микрофлоры и к активации "полезных" микробиологических процессов в почве (Аристовская, 1965). Если не обратить внимание на биологически более чем сомнительные оценки "улучшение" и "полезные", можно сказать, что такой взгляд придерживается многими авторами без ограничений (Soumare, Blondeau, 1972, Самцевич, 1972, Саложников, 1973), но имеются и указания, показывающие, что длительное применение минеральных удобрений на окультуренных почвах причиняет снижение активности микробиологической деятельности (Мишустин, Прокошев, 1949, Авдонин и др., 1960, Беляев, 1960, Voisin, 1964).

Особенно существенным и несомненным является повышение биологической активности торфяно-болотных почв в результате их окультуривания (Лупинович и др., 1964, Вавуло, 1968). В частности, при их мелиорации увеличивается численность денитрифицирующих бактерий (Tohver, 1973). По отношению к другим типам почв данных об изменении денитрификационной способности в ходе их освоения мало. Х. де Баржак (H. de Barjac) в 1954 г. высказала мнение, что денитрификация протекает в почвах тем активнее, чем выше степень окультуренности почвы. Насчет главных разновидностей почв Северной Эстонии такая же зависимость указана В. Ластингом с соавторами (V. Lasting jt., 1966). Они связывают этот факт с обстоятельством, что денитрификаторы особенно обильно представлены в ризосфере культурных растений. Указывается также на высокую степень корреляции между численностями денитрификаторов и нитрификаторов и делается вывод, что для денитрификаторов условия питания имеют большее значение, нежели водно-воздушный режим почвы.

Вышеотмеченная зависимость между окультуренностью почвы и численностью денитрификаторов, по-видимому, все-таки не обязательна при любых условиях. Так, например, М.Н. Зайед с сотрудниками не мог установить увеличения численности денитрификаторов при окультуривании южной песчаной почвы (Zayed et al., 1973).

Для более близкого ознакомления со значением окультуривания "диких" лесных почв для развития и жизнедеятельности денитрификаторов нами проведены соответствующие исследования на примере некоторых типов Эстонских почв. Время исследований - 1970...1973 гг.

Денитрифицирующие бактерии являются частью общей сапрофитной микрофлоры. Исходя из этого положения, изложенного на стр. 12 настоящего сборника, мы считали обязательным изучение количественных аспектов развития денитрификаторов на фоне соответствующих показателей "общего числа" сапрофитных бактерий.

#### Объекты исследований и методика

Изучали почвы следующих местностей и биотопов:

1. Тартуский район, ЭССР, Ильматсалу, территории Тартуского образцово-опытного совхоза. Биотопы:

- а) смешанный лес возрастом выше 100 лет (ель, береза, ольха, ива, рябина, орешина);
- б) целина площадью 50 га, возделанная из предыдущего биотопа в 1965...1968 гг.;
- в) соседнее с предыдущими старопашотное поле площадью 20 га (в сельскохозяйственном использовании находится с 1830 г.).

Почвы всех указанных биотопов принадлежат к типу дерново-подзолистых почв. По механическому составу являются средне-супесчаными. Некоторые остальные свойства этих почв указаны в таблице I. В 1971 г. получено 41 ц/га ячменя с целины и 32 ц/га со старопашотного поля.

2. Пярнуский район, ЭССР, Михкли, стационар Эстонской сельскохозяйственной академии (ЭСХА). Биотопы:

- а) 200-летний дубовник. Однофронтный лес с абсолютным доминированием дуба (среди дубов встречаются лишь единичные березы). В подлеске в большом перевесе орешина. Фронт трав хорошо развит (покрываемость до 95%);

- б) соседнее с лесом поле, находящееся в сельскохозяйственном использовании свыше 50 лет, площадью около 25 га.

По определению Л. Рейнтама (1970, а, б), михелиские почвы принадлежат к типу буроземных почв. Им свойственна слабокислая или нейтральная реакция, средняя или высокая степень насыщенности. По механическому составу изученные почвы являются среднесуглинистыми. Они отличаются как высокой водоёмкостью, так и хорошей водопроницаемостью. Потенциально эти почвы относятся к ряду наилучших почв Эстонии. Некоторые агрохимические показатели изложены в табл. I.

Таблица I

Некоторые свойства изученных почв

Июнь, 1970, гумусовый горизонт

Почва	Сост. окультур.	pH KCl	Общий гумус, г/100г	N-общ.	N-NO <sub>3</sub> мг/100 г	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Дерн.-подзол., супесчаная	Смеш. лес, неокульт.	6,26	4,19	334	0,19	0,32
	Целина, 6-ой год	6,57	2,64	221	0,16	сл.
	Старопахотное поле	6,67	2,11	105	0,23	0,17
Дерн.-подзол., песчаная	Сосновый лес, неокульт.	3,70	3,33	150	0,13	2,42
	Старопахотное поле	4,51	1,99	110	0,11	2,42
Буроземная, суглинистая	Дубовник, неокульт.	6,50	4,05	220	0,23	0,78
	Старопахотное поле	6,82	2,84	150	0,14	0,40

3. Пылваский район, ЭССР, Моосте-Мэкси. Стационар ЭСХА.

Изученные биотопы:

- а) 75-летний сосновый лес кисличного (*Oxalis acetosella*) типа. В верхнем фронте абсолютным домини-

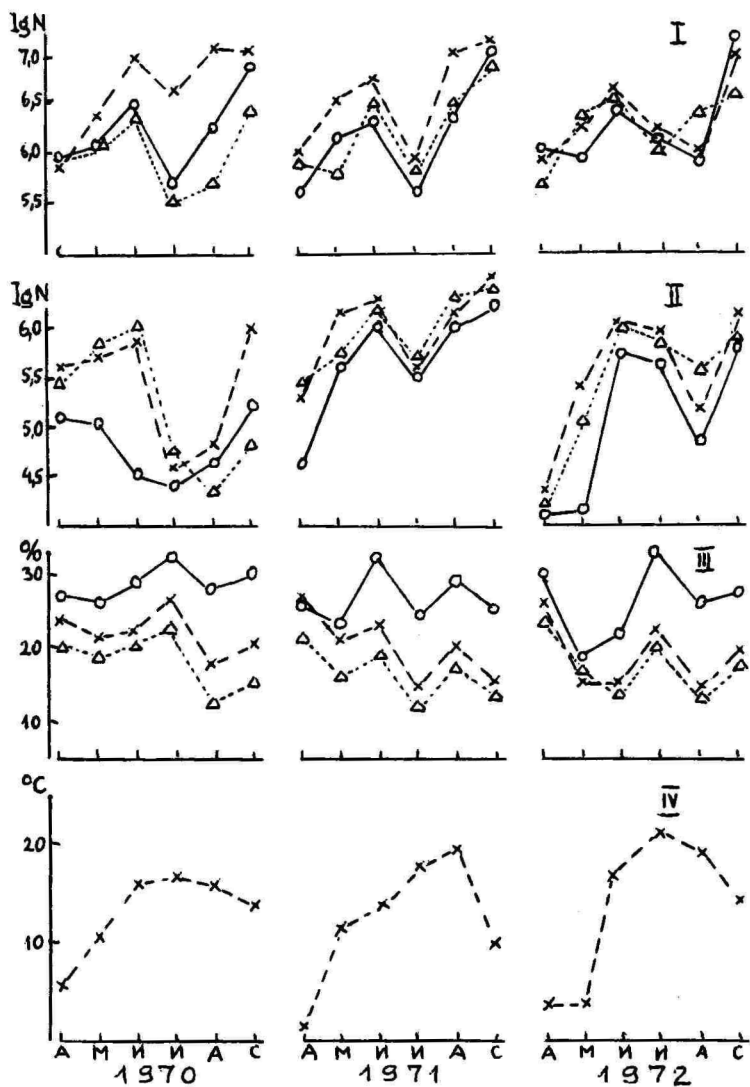


Рис. 2. Влияние окультуривания на динамику сапрофитных и денитрифицирующих бактерий в дерново-подзолистой почве. I - сапрофитные бактерии, II - денитрифицирующие бактерии, III - влажность почв, IV - температура почвы. ●●●● - исходная лесная почва, ×××× - целинная почва, ▲▲▲▲ - старопашотная почва

нантом является сосна. Под соснами имеется второй фронт, состоящий главным образом из ели. Поверхность земли на 40...90% покрыта мхами.

- б) Старопахотное поле, расположенное недалеко от предыдущего биотипа.

По существующей классификации Моосте-Мэксиские почвы принадлежат к средне или сильно оподзоленным дерново-подзолистым почвам. Им свойственна кислая реакция по всему профилю и ненасыщенность. Свойственно также низкое содержание гумуса и азота (табл. I). По механическому составу эти почвы песчаные или слегка супесчаные.

Почвенные пробы брали за время вегетации (с апреля до октября) 6 раз, за исключением Моосте-Мэксиских почв, где пробы брали по 4 раза в вегетационный период. Их брали предпочтительно во время второй декады месяца буром в виде средних проб по гумусовому горизонту  $A_1$  (в зависимости от профиля почвы на глубине I(2)...10-20 см). Почвенные пробы готовили к микробиологическим анализам по стандартной методике ("Методы...", 1966).

Общую численность сапрофитов определяли на МПА в чашках Петри. В литературе доказано, что варьирование разведения при сравнительных исследованиях недопустимо, так как пересчет по разведениям неизбежно сопровождается значительной ошибочностью (20...30%) для каждой степени разведения (Абатуров и др., 1970). Поэтому, мы во всех анализах использовали 4-ое разведение, варьируя, в зависимости от предполагаемого результата, в случае надобности лишь объем инокулята в пределах 0,01...0,20 мл при поверхностных и в пределах 0,5...2,0 мл при глубинных посевах на агаризованную твердую среду.

Численность денитрификаторов определяли на среде Гидтёя по методу предельных разведений, 5 параллельных пробирок для каждого разведения.

Все результаты определения численности микроорганизмов выражали на  $1 \text{ см}^3$  сырой почвы (а не на  $1 \text{ г}$  сухой почвы) в связи с тем, что влажность изучаемых почв за время вегетации довольно сильно варьирует (см. рис. 2 и 3). Редуцирование цифровых данных на единицу сухой массы в таком случае не позволяет получать сравниваемые данные (см. с. 79 настоящего сборника).

В целях более удобного сравнения активностей изучаемых бактерий выведены т.н. суммарные показатели активности — суммы результатов отдельных анализов за вегетационный период. Такие суммарные показатели хорошо характеризуют общую микробиологическую активность по тем или иным микробным группам. Основа такого приема выражения аналитических данных состоит по сути дела в том, что в субстратах обитания также суммируются результаты жизнедеятельности микроорганизмов, например, продукты биохимических процессов, вызываемых микробами. Их возможное использование другими микробами принципиально не изменяет дела. Условием получения суммарных показателей активности является как одинаковое число анализов, так и одновременное проведение их.

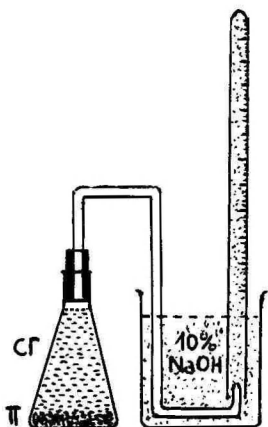


Рис. I

Схема экспресс-установки для газометрического определения активности почвенной денитрификации.

сг — среда Гильтэя, п — почва в количестве 4 г по сухому весу.

В 1972...1973 гг. мы определяли потенциальную активность денитрификации изучаемых почв газометрически

в экспресс-установках, схема которых изображена на рис. I. Соответствующие опыты проводили в анаэробных условиях, выделенные денитрификаторами газы промывали пропусканием маленьких пузырьков через 20...30 см столб 10%-го NaOH. Анализ газовых проб показал, что они на 96...99% состоят из  $N_2$ , в остальных же, главным образом из  $N_2O$ . Это позволяет принимать полученные количественные данные продукции газа за показатели активности денитрификации.

В 100-мл колбы наших экспресс-установок, главное преимущество которых состоит в удобности и легкости обращения

с материалом и сосудами, а также в отсутствии надобности в повторных трудоемких химических анализах, помещали по 4 г почвы по сухому весу и 95 мл среды Гильтэя, подогретой до температуры инкубации (27,5° С). Начало выделения газов наблюдалось обычно после 15...18-часового лага. Их аккумуляцию регистрировали по шкале приемника. С целью учета условий (температура, давление воздуха, давление растворителя и др.), а также с целью учета неравноностей стеклянных частей установок применяли поправочные коэффициенты К, значение которых для каждой установки вычисляли по формуле:

$$K = \frac{(V - V_1) \frac{273}{T} + V_2 \times \alpha}{P_0},$$

где  $V$  обозначает общий объем газа в собирателе, в колбе над средой, в трубопроводах и в растворенном виде в жидкостях,  $V_1$  - объем среды,  $T$  - абсолютную температуру,  $V_2$  - объем жидкости в собирателе, по существу действующем как манометр,  $\alpha$  - коэффициент, зависящий от концентрации  $\text{NaOH}$  (для 10-% раствора - 1,076).  $P_0$  - давление воздуха.

В данных опытах учитывали показатели только в пределах линейной зависимости процесса от времени, т.е. в пределах экспоненциальной фазы развития популяции. Результаты выражали в микролитрах газа на  $10^6$  клеток денитрификаторов в 1 час времени измерения результатов (учитываемого времени экспозиции), или же в микролитрах газа на 1 г сухой почвы в 1 час (получаем соответственно показатели активности денитрификаторов и активности почвы).

### Результаты опытов

Результаты по сравнительному изучению количественных динамик сапрофитных и денитрифицирующих бактерий в девственных лесных, целинной и старопахотных почвах по трем разновидностям Эстонских почв изложены на рисунках 2 и 3 и в табл. 2. Бросается в глаза значительное различие между подзолистыми и буроземной почвами как в диком, так и в окультуренном состоянии. По населенности бактериями буроземная почва превышает дерново-подзолистые почвы в 25...100 раз.

Можно видеть также, что численность денитрификаторов повышается при окультуривании всех изученных почв, причем увеличения в титрах тем значительнее, чем беднее исходная девственная почва.

Что же касается общего числа сапрофитов, то существенный подъем в их титрах нами обнаружен при окультуривании только бедной гумусом, кислой, песчаной дерново-подзолистой почвы. Освоение более богатой почвы этого же типа приводит к увеличению численности сапрофитной бактериофлоры только в первую пору окультуривания (в целине Ильматсадуской подопытной местности). Старопахотные почвы этого типа приблизительно равны дикой лесной почве по населенности сапрофитными бактериями. На богатых гумусом и обладающих хорошими физическими свойствами буроземных почвах окультуривание приводит даже к значительному снижению численности сапрофитных бактерий. Это отнюдь не мешает получению хороших урожаев. Даже в засушливое лето 1971 г. с изученного поля был собран урожай зерна ячменя 31...42 ц/га.

В табл. 3 приведены данные по определению потенциальной денитрификационной способности дерново-подзолистой супесчаной и буроземной суглинистой почв в зависимости от состояния окультуренности. Интерес представляет факт, что не только активность денитрификации почвы, которую можно связывать с численностью агентов процесса, но и активность кле-ток денитрификаторов как таковых возрастает в ходе освоения почв, в частности в случае дерново-подзолистой почвы. Из наших данных не выясняется, однако, происходит ли повышение активности нитратредукции денитрификаторов за счет индуцирования имеющихся популяций, или же за счет изменения качественного (видового) состава денитрифицирующей микрофлоры. Можно думать, что и последнее отмеченное обстоятельство играет известную роль, так как предварительные данные показывают некоторые изменения в этом отношении. Повышается, например, представленность семейства *Achromobacteriaceae* несмотря на то, что абсолютно увеличивается и численность псевдомонадных денитрификаторов. Значительно возрастает и число денитрификаторов из рода *Bacillus*, но не совсем ясно, не находится ли большая часть спорогенных денитрификаторов в богатой органическим веществом лесной почве в состоянии спор.

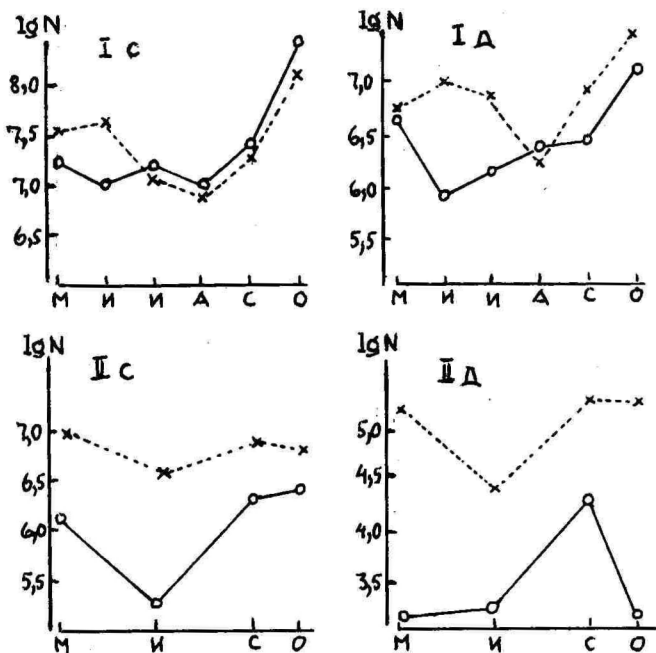


Рис. 3. Влияние окультуривания на динамику сапрофитных и денитрифицирующих бактерий в буроземной суглинистой и дерново-подзолистой песчаной почвах. I - буроземная почва, II - дерново-подзолистая почва, с - сапрофитные бактерии, д - денитрифицирующие бактерии, оооо - лесная почва, хххх - старопахотная почва

### Обсуждение результатов

Судя по нашим данным, положительное влияние окультуривания диких лесных почв на денитрифицирующие бактерии осуществляется уже в первые периоды их освоения, в стадии целины. При этом эффект окультуривания существенно зависит от свойств исходной почвы и от исходной растительности. Общая численность же сапрофитных бактерий в ряде случаев (при более хороших почвах) в старопахотных почвах не превышает их числен-

Таблица 2

Суммарные показатели активности роста сапрофитных и денитрифицирующих бактерий за вегетационный период

(данные 1970...1972 гг.)

Суммы результатов отдельных анализов  
за вегетационный период,  
в млн./см<sup>3</sup> сырой почвы

Почва	Состояние окультуренности	Сапрофиты		Денитрификаторы	
		Число анализов	Число анализов	Число анализов	Число анализов
		6	4	6	4
Дерн.-подзол, супесчаная	Смеш. лес, не-окульт.	15...	18	1,8...	4,7
	Целина, 6-ой год	13...	33	4,1...	11
	Старопахотное поле	12...	19	3,3...	6,9
Дерн.-подзол, песчаная	Сосновый лес, неокульт.		5,8		0,027
	Старопахотное поле		30		0,54
Буроземная, суглинистая	Дубовник, не-окульт.	410	380	28	26
	Старопахотное поле	280	260	69	54

Таблица 3

Денитрификационная способность  
(потенциальная активность)  
некоторых Эстонских почв

Анаэробные условия опыта, объем реакционной смеси 95 мл, 14,0 мг  $N-NO_3^-$  на сосуд, заражение 4 г почвы (по сухому весу), манометрическое определение выделенного газа ( $N_2$ ,  $N_2O$ ) за время линейной зависимости процесса от времени

Почва	Состояние окультуренности	Численность денитрификаторов в почве, млн./г	Выделено $N_2$ , $N_2O$	
			мкл на $10^6$ клеток за I час	мкл на 1г сухой почвы за I час
Дерн.-подзол.	Смеш. лес, некульт.	0,62	40,7	6,38
	Целина, 6-ой год осв.	0,98	68,8	16,9
	Старопахотное поле	0,70	81,0	14,2
Буроземная, суглинистая	Дубовник, некульт.	2,7	84,5	57,0
	Старопахотное поле	3,5	87,8	76,8

ности в лесных почвах, а даже уступает последней. По нашему мнению, можно скептически относиться к утверждениям, что повышение бактериальной населенности является обязательной закономерностью при окультуривании любых разновидностей почв, независимо от их исходного положения.

Что же касается собственно денитрификаторов, то уместно вспомнить заключение де Баржак (de Barjac, 1954) о том, что денитрификаторы можно брать как индикаторы окультуренности почвы. По нашим данным, это именно так, если под термином окультуренности подразумевать сумму результатов планомерного воздействия человеком. Это, однако, отнюдь не касается урожайности тех или других почв — окультуренность и урожайность не синонимы и не всегда должны совпадать. В понятие культурных почв, безусловно, входит и регулярное применение минеральных удобрений, что в конечном счете может привести к снижению биогенности культурных почв.

Денитрификаторы как индикаторы окультуренности "работают", по нашему мнению, только в пределах одного типа почвы. По абсолютным значениям их численности нельзя судить о данном показателе.

## В ы в о д ы

1. Численность денитрификаторов возрастает в результате окультуривания различных лесных почв тем больше, чем беднее исходная почва по содержанию питательных элементов и чем хуже ее физические свойства.

2. При окультуривании богатых почв с хорошими исходными свойствами подъем в численности денитрификаторов незначителен, а общее число сапрофитных бактерий может даже снижаться.

3. Денитрификационная активность богатой буроземной почвы многократно превышает такую же активность более бедных дерново-подзолистых почв.

4. Окультуривание почв приводит не только к повышению численности денитрификаторов, но и к повышению их потенциальной активности нитратовосстановления до газообразных продуктов.

## Л и т е р а т у р а

- Абатуров Ю.Д., Кашкина Т.Б. Влияние разведения при количественном учете микроорганизмов почв. - В сб.: Микроорганизмы в сельском хозяйстве. М., Изд-во МГУ, 1970, с. 80...88.
- Авдонин Н.С., Аренс И.П., Степанова Л.Н. Влияние удобрений на свойства дерново-подзолистых почв. - "Почвоведение", 1960, № 9.
- Аристовская Т.В. Микробиология подзолистых почв. М.-Л., "Наука", 1965.
- Беляев Г.Н. Микрофлора дерново-подзолистых песчаных почв в связи с изменением плодородия при длительном применении удобрений. - "Агробиология", 1960, № 4.
- Вавуло Ф.П. Влияние осушения и первичной обработки торфяно-болотной почвы на микрофлору. - Тр. Белорусск. НИИ почвовед., 1968, вып. 5, с. 148-158.
- Дупинович И.С., Голуб Т.Ф., Куриленко Н.И. Сезонная динамика некоторых свойств торфяно-болотной почвы при мелиорации. Минск, "Урожай", 1964.
- Мишустин Е.Н., Прокошев В.Н. Изменение состава почвенной микрофлоры в результате длительного применения удобрений. - "Микробиология", 1949, т. 18, вып. 1, с. 30.
- Рейнтам Л.Д. Характеристика некоторых почв на краснобурой морене и вопросы разграничения дерново-подзолистого, псевдоподзолистого и буроземного типов. - Сб. научных трудов ЭСХА, 1970, № 65.
- Рейнтам Л.Д. К характеристике почв буроземного типа. - Сб. научных трудов ЭСХА, 1970, № 65.
- Самцевич С.А. Взаимоотношения микроорганизмов почвы и высшие растения. - В сб.: Микроорганизмы почвы и растение. Минск, "Наука и техника", 1972, с.3...62.

- Сапожников Н.А. Некоторые новые пути в развитии учения Д.Н. Прянишникова об азоте в земледелии СССР. - "Агрохимия", 1973, № 2, с. 3...13.
- Barjac, H. de. La microflore dénitrifiante: sa présence normale dans le sol. - Ann. Inst. Pasteur, 1954, v. 87, № 4, p. 440-444.
- Lasting, V., Kaarli, L., Gurfel, D. Põhja-Eesti põhiliste mullaerimite mikrofloora ja selle sõltuvus muldade kultuuristamisest. - Eesti MMTUI Tead. Tööde kogumik. VIII. Mikrobioloogia. Tallinn, 1973, lk. 7-59.
- Soumare, S., Blondeau, R. Caractéristiques microbiologiques des sols de la région du nord de la France: importance des "arthrobacter". - Ann. Inst. Pasteur, 1972, v. 123, № 2, p. 239-249.
- Zayed, M.N., Taha, S.M., Saber, M.S.M., Badr El-Din, S.M.S. Nitrogen Transformations in Soils. I. In Sandy Soil under Barley and Peanut in a Two Years' Rotation. - Zbl. Bakteriolog., Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg., 1973, Abt. 2, B. 128, No 1-2, S. 116-125.
- Tohver, V. The Character of Nitrate Transformation and the Development of Denitrifying Bacteria in Peat Soil in Dependence on Some Ecological Factors. - In: Nitrogen Supply for Plant Growth. Tartu, 1973, pp. 50-68.
- Voisin, A. Les nouvelles lois scientifiques d'application des engrais. Quibec, 1964.

THE CHANGES IN DENITRIFICATION ABILITIES  
OF SOILS WHEN BEING CULTIVATED

V. TOHVER

Summary

The changes of the denitrification abilities of soddy podzolic sandy loam and sandy soils, and of brown loamy forest soils under the influence of cultivation were investigated in 1970...1972 (forests: fir-birch-alder mixed stand, Norway spruce stand, pine stand, oak grove), the forest, freshly raised virgin and old arable soils being compared among themselves. It was found that the numbers of soil denitrifiers rise as a result of soil cultivation the more, the poorer the original forest virgin soil is in nutritive elements and the worse its physical properties are. If rich natural soils (brown soil under oak grove) are cultivated, the rise in numbers of denitrifiers is negligible. The quantities of soil saprophytic bacteria often fall in these cases. The potential denitrifying ability of brown soils exceeds the same ability of sandy loam soddy podzolic soils some 6...10 times. In cultivated soils the denitrifying activity of denitrifiers is considerably higher than their activity in initial virgin forest soils.

## ВЛИЯНИЕ ВЕГЕТАЦИИ НА ДЕНИТРИФИКАЦИОННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОЧВ

В. Тохвер

Первостепенное значение растений в любых ассоциациях живых существ на Земле в настоящее время уже не требует новых доказательств. Зеленые растения – это главный механизм, через который энергия вводится в биосферу. Все основные цепи питания начинаются с фотосинтетической деятельности растений (хемосинтез имеет в современных условиях ничтожное значение по сравнению с фотосинтезом). Этот принцип уже давно установлен, но конкретные звенья и явления в экологических консорциях нуждаются в дальнейшем изучении, конкретные связи в экосистемах требуют выяснения. Одним из таких вопросов является проблема воздействия растительности на относительно самостоятельные консорты, в частности на численность, динамику и биохимическую активность почвенных микроорганизмов. Это тем более существенно, что вместе с работами, открывающими основу первостепенного значения вегетации в активности и сезонности почвенной микрофлоры в последнее время появились некоторые работы, в которых выводы о сезонности и деятельности почвенных микробов в природных условиях сделаны на основе модельных опытов в безрастительных "биометрах" (Рахно, 1964, Рахно и др., 1971). В частности, на основе "биометров", почву которых за многие годы хранят без растительности, сделаны заключения об отсутствии сезонности не только в самих "биометрах". Без всяких ограничений П. Рахно говорит об отсутствии закономерных временных изменений численности микроорганизмов в почве вообще, т.е. распространяет свои результаты, полученные в безрастительных биометрах, на всю природу зоны умеренного климата.

Вышеотмеченное положение дел требует дальнейшего изучения значения вегетации в жизни почвенных микроорганизмов. Относительно деятельности сапрофитных бактерий, в том числе и денитрификаторов, в период 1954...1972 гг. нами проведены наблюдения, результаты которых излагаются в настоящей статье.

Что касается изученных нами денитрифицирующих бактерий из родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* и др., то уже давно установлена их принадлежность к ризосферным микроорганизмам (Курсакова, 1953, Нетте, 1955), но, вместе с тем, денитрификаторы в больших количествах обнаруживаются и в прикорневой зоне, и в "свободной" почве (Sobieszczański, 1965, Насырова, 1968). Это оправдывает интерес к денитрифицирующим бактериям и вне ризосферы.

#### М е т о д и к а и с с л е д о в а н и я

I. Первая часть исследовательских работ проведена в 1954...1959 и 1967...1969 гг. на болотной опытной базе Вягева-Тоома, Эст. ССР, на полях опыта по изучению регулирования водного режима. Опыт заложен научными работниками базы в 1948...1950 гг. Почва данных полей тростниково-осоковая, низинного типа со степенью разложения 30...40%. Как опытное поле, так и методика наших микробиологических исследований подробно описаны в наших предыдущих работах (Tohver, 1958, 1973, Тохвер, 1972). В настоящей статье излагаем данные по определению количественной динамики денитрифицирующих бактерий на основе анализов, проведенных по методу предельных разведений (5 параллельных пробирок для каждого разведения) на среде Гильтэя, а также результаты измерения концентрации нитратов в почве и в дренажных водах (колориметрическое определение дисульфифеноловой кислотой). Излагаются многолетние средние данные относительно участка поля с 95-см уровнем стояния грунтовых вод из-под различных полевых культур (рожь, ячмень, подсолнечник, картофель, травы) и относительно такого же участка без растений. Так как безрастительные площади из года в год менялись, кумуляции влияния безрастительного состояния не было.

В данном опыте влажность почвы сохраняли с помощью системы орошения и осушения на относительно постоянном уровне (в пределах 54...58% от максимального содержания воды). Это позволяло вычислять полученные "сырые" результаты количественных микробиологических анализов на 1 г сухой почвы, не на единицу объема сырой почвы (см. с. 75 наст. сборника).

2. В 1970...1972 гг. нами изучена количественная динамика сапрофитных бактерий, и денитрифицирующих бактерий, в частности, в условиях модельного опыта в т.н. биометрах (по П. Рахно). Методика этих опытов описана уже раньше (Tohver, Nagusk, 1973). Здесь же уместно упомянуть, что наши "биометры" - это бездонные бетонные ящики площадью 2,56 м<sup>2</sup> каждый. Они вкопаны в грунт почти до верхнего края, изолированы от естественного грунта 20-см слоем щебня и заполнены 50-см слоем дерново-карбонатной почвы, просеянной через 8-мм сито. Влажность почвы в течение всего вегетационного периода поддерживалась в пределах 32..35%. Из шести "биометров" два постоянно выдерживали в безрастительном состоянии, в двух выращивали ячмень 'Носовский 2' в полной посевной норме (500 семян на 1 м<sup>2</sup>), а в двух остальных - норма посева равнялась 100 семян/м<sup>2</sup>. В качестве удобрения все "биометры" ежегодно получали по 69 г NaNO<sub>3</sub>, 50,5 г K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 200 г крахмала.

С апреля до октября ежемесячно во второй декаде месяца определяли численность сапрофитных и денитрифицирующих бактерий (соответственно на МПА в чашках Петри и в среде Гилтэя по методу предельных разведений). При этом для проведения анализов на твердой среде инокулят брали всегда из одного и того же разведения с тем, чтобы предотвратить искажения результатов в связи с пересчетом по разведениям (в ходе данной работы - 4-ое разведение, причем количество инокулята варьировали в зависимости от ожидаемого результата от 0,05 до 0,20 мл). Относительное постоянство влажности почвы позволяло и здесь использовать традиционный способ выражения результатов количественных анализов микроорганизма на единицу массы сухой почвы (на 1 г сухой почвы).

Кроме указанных анализов, в "биометрах" изучали и баланс азота. Определяли как в почве, так и в урожае общий азот по Кьельдалю, нитратный азот по Гренвалю, нитритный азот по Граусу и Лунге, аммиачный азот по Несслеру.

При проведении микробиологических анализов соблюдали общепринятые требования, приведенные в руководстве "Методы изучения почвенных микроорганизмов..." (1966).

3. В 1970...1972 гг. сравнивали количественные динамики сапрофитных и денитрифицирующих бактерий в буроземной почве под 85-летним ельником и 200-летним дубовником (Пярнуский район, Эст. ССР, Михклиский стационар Эстонской сельс-

кохозяйственной академии). Пробы брали по горизонтам  $A_I$  (2...10(12) см в ельнике, 1...13(15) см в дубовнике) и  $B_I$  (10(12)...45 см в ельнике, 13(15)...50(53) см в дубовнике) ежемесячно с мая до октября. Так как за время вегетации влажность почвы, вместе с ней и объемный вес почвы, значительно изменялись (в пределах 6...33% в горизонте  $A_I$  и 7...20% в горизонте  $B_I$ ), мы не считали возможным, в интересах получения сравнимых данных, выражать численность микроорганизмов относительно единицы массы (1 г сухой почвы). Численность микроорганизмов в данных исследованиях вычисляли на 1 см<sup>3</sup> сырой почвы, т.е. на единицу объема.

4. В 1971 г. нами определен баланс азота в лабораторных металлических лизиметрах, схема которых изображена на рис. 1. В лизиметры поместили по 1300 см<sup>3</sup> легкой песчаной лиственной почвы. Влажность почвы регулировали постоянно на 60% от максимального содержания воды. Через каждую неделю проводили избыточное увлажнение, так что часть воды проходила почву и собиралась в нижней конической части лизиметра. В 4 лизиметрах выращивали салат 'Кивилэа', 4 лизиметра выдерживали безрастительными. В качестве удобрения каждый лизиметр получил 1 г  $NaNO_3$  и 0,7 г  $KH_2PO_4$ . Продолжительность опыта - 71 день при комнатной температуре. Формы азота определяли как и прежде (п.п. 2).

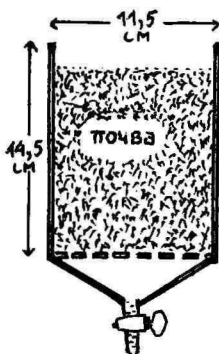


Рис. 1

Лабораторный лизиметр (схема в разрезе). Нержавеющий металл. Почва находится на решетчатой пластине.

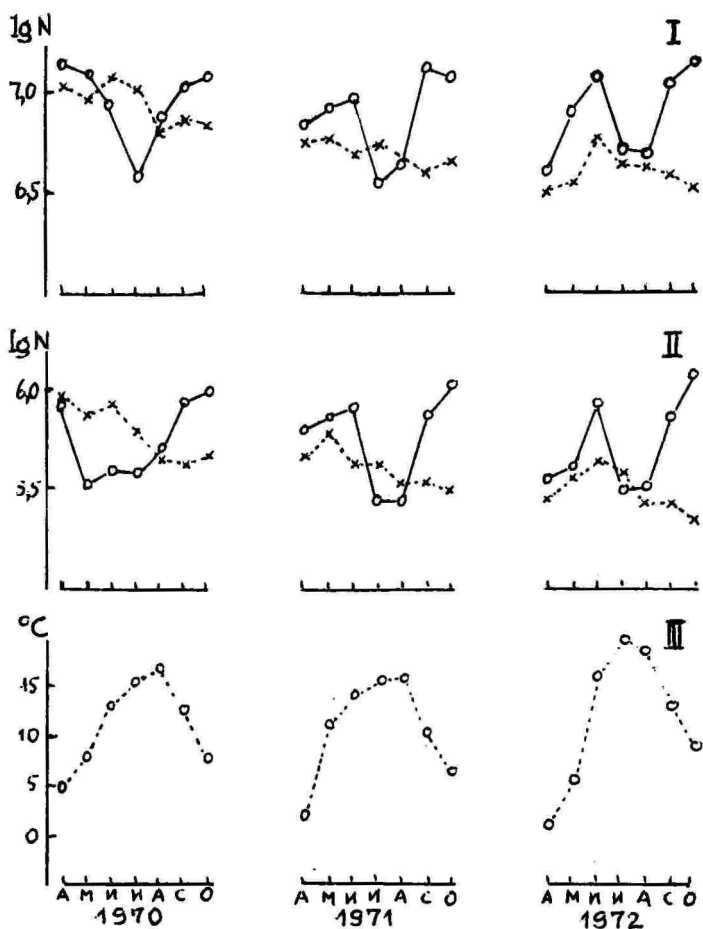


Рис. 3. Динамика численности денитрификаторов в дерново-карбонатной почве. Вегетационный опыт в "биометрах". Данные 1970...1972 г.г. I - общее число сапрофитных бактерий, II - денитрифицирующие бактерии, III - температура почвы,  $\circ\circ\circ\circ$  - под ячменем 'Носовский 2',  $\times\times\times\times$  - вариант без растений

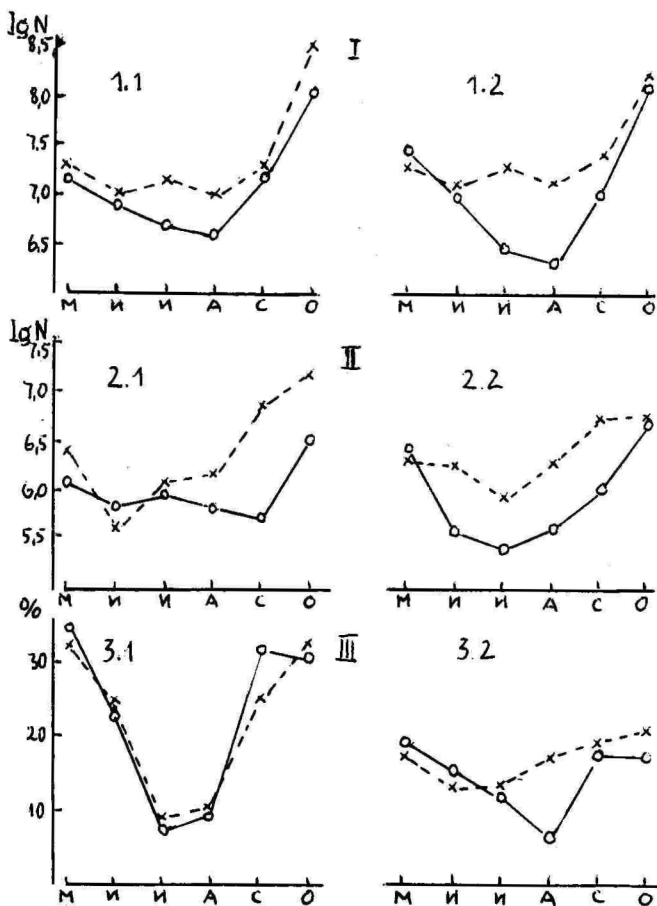


Рис. 4. Динамика численности сапрофитных и денитрифицирующих бактерий в буроземной почве под ельником /oooo/ и дубовником /xxxx/. I - общее число сапрофитных бактерий, II - денитрифицирующие бактерии, III - влажность почвы, I.1, 2.1 и 3.1 - в горизонте А<sub>1</sub>, I.2, 2.2 и 3.2 - в горизонте Б<sub>1</sub>. Средние данные 1970...1972 г.г.

## Результаты исследований

I. Результаты по изучению зависимости количественной динамики сапрофитных бактерий и денитрификаторов от наличия вегетации изложены на рис. 2 и 3. Видно, что во всех вариантах с растениями динамика изученных микроорганизмов принципиально имеет одинаковый ход: после весеннего максимума наступает летний минимум, который в свою очередь заменяется новым подъемом титров микроорганизмов в осеннее время. Конкретное положение периодов снижения и повышения титров при этом несколько варьирует в зависимости от имеющихся метеорологических и др. условий. Наблюдения показывают, что уменьшение титров бактерий, в частности денитрификаторов, совпадает с наступлением периода интенсивного вегетативного роста растений. Такие наблюдения хорошо согласуются со взглядами С.А. Самцевича (1972) о том, что растения регулируют численность почвенных микробов в зоне расположения корневой системы. Следует целиком поддерживать мнение С.А. Самцевича, что "...чем мощнее и лучше растет растение, тем успешнее оно противостоит ... заселению корней и проникновению в их ткани не только патогенных, но и большинства вульгарных сапрофитных микроорганизмов" (там же). Именно ослаблением влияния растений в период завершения их роста можно объяснить отмеченный подъем в титрах после фазы цветения. Далее, крутое увеличение численности сапрофитных, в том числе и денитрифицирующих бактерий, наблюдается в сентябре-октябре после уборки или смерти полевой растительности. В лесных почвах, где повышение численности сапрофитных бактерий в указанный период особенно круто, в сентябре-октябре обычно складываются довольно благоприятные условия для гниения органических остатков, накапливающихся как на поверхности земли, так и в почве. Регуляторное влияние древесных растений постепенно ослабляется в связи с приостановлением процесса роста и интенсивность сапрофитных процессов зависит, прежде всего, от влажности и температуры почвы. Последние зависимости видны и по нашим рисункам.

В подопытных участках без растений вышеописанной динамики не наблюдаем. В таких вариантах летний минимум, как правило, отсутствует — его заменяет постепенное снижение дит-

ров микроорганизмов к осени. Наблюдаемые колебания во время весенне-летне-осеннего периода можно связывать с влиянием различных абиотических внешних факторов. Так как эти факторы часто воздействуют в противоположных направлениях, то в конечном счете получается сложная, трудно истолковываемая картина количественной динамики, тем более, что к влиянию абиотических факторов прибавляются сложные отношения между самими микробами. Такие отношения имеют иногда решающее значение в условиях отсутствия общего мощного регулятора в виде растительного воздействия. При неуравновешанной жизни в безрастительной почве деятельность микроорганизмов сравнительно легко может привести к самоотравлению отдельных почвенных зон (часто такое самоотравление, или "утомление почвы", наблюдается и в почвах под монокультурами, где также господствуют неуравновешенные условия, в т.н. дикой природе самоотравление почвы встречается редко).

Несмотря на многозначные колебания в динамике микроорганизмов в безрастительных почвах, выявляется одна общая закономерность: ввиду отсутствия достаточного притока свободной энергии в почвы, хранящиеся в течение ряда лет в безрастительном состоянии, такие почвы представляют собой деградирующиеся массы, где микробная жизнь постепенно затухает.

Факт существования значительных различий в микробной динамике в почве под растениями и без растений находит подтверждение в результатах проведенного нами  $\chi^2$ -анализа полученных экспериментальных данных (табл. I). В особенности следует отметить, что различия в значениях  $\chi^2$  являются наивысшими в почвенном горизонте расположения главной массы активных корней растений.

2. По данным рис. 3 видно, что растительность оказывает решающее влияние на ход количественной динамики микроорганизмов не только по сравнению с безрастительными условиями. Существенные различия обнаруживаются и в зависимости от состава растительных сообществ в одном и том же типе почвы (в нашем случае под ельником и соседним дубовником на буроземной почве). Как показывает  $\chi^2$ -анализ (табл. I), наблюдаемые различия следует признать высокостепенными. Как и в опытах, результаты которых описаны под п.п. I, наиболее значительные различия обнаружены в горизонте расположения главной массы активных корней.

Таблица I

Результаты  $\chi^2$ -анализа по значимости различий в количественных динамиках  
микроорганизмов в зависимости от наличия и характера вегетации

Сравниваемые варианты по вегетации	Почва	Горизонт, см.	Микробы	Результаты анализа		
				Число степеней свобод.	Значение $\chi^2$	Уровень значимости, %
С растениями/без растений	Торфяная	0-10	Денитрифик.	9	11,3	70
то же	"	20-30	"	9	13,6	85
Ельник/дубовник	Буроземная	1-15	Сапрофиты	5	20,5	99,9
то же	"	15-45	"	5	24,8	>99,9
то же	"	1-15	Денитрифик.	5	24,2	>99,9
то же	"	15-45	"	5	53,4	>>99,9
С растениями/ без растений	Дерново-карб.	0-20	Сапрофиты(1970)	6	19,7	99
то же	"	"	" (1971)	6	16,5	97,5
то же	"	"	" (1972)	6	21,1	99
то же	"	"	Денитриф.(1970)	6	17,2	99
то же	"	"	" (1971)	6	13,8	95
то же	"	"	" (1972)	6	13,6	95

Таблица 2

Корреляция между динамиками  
сапротитов и денитрификаторов  
в почвах

Биотип	Почва	Горизонт см.	Число степ. своб. $n'$	Значе- ние $r$	Уровень значи- мости, %
Ельник	Буроземная	2...10	5	0,94	99,8
"	"	10...45	5	0,95	99,8
Дубовник	"	1...13	5	0,95	99,8
"	"	13...50	5	0,73	495
Веget. опыт, с растениями					
-1970 г.	Дерн.-карб.	0...20	6	0,51	495
-1971 г.	" "	0...20	6	0,96	99,8
-1972 г.	" "	0...20	6	0,92	99
Веget. опыт, без растений					
-1970 г.	Дерн.-карб.	0...20	6	0,90	99
-1971 г.	" "	0...20	6	0,79	95
-1972 г.	" "	0...20	6	0,83	95

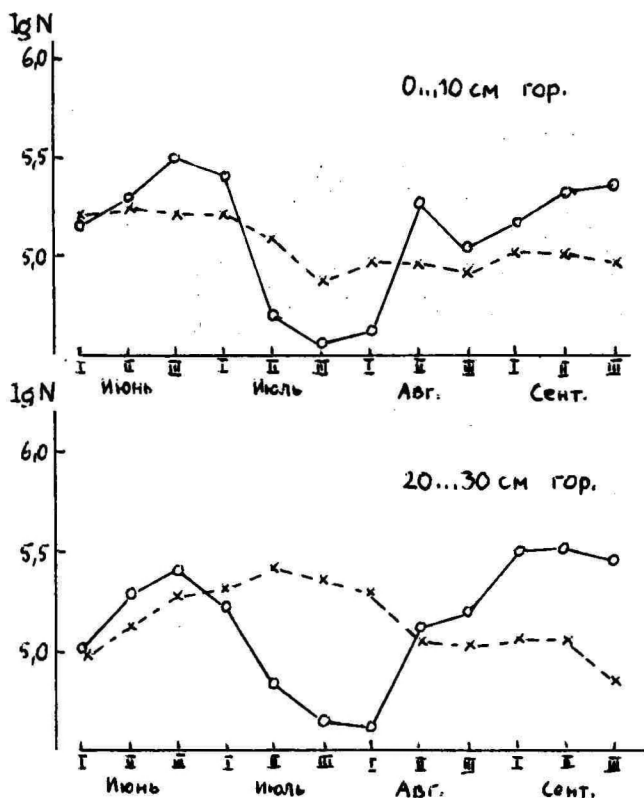


Рис. 2. Динамика численности денитрификаторов в низинной торфяно-болотной почве, в зависимости от наличия вегетации полевых культур. Многолетние средние данные.  $\circ\circ\circ\circ$  - под растениями,  $\times\times\times\times$  в безрастительных участках

Оказывается, что растения, не изменяя за десятилетия, даже за столетия, общий тип почвы (он складывается за целые геологические периоды) и не устранив общий характер микрофлоры, свойственный для данного типа почвы, все-таки приводят к значительным количественным изменениям в пределах отдельных физиологических групп микроорганизмов, стало быть, и в количественных соотношениях таких групп. Что касается денитри-

факторов, то в нашем распоряжении имеются данные, показывающие, что изменения затрагивают и качественные аспекты микрофлоры. По таксономическому анализу бактерий, выросших на Гилтэй-агаре, можно заключить, что в почве под дубовником денитрификаторы из семейства *Achromobacteriaceae* имеют в 2...3 раза более сильную представленность, чем в почве под ельником (доминируют, при этом, в обоих биотипах представители рода *Pseudomonas* ).

3. На основе результатов определения динамики общего числа сапрофитных бактерий и денитрификаторов нами проведен корреляционный анализ, результаты которого изложены в табл. 2. Выявленная высокодостоверная корреляция между количественными динамиками указанных групп микроорганизмов является, по нашему мнению, неудивительной, несмотря на то, что не все исследователи нашли такую корреляцию. В условиях, где денитрификаторы представляют собой лишь часть общей сапрофитной микрофлоры, высокая корреляция между обоими показателями является возможной, хотя и не обязательной, в зависимости от качественного состава денитрифицирующей микрофлоры и факторов, индуцирующих переключение части сапрофитов на нитратное дыхание. В общем случае результаты коррелируются между собой. Если же положительная корреляция отсутствует, то следует искать причины в специальных воздействиях, способствующих или препятствующих выявлению способностей к нитратному дыханию у частиц сапрофитной микрофлоры, в некоторых случаях и в деталях методики анализа.

4. Данные, представленные в табл. 3, 4 и 5, показывают большое, даже порвостепенное значение вегетации (ее существования и мощности) в сложении денитрификационных потерь азота из почвы. Под растениями нитратный азот накапливается в меньшей мере, меньшими являются поэтому потери от вымывания. Вместе с тем значительно (в 3...10 раз) меньшими являются под растениями и денитрификационные потери. По данным табл. 5 видно, что размеры денитрификационных потерь азота находятся в прямой отрицательной связи с интенсивностью роста растений (с размерами растительного урожая). Повышение урожая ячменя от 100 г/м<sup>2</sup> до 350 г/м<sup>2</sup> ( в сухом весе биомассы) сопровождается изменением баланса азота от -19% до +4,6%. Это значит, что при определенном уровне интенсивности роста растений денитрификационные потери могут стать настолько небольшими, что покрываются, очевидно, биологической фиксацией воздушного азота.

Таблица 3

Содержание нитратов ( $\text{NO}_3^-$ ) в низинной торфяно-болотной почве и в дренажных водах за летние месяцы

Многолетние средние данные,  
уровень стояния грунтовых  
вод 90...95 см.

Месяцы	$\text{NO}_3^-$ в почве мг/100 г		$\text{NO}_3^-$ в дренажных водах, мг/л	
	под полевые культуры	в безрастительном участке	под полевыми культурами	в безрастительном участке
Июнь	4...20	23...40	2,2...3,0	3,1...4,4
Июль	8...16	42...70	2,8...3,3	3,9...4,4
Август	10...22	26...50	3,3...3,9	5,0...6,0

Таблица 4

Баланс азота в вегетационном опыте  
в лабораторных лизиметрах  
(в мг на один лизиметр)

Показатели	В варианте	
	без растений	с растениями
В начале опыта, сумма азота	3134	3134
- в том числе нитратный азот	179	179
В конце опыта, сумма азота	2039	2459
В урожае растений (салата)	-	296
Общий дефицит	1095	379
Вывыто поливными водами	52	34
Суммарные потери денитрификации	1043	345

Таблица 5

Зависимость потерь азота от интенсивности вегетации

Вегетационный опыт в "биометрах" площадью 2,56 м<sup>2</sup> каждый, ячмень 'Носовский 2', дерново-карбонатная почва

Показатели	100	500
Урожай растений (сухой вес надземных частей и корней), г на м <sup>2</sup>	100,6	350,0
Азот в урожае, г/м <sup>2</sup>	0,58	2,04
Азот в 0,2-м слое почвы, г/м <sup>2</sup>		
- в день посева	337,3	336,4
- после уборки урожая	330,1	334,0
Баланс азота		
± г/м <sup>2</sup>	-7,20	-1,82
± % от внесенного азота*	-75,1	-19,0

\* в виде  $\text{NaNO}_3$  внесено 9,6 г N/м<sup>2</sup>

## Обсуждение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что размеры денитрификационных потерь азота из почвы существенно зависят от наличия и от интенсивности роста растений. Такой результат находится в согласии с литературными данными о том, что в парующих почвах денитрификация протекает значительно активнее, чем под культурными растениями. Предпосылки для этого создаются уже усиленной нитрификацией, приобретающей в

парующей почве односторонне большие размеры (Schmalfuß, 1969). Опасность особенно велика в богатых гумусом почвах. Конкуренция же со стороны живых растений снимает возможность сколько-нибудь значительной денитрификации. Можно согласиться со словами Т.Х. Хаджиева (1967) о том, что потери нитратного азота в период вегетации растений маловероятны. В противоположность этому, в парующей почве потери азота неизбежны и могут достигать больших размеров (Турчин, 1964, Смирнов и др., 1968). Как показывают наши данные, потери уменьшаются вместе с усилением роста растений. Именно в этой зависимости, опирающейся на основные биологические закономерности жизни биоценозов, можно видеть естественный путь борьбы с потерями азота. Задачей земледельцев является поэтому создание условий для повышения урожаев, для получения их в максимальном размере с тем, чтобы предотвращать потери питательных элементов. В т.н. дикой природе всегда образуются ценозы, дающие максимальную с учётом существующих условий биопroduкцию, так как отдельные звенья ценоза взаимно уравновешены на базе лимитирующих условий (Тооминг, 1970, 1972). В связи с этим становится понятным, почему некоторые естественные ценозы (в условиях Северо-Западной части СССР, например, ельники) значительно превышают биопroduкцию любой полевой культуры (Frey, 1971, Arvisto, 1970). Никакие полевые культуры не могут в наших почвенно-климатических условиях дать свойственную Эстонским ельникам биопroduкцию в 13... ..19 т/га в год (в сухом весе). Вместе с тем, потери азота в условиях естественных ценозов минимальные (Tohver, 1970). В почвах таких ценозов подвижные соединения не накапливаются - авторегулирующие механизмы чувствительно реагировали бы на такие колебания - и тем самым потери хранятся в минимуме. В возделываемых же почвах равновесие процессов, благодаря ежегодному вмешательству человека, не может устанавливаться. Создание наиболее уравновешенных условий - это задача земледельцев. Сказанное относится к удобрению, к созданию благоприятных водно-воздушных условий, к применению урожайных сортов растений и т.д., т.е. к факторам, которые могут способствовать получению максимальных урожаев. Максимальные урожаи - это признак удовлетворения основных требований уравновешенности условий и в то же время максимальной экономности использования питательных элементов.

Выяснение общего значения растительности в жизни сапрофитных бактерий, т.е. подавляющего большинства почвенных бактерий, заставляет нас скептически относиться к результатам и выводам П. Рахно и его сотрудников об отсутствии в природе закономерной, характерной количественной динамики почвенной бактериофлоры. О существовании определенного годичного ритма количественной динамики почвенных бактерий в неразрывной связи с динамикой роста и развития растительности свидетельствуют не только наши данные. Дело не только в активном воздействии, отмеченном С.А. Самцевичем. Главное влияние растительности состоит в том, что она представляет собой основной механизм приобретения внебиосферной энергии. Полевые участки, оставленные без растительности, а также безрастительные "биомеры" П. Рахно теряют главное движущее начало и подвергаются влиянию случайных факторов. Такие "биомеры", очевидно, непригодны для изучения в природе таких сложных явлений, как сезонность жизненных процессов. Хорошо высказана эта мысль А.А. Шаминым и В.Н. Былинкиной: "...Нормальная" почва - поддерживаемая не менее трех лет в состоянии строго чистого пара - образование весьма искусственное. Напротив, растения, а следовательно, и растительные остатки, представляют неотъемлемую, конституционную часть любой почвы (Шамин, Былинкина, 1970). "Биомеры" П. Рахно могут быть пригодными в безрастительном состоянии только в качестве контрольных сооружений при изучении некоторых частных вопросов (детали процесса разложения гумуса, абстрагированное воздействие отдельных внешних факторов и т.д.), но не при изучении интегральных процессов в их совокупности. А таким интегральным процессом как раз является сезонность микробиологических процессов в природе. Поэтому результаты П. Рахно действительно лишь только для его "биомеров".

#### В ы в о д ы

I. В почве под растениями наблюдается характерная, зависящая от ритма роста и развития растительности количественная годичная динамика сапрофитных бактерий, денитрификаторов в том числе. В участках, выдерживаемых в безрастительном состоянии, такой динамики не обнаруживается.

2. В периоды активного вегетативного роста растений численность сапрофитных бактерий, в том числе и денитрификаторов, значительно уменьшается в почвенных горизонтах расположения корневой системы растений.

3. В денитрифицирующей бактериофлоре обнаружены количественные и качественные изменения в одном и том же типе почвы в зависимости от состава растительных сообществ.

4. Денитрификационные потери азота находятся в противоположной зависимости от мощности роста растительности. При активном росте растений, ведущем к синтезу максимальных количеств биомассы, денитрификационные потери из почвы снижаются до минимальных значений, во многих случаях полностью покрываемых биологической фиксацией атмосферного азота.

5. По полученным данным следует считать ошибочным при изучении природных закономерностей количественной динамики почвенных микробов ограничение искусственными безрастительными моделями в виде т.н. биометров П. Рахно.

#### Л и т е р а т у р а

Корсакова М.П. Денитрифицирующие микроорганизмы. — "Микробиология", 1953, т. 22, № 2, с. 215–219.

Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. Отв. ред. Н.А. Красильников. М., Изд-во МГУ, 1966, 216 с. ил.

Нетте И.Т. Денитрифицирующие бактерии ризосферы дуба. — "Микробиология", 1955, т. 24, № 4, с. 429 — 434.

Насырова З.А. Содержание денитрифицирующих бактерий в прикорневой зоне некоторых растений. — "Узб. биол. ж", 1968, № 4, с. 49–50.

Рахно П.Х. Сезонная количественная динамика почвенных бактерий и факторы, обуславливающие ее. Таллин, Изд-во АН ЭССР, 1964, 236 с. с ил.

Рахно П., Аксель М., Сирп Л., Рийс Х. Динамика численности почвенных микроорганизмов и соединений азота в почве. Таллин, "Валгус", 1971, 208 с. с ил.

- Самцевич С.А. Взаимоотношения микроорганизмов почвы и высших растений. - В. сб.: Микроорганизмы почвы и растения. Минск, "Наука и техника", 1972, с. 3-62.
- Смирнов П.М., Базилевич С.Д., Бронников В.И. Усвоение растениями и превращение в почве аммиачного и нитратного азота аммиачной селитры (по данным исследований с  $N^{15}$ ). - Изв. ТСХА, 1968, № 2, с. 75-86.
- Тохвер В. О перемещении нитратного азота в торфяно-болотной почве в связи с развитием денитрификаторов. - В сб.: Экология и физиолого-биохимические основы микробиологического превращения азота. Тарту, 1972, с. 237-243.
- Тооминг Х. Радиационный режим и продуктивность растительного покрова. Автореф. докт. дисс. Тарту, 1972. 32 с.
- Турчин Ф.В. Превращение азотных удобрений в почве и усвоение их растениями. - "Агрехимия", 1964, № 3, с.3...9.
- Хаджиев Т.Х. Зависимость потерь неорганического азота от содержания денитрифицирующих бактерий в луговых и сероземных почвах. - В сб.: Биология и физиология микроорганизмов. Ташкент, "Фан", с. 170...173.
- Шамин А.А., Былинкина В.Н. Экологическая почвенная микробиология и теория Н.М. Лазарева о биоорганическом комплексе почвы. - В сб.: Микробиология земледелия. Л., 1970, с. 192...211.
- Arvisto, E. Content, Supply, and Net Primary Production of Biochemical Constituents in the Phytomass of Spruce Stands on Brown Forest Soils.-Est. Contributions to the IBP, 1970, v. I, pp. 49-70.
- Frey, T. Productivity of Norway Spruce Stands Deserves a Coordinated Ecological Study. - Est. Contributions to the IBP. Progress Report III. Tartu, 1971, pp. 7-18.

- Schmalfuß, K. Pflanzenernährung und Bodenkunde. 11. Aufl. Leipzig, S. Hirzel Verlag, 1969. 270 S.
- Sobieszczanski, J. Role of Microorganisms in Life of Cultivated Plants. I. Quantitative and Qualitative Changes in the Microflora of the Rhizosphere of Rye and Winter Vetch during the Vegetation Period. II. Effect of Microorganisms from the Rye and Vetch Rhizosphere and from Root-Free Soil on the Development of Plants. - Acta microbiol. polonica, 1965, v. 14, No 2, pp. 161-202.
- Tohver, V. Denitrifikatsioonist kuivendatud turvasmullas. - TRÜ Toimetised, 1958, vihik 55, lk. 88-96.
- Tohver, V. Lämmastikuringe iseärasused kui bioproduktiooni limiteerivad faktorid. - Kogumikus: IX Eesti Loodusuurijate Päeva ettekanded. Tartu. 1970, lk. 84-90.
- Tohver, V. The Character of Nitrate Transformation and the Development of Denitrifying Bacteria in Peat Soil in Dependence on Some Ecological Factors. In: Nitrogen Supply for Plant Growth. Tartu, 1973, lk. 50-68.
- Tohver, V., Narusk, L. The Dependence of Denitrification Activity and Nitrogen Losses Level on the Existence of Vegetation. - In: Nitrogen Supply for Plant Growth. Tartu, 1973, lk. 88-96.
- Tooming, H. Taimkatte maksimaalsest produktioonist. - Kogumikus: IX Eesti Loodusuurijate Päeva ettekanded. Tartu, 1970, lk. 82-84.

THE INFLUENCE OF VEGETATION UPON THE  
DENITRIFICATION INDICATORS OF SOILS

V. TOHVER

Summary

The existence, character and intensity of vegetation upon the denitrification indicators of some Estonian soils were investigated during 1970...1973. The first-rate importance of these factors in forming the denitrification abilities of virgin and cultivated soils was ascertained. In soils under plants a characteristic dynamics in the numbers of saprophytic bacteria (the denitrifiers among them) could be observed during the vegetation period, while in parallel areas, kept in plant-free conditions, no clear dynamics could be detected (except the response to abiotic external influences, such as meteorological events, etc. During the period of intense growth of plants (June, July) in the room of the root system the numbers of saprophytic bacteria in general, the denitrifiers especially, have minimum values. The denitrification losses of nitrogen show a direct dependence on the intensity of plant growth. If the vegetation develops intensely, and forms maximum quantities of biomasses, the losses have minimum values and can be covered by biological fixation of molecular nitrogen.

The regularities of the quantitative dynamics of soil microorganisms cannot be established if vegetation is not taken into consideration.

ЗАВИСИМОСТЬ ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ  
ОТ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
В ПОЧВАХ ЯБЛОНЕВЫХ САДОВ

Л. Вийлеберг

Определение численности микроорганизмов и количества фенольных соединений в утомленной и нормальной (неутомленной) почвах яблоневых садов представляет интерес для выяснения причин почвоутомления. По литературным данным, почвоутомление яблоневых садов связано с продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, а также с фенольными соединениями (особенно с флоридзином), выделяемыми корнями яблони или попавшими в почву при разложении корней (Гайдамак, Кушнир, 1967). Фенольные соединения являются, с одной стороны, фитотоксическими (Börner, 1961, Weigel, 1965) и бактерицидными агентами (Плотникова и др., 1967; Товарс, 1968), с другой стороны, — источниками энергии для многих микроорганизмов (Мийдла, 1965; Jayasankar, Bhar, 1966; Харборн, 1968). По Юргенс и Харборн (Jürgens, 1967, Харборн, 1968), флоридзин и продукты его деградации в почве не аккумулируются, так как они быстро разлагаются почвенными грибами. Поэтому роль фенольных соединений в почвоутомлении остается пока сомнительной.

Судя по литературным данным, вопросы почвоутомления выяснены не полностью. В течение вегетационного периода трех лет (1970...1972) нами определялась численность некоторых важнейших физиологических групп микроорганизмов и количество некоторых фенольных соединений в утомленной и неутомленной почвах яблоневых садов. Была сделана попытка выяснить, в какой мере в отношении названных показателей различаются между собой утомленная и нормальная почвы.

Под наблюдение были взяты два яблоневых сада Вазулаского совхоза Тартуского района, Эст. ССР, один из них заложен в 1964 г. на полевом участке, другой — в 1957 г. на площади прежнего яблоневых сада. Исходя из роста и урожайности яблонь, почва первого сада была отнесена к нормальным, почва второго сада — к утомленным почвам. Исследованные сады рас-

положены на среднеплодородной, с низкой влажностью (10...15%) супесчаной почве, более подробная характеристика которых дана в статьях Л. Вийлеберга 1972 и 1973 гг. В обоих садах применялись одинаковые приемы агротехники. Пробы почвы брались в объеме кроны яблони на глубине 2...40 см один раз в месяц в течение вегетационного периода.

Количество фенольных соединений (флоридзина, флоретиновой кислоты, р-гидроксibenзойной кислоты, сиреневой кислоты и ванилиновой кислоты) в почве определялось по методике Бардинской и др. (1962) и Мийдла (1967, 1972).

Численность почвенных микроорганизмов определялась методом почвенного разведения (3 параллели). Численность аммонификаторов определялась на МПА из второго почвенного разведения, численность азотобактера на Эшби-агаре из второго почвенного разведения в чашках Петри. Численность нитрификаторов определялась в среде Виноградского, численность денитрификаторов - в модифицированной среде Гильтэя, *Cl. pasteurianum* - в среде Виноградского и аэробные целлюлозоразлагающие бактерии - в среде Хечинсона. "Численность" почвенных грибов определялась на агаре с пивным сусликом (0,1-мл высеив из второго и третьего почвенного разведения). В среду добавляется стрептомицин (500000 единиц на литр).

Численность физиологических групп микроорганизмов выражалась в "активных числах", которые обозначали сумму численностей данной группы микроорганизмов за вегетационный период. Впервые понятие "активное число" было применено В.Тошвером (1962).

Результаты определения количества фенольных соединений показывают (табл. I), что количество сиреневой и р-оксибензойной кислот осталось константным в утомленной и нормальной почвах яблоневых садов в течение всего вегетационного периода (сиреневой кислоты 60...90  $\mu$ г/100 г, р-оксибензойной кислоты 40...80  $\mu$ г/100 г). Содержание ванилиновой кислоты в исследованных почвах оказалось различным. Количество ванилиновой кислоты в утомленной почве было на 10...120  $\mu$ г/100 г выше, чем в нормальной почве. При этом в обеих почвах значительных сезонных колебаний содержания ванилиновой кислоты не наблюдалось. В обеих почвах концентрация флоретиновой кислоты была в августе и сентябре значительно выше, чем в мае и в июне. В утомленной почве количество флоретиновой кислоты было в течение всего вегетационного периода на 50...440  $\mu$ г/100

г выше, чем в нормальной почве. В течение вегетационного периода содержание фторидзина постепенно повышалось: в сентябре его концентрация была в 4...7 раз выше, чем в мае. В 1970 г. содержание фторидзина было в утомленной и нормальной почвах почти одинаковым. В 1971 и 1972 гг. содержание фторидзина было в большинстве случаев в утомленной почве на 50...800  $\mu$ г/100г ниже, чем в нормальной почве. Наибольшая разница была обнаружена в сентябре; в 1971 г. содержание фторидзина было на 630  $\mu$ г/100 г (29%) и в 1972 г. на 800  $\mu$ г/100 г (37%) ниже, чем в нормальной почве.

Следовательно, содержание сиреновой и р-гидроксibenзойной кислоты было в обеих исследованных почвах одинаковым, содержание флоретиновой и ванилиновой кислоты было в утомленной почве значительно выше, а содержание фторидзина ниже, чем в нормальной почве.

Микробиологические анализы показывают (табл. 2), что в утомленной почве активное число аммонификаторов было на 1...8 млн/г ниже, чем в нормальной почве. Наибольшая разница была обнаружена в 1972 г. В утомленной почве активное число денитрификаторов было на 300...500 тыс./г ниже, чем в нормальной почве. Активное число аэробных целлюлозоразлагающих бактерий (снабжающих остальные микробы энергетическим материалом) было в утомленной почве на 2...22 тыс./г ниже, чем в нормальной почве. Наибольшая разница была обнаружена в 1970 г. (22 тыс.). Активное число *Cl. pasteurianum* было в утомленной почве на 4...15 тыс./г, а активное число азотобактера на 3...8 тыс./г ниже, чем в нормальной почве. Зато активное число нитрификаторов было в утомленной почве от 6000 тыс. до 2 млн. на 1 г почвы выше, чем в нормальной почве. Активность грибного процесса была также в утомленной почве значительно выше, чем в нормальной почве. Активность грибного процесса была в утомленной почве в 1971 г. на 70 %, в 1972 г. на 124% и в 1970 г. на 31% выше, чем в нормальной почве.

Полученные результаты позволяют утверждать, что численность бактерий, участвующих в круговороте азота (кроме нитрифицирующих), была в утомленной почве ниже, чем в нормальной почве. Такое соотношение физиологических групп бактерий, очевидно, приводит к быстрому окислению восстановленных форм азота и к потерям азота в процессе денитрификации.

Это в свою очередь может ухудшать снабжение растений азотом. Низкая численность целлюлозоразлагающих бактерий также могла неблагоприятно воздействовать на круговорот азота из-за недостатка энергетических субстратов.

Явный параллелизм наблюдается между уровнем развития бактериальной микрофлоры и ростом (а также развитием) яблонь. В садах с утомленной почвой деревья почти на I и ниже, наблюдается чрезмерное разветвление яблонь и низкие урожаи. Высокая численность органофобных нитрификаторов в утомленной почве, очевидно, связана с меньшим количеством выделений корней относительно плохо развитых яблонь.

В утомленной почве яблоневых садов, очевидно из-за высокой активности грибного процесса, содержание флоридзина ниже, а количество продукта его распада — флоретиновой кислоты — выше, чем в нормальной почве. Особенно наглядно это выражается в сентябре: в нормальной почве содержание флоридзина максимальное, а активность грибного процесса низкая. Повышение концентрации флоридзина в нормальной почве, по всей вероятности, вызвано интенсивным ростом корней в августе и сентябре (Мооритс, 1967), когда доля флоридзина в выделениях корней повышается.

Следовательно, изученные нами фенольные соединения не могут быть непосредственной причиной почвоутомления, так как содержание флоридзина было в утомленной почве ниже, а количество сиреновой и *p*-гидроксибензойной кислот такое же, как в нормальной почве. Концентрации фенольных соединений, ингибирующих рост яблонь (Берестецкий, 1969; Саралуу, 1971) от 10 до 100 раз превышают количества фенольных соединений, наблюдавшихся в наших опытах, поэтому более высокое содержание флоретиновой и ванилиновой кислот в утомленной почве, по-видимому, не действует ингибирующе на рост яблонь.

Роль фенольных соединений в почвоутомлении, вероятно, состоит в отборе микрофлоры: в ризосфере яблонь повышается численность почвенных грибов.

Таблица I

Содержание фенольных соединений в почвах (мг/100 г)

Показатель	Месяц	Почва яблоняного сада					
		Нормальная			Утомленная		
		1970	1971	1972	1970	1971	1972
Сиреневая кислота	Май	70	80	90	80	80	90
	Июнь	60	80	80	60	70	90
	Август	60	60	90	80	70	80
	Сентябрь	80	90	80	80	70	70
Ванилино- вая кислота	Май	80	50	80	120	60	130
	Июнь	70	50	90	100	70	90
	Август	40	60	50	130	50	110
	Сентябрь	10	40	50	130	90	110
р-гидро- ксибен- зойная кислота	Май	50	40	70	70	50	60
	Июнь	40	50	80	60	50	70
	Август	60	60	60	50	40	50
	Сентябрь	60	80	70	40	20	50
Флорети- новая кислота	Май	200	770	570	340	900	680
	Июнь	310	560	550	310	700	830
	Август	490	630	740	540	810	1050
	Сентябрь	510	800	930	620	1240	1310
Флоридзин	Май	200	500	420	210	310	370
	Июнь	290	360	590	320	230	520
	Июль	550	580	720	510	450	610
	Август	820	690	1470	830	970	1020
	Сентябрь	1530	2210	2190	1480	1580	1390

Таблица 2

Активные числа физиологических групп  
почвенных микробов

Группа	Год	Почва яблоневого сада	
		Нормальная	Утомленная
Аммонификаторы, $10^6/г$	1970	16	14
	1971	10	9
	1972	19	11
Денитрификаторы, $10^5/г$	1970	9	5
	1971	12	9
	1972	15	10
Нитрификаторы, $10^5/г$	1970	20	30
	1971	6	12
	1972	17	28
Аэробные целлюлозо- разлагающие бактерии, $10^3/г$	1970	38	16
	1971	12	10
	1972	26	14
Грибы, $10^4/г$	1970	29	38
	1971	53	99
	1972	37	83
<i>Cl. pasteurianum</i> , $10^3/г$	1970	11	7
	1971	22	7
	1972	19	10
Азотобактер, $10/г$	1970	13	5
	1971	5	2
	1972	11	5

## Л и т е р а т у р а

- Бардинская Н.С., Шуберт Г.А., Прусакова Л.Д. О регуляторах роста полифенольной природы. Докл. АН СССР, 1962. Том II2, № I, с. 222.
- Берестецкий О.А. Об изменении почвенной микрофлоры плодовыми растениями в связи с токсичностью садовых почв. - В сб.: Материалы I-го межвузовского научного совещания по вопросам агрофитоценологии. Казань, 1969, с. 36I.
- Вийлеберг Л.И. О сезонной динамике микробов, участвующих в круговороте азота, в связи с почвоутомлением в яблоневых садах. - В сб.: Экология и физиолого-биохимические основы микробиологического превращения азота. Тарту, 1972, с. 38I.
- Гайдамак В.М., Кушнир Г.П. Аллелопатическое "загрязнение" гидропонных субстратов. - В сб.: Тезисы докладов 2-го всесоюзного симпозиума по физиолого-биохимическим основам формирования растительных сообществ. Киев, 1967, с. 436.
- Мийдла Х.И. Флоридзин в качестве фактора почвоутомления в плодовых садах. - "Агрохимия", 1965, № 9, с. 109.
- Мийдла Х.И. Оксисбензойные кислоты в различных органах яблони в зависимости от условий питания. - "Физиология и биохимия культурных растений"; т. 4, вып. 2, с. 168-170.
- Мооритс Н.А. О характеристике некоторых подвоев яблони в условиях Эстонской ССР. Автореферат канд. биол. наук. Тарту, 1967, с. 29.
- Плотникова И.В., Рункова Л.В., Уголик М.А. Влияние полифенолов на рост coleoptилей пшеничношвейного гибрида № I. "Бюллетень Гл. ботан. сада АН СССР", 1967, № 64, с. 7I.

- Сарацун Л.П. Физиологическая роль и метаболизм флоридзина в яблоне. Диссертация докт. биол.наук. Тарту, 1971.
- Товерс Г.Х.Н. Метаболизм фенолов в высших растениях и микроорганизмах. В сб.: Биохимия фенольных соединений. М., 1968, с. 416.
- Тохвер В. Изменения свойств торфоаммоничных удобрительных смесей разного состава в период их выдерживания. Динамика жизнедеятельности микроорганизмов. М., Изв. АН СССР, сер. биол., №11, с. 3.
- Харборн Дж.Б. Биохимия фенольных соединений. М., 1968, с. 384.
- Börner, H. Experimentelle Untersuchungen über die Bodenmüdigkeit beim Apfel (*Pirus malus* L.) Beiträge zur Biologie der pflanzen. 1961. B. 36, H. 1, S. 97.
- Jayasankar, N.P., Bhat, I.V. Isolation and properties of catechol cheaving yeasts from Soil rets. Antonie van Leuwenhoek. J. Microbiol. and Serol. 1966. Vol. 32, No 2, pp. 125-134.
- Jürgens, G. Untersuchungen über den Phlorizingehalt von Apfelsämlingen bei Mangel an mineralischen Nährstoffen unter Berücksichtigung des Bodenmüdigkeitsproblems beim Apfel. Pflanzenpathologie. 1967. B. 74, H. 1, S. 17-33.
- Miida, H. Über das Vorkommen die Veränderungen aromatischer Aldehyde der C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> -Reiche im Xylem des Apfelbaumtriebes. Flora. 1967. H.158. S. 119.
- Villeberg, L. On the Development of Soil Microbes Involved in the Nitrogen Cycle in Connection with Soil Fatigue. Academy of Sciences of the Estonian S.S.R. Estonian Committee for IBP pp. nitrogen supply for plant growth. Tartu. 1973. Sp. 174.
- Weigel, J. Die Wirkung Phlorizian auf die Aktive Ionenaufnahme durch Maiswurzeln. Naturwissenschaften. 1965. B. 51, H. 14, S. 340-341.

UPON THE NUMBERS OF MICRO-ORGANISMS  
IN APPLE-ORCHARD SOIL IN CONNEXION WITH  
THE CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS

L. VILLEBERG

Summary

In the years of investigation (1969...1972) the numbers of bacteria participating in the nitrogen cycle were lower in fatigued than in normal unfatigued soils of apple-orchards (the only exception - the nitrifiers). On the contrary, the activity of fungal processus was lower in normal soils. At the same time in the fatigued soil the content of phlorizin was lower than in normal soil, the content of syringic and p-hydroxybenzoic acids was equal in both soils, and only the content of phloretinic and vanillic acids was higher in fatigued soils. Moreover, it must be underlined that in all cases the concentrations of the phenolic compounds under investigation were some 10...100 times lower than the minimum concentrations exerting an inhibiting influence upon the roots of apple-trees. It may be concluded that the soil phenolic compounds are not the inhibitors of the growth of apple-trees in normal or in fatigued soils. The significance of the phenolic compounds of the soils of the apple-orchards may well lie in the selective influence upon the soil microflora (in fatigued soils the relative importance of fungi rises among the micro-organisms of the rhizosphere).

## ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ЯБЛОНИ НА ПОЧВЕННУЮ МИКРОФЛОРУ И НА РОСТ РАСТЕНИЙ

Л. Вийлеберг, К. Петерсон

В зависимости от экстрагента в экстрактах яблони обнаруживаются различные соединения с низким молекулярным весом: углеводы, пигменты, фенольные соединения и др. По литературным данным особое значение имеют фенольные соединения, которые влияют на физиолого-биохимические процессы растений (синтез белка и фотосинтез) и на жизнедеятельность микробов. Из органов яблони изолировано много фенольных соединений, которые относятся к  $C_6-C_1$ ,  $C_6-C_3$  и  $C_6-C_1-C_6$  группам (Wagner, 1961; Мийдла, 1965а). Среди представителей рода *Malus* флоридзии является специфическим фенольным соединением, он найден в листьях, побегах и корнях (Middla, 1967; Берестецкий, Мороз, 1968). Содержание фенольных соединений может достигать в корнях 0,4...0,68%, в листьях - 4% от сухого веса (Мороз, 1968).

Фенольные соединения попадают в почву в основном в виде выделения корней и при их разложении. При выкорчевывании старых яблонь в почве остается до 70...90% корней. Флоридзии и продукты его распада (флороглюцин, р-гидроксибензойная кислота, флоретин, флоретиновая кислота и флорин) ингибируют рост и развитие молодых яблонь, посаженных в ту же почву (Берестецкий, 1969, 1970). В ризосфере яблони токсичность почвы 1,5...3 раза выше, чем в остальных частях садовых почв (Берестецкий, 1967).

Многие исследователи считают фенольные соединения основной причиной почвоутомления (Мийдла, 1965б, Сарапуу, 1965, Берестецкий, 1968. Мороз, 1968).

Добавление в почву размельченной коры и древесины яблони вызывает в 48...63% случаев подавление роста яблони. Особенно сильно действуют экстракты корней. Экстракты коры в концентрации 1 : 1000 подавляют рост корней яблони (Мороз, 1967, 1968). По данным некоторых авторов, дериваты флоридзии на более токсичны, чем флоридзин. Раствор флоридзина в концентрации 0,1% значительно ингибирует рост корней всходов, но

не влияет на рост стебля; 0,1% растворы флороглюцина и р-гидроксибензойной кислоты вызывают полное уничтожение корневой системы и полностью ингибируют рост стебля (Мороз, 1968). Кроме фенольных соединений, листья содержат и другие неидентифицированные токсичные соединения.

Остатки корней и флоридзин разлагаются микроорганизмами (Мийда, 1965, Минустин, Ерофеев, 1966, *Mayaudon, Batiatic*, 1970). Фенольные соединения разлагаются в основном почвенными грибами и бактериями, использующими фенольные соединения в качестве источника углерода (Запрометов, 1966, Берестецкий, 1970).

Флоридзин и продукты его распада поддерживают рост микробов, продуцирующих токсичные соединения (грибы - *Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Trichoderma*, бактерии - *Bacillus*) - (Красильников, 1958, Степанова, 1963).

Эти почвенные грибы составляют основную часть микрофлоры утомленных почв, они подавляют рост полезной для растений микрофлоры и вместе с тем рост и развитие яблонь (Ирчиник, 1957).

Целью настоящей работы явилось выяснение влияния экстрактов листьев и корней, а также комплекса фенольных соединений корней на численность почвенных грибов и аммонификаторов и на рост яблоневых всходов.

В вегетационных опытах применяли почвы яблоневых питомников, одна из них являлась нормальной, другая - утомленной (Вийлеберг и др., 1973).

Почвы брались из яблоневых питомников Вазулаского совхоза, Тартуского района, один из них был заложен в 1969 г. на участке, где раньше выращивались зерновые культуры (нормальная почва), другой - в 1965 г. повторно на площади старого сада (утомленная почва). В питомниках с нормальной почвой деревья развивались нормально (высота деревьев 1,0...1,5 м), в питомнике с утомленной почвой яблоня развивалась медленно (высота 0,5 м).

Требуемое количество почвы бралось в объеме кроны яблоня на глубине 0...40 см, просеивалось через сито, определялись водоемкость и численность аммонификаторов и почвенных грибов.

Вегетационные опыты начались в июне 1972 г. В цветочные горшки с 3,5 кг почвы были посеяны предварительно

стратифицированные семена яблони ("Антоновка"). Горшки находились в оранжерее, влажность почвы поддерживалась на постоянном уровне (60% от общей водоемкости).

Вегетационный опыт состоял из 5 вариантов (каждый вариант повторялся 4 раза):

- I - нормальная почва;
- II - нормальная почва с комплексом фенольных соединений корней (I г/кг сырой почвы);
- III - нормальная почва с экстрактами листьев и корней (100 мл экстракта листьев и 50 мл экстракта корней на I кг сухой почвы);
- IV - утомленная почва;
- V - утомленная почва с комплексом фенольных соединений корней (I г/кг сырой почвы).

Выделение комплекса фенольных соединений из корней яблони производилось по описанной в литературе методике (Hutchinson et al., 1959), модифицированной на кафедре физиологии и биохимии растений ТГУ.

Мелкие корни и кора толстых корней были разрушены в электрической мельнице в присутствии жидкого азота. Фенольные соединения экстрагировали при 60°C 80% этанолом. Центрифугированием из экстракта были выделены твердые частицы, экстракт доводился до 1/3 объема в вакууме и остальную часть выделяли при помощи вентилятора. Осадок был растворен в теплой воде и отфильтрован. Охлажденный фильтрат экстрагировали несколько раз этилацетатом (для изолирования фенольных соединений от водорастворимых пигментов, углеводов и других гидрофильных веществ). Коричневый кристаллический комплекс фенольных соединений содержал флавонолы, флоретин, флоридзин и др. фенольные соединения.

Для приготовления экстракта применялись свежие листья, мелкие корни и кора толстых корней. К разрушенному материалу была добавлена дистиллированная вода (1 : 10), все смешивалось и нагревалось при 60...70°C 25 минут. Экстракт фильтровали, а фильтрат автоклавировали.

В вегетационных опытах к нормальной почве добавляли (через каждые две недели) 100 мл экстракта листьев и 50 мл экстракта корней на I кг сухой почвы.

## Микробиологические анализы

Численность аммонификаторов определяли (3 параллельных опыта) на МПА (1-мл высев из четвертого почвенного разведения). Число колоний определяли на 3-ий, 4-ый и 5-ый дни.

Численность почвенных грибов определяли на агаре с пивным суслон (3°), со стрептомицином (625000 международных единиц на 1 л среды). Высевали 0,1 мл из 2...4 почвенного разведения (3 параллельных опыта). Число колоний определяли на 3-ий и 4-ый дни.

Таблица I

Численность аммонификаторов ( $10^6$ /г)  
и почвенных грибов ( $10^4$ /г) в 1 г сухой почвы

Время анализа	Группа микробов	Варианты				
		I	II	III	IV	V
<b>Июль</b>						
I декада	Аммонификаторы	2	2	2	I	I
	Грибы	6	6	6	9	9
III декада	Аммонификаторы	2	3	7	2	3
	Грибы	7	49	10	11	55
<b>Август</b>						
I декада	Аммонификаторы	5	14	10	3	13
	Грибы	14	42	32	15	46
III декада	Аммонификаторы	4	21	63	3	14
	Грибы	14	110	37	29	120
	Активное число аммонификаторов	13	40	82	9	31
	Активное число грибов	41	207	85	64	230

I - нормальная почва;

II - нормальная почва с комплексом фенольных соединений корней;

III - нормальная почва с экстрактом листьев и корней;

IV - утомленная почва;

V - утомленная почва с комплексом фенольных соединений корней.

Таблица 2

Прорастание и рост всходов яблони

Показатель	Варианты				
	I	II	III	IV	V
Число прорастающих растений	14	6	7	2	0
Прорастание %	70	30	35	10	0
Средняя высота растений в мм (57 день)	53	26	39	16	0

I - нормальная почва;

II - нормальная почва с комплексом фенольных соединений корней;

III - нормальная почва с экстрактом листьев и корней;

IV - утомленная почва;

V - утомленная почва с комплексом фенольных соединений корней.

Примененная в вегетационных опытах нормальная почва питомника по микробиологическим показателям значительно отличалась от утомленной почвы питомника (табл. I). В начале опыта нормальная почва содержала вдвое больше аммонификаторов и на одну треть меньше почвенных грибов, чем утомленная почва.

Проведенные через две недели (III декада июля) микробиологические анализы показали, что во всех исследованных почвах (кроме нормальной), численность аммонификаторов и грибов возрастала. Наибольшими оказались изменения в почвах с добавленными экстрактами яблони. В нормальной почве численность аммонификаторов не изменилась, численность грибов возросла незначительно (16%). В утомленной почве в течение двух недель численность аммонификаторов возросла в два раза, а численность грибов возросла на 22%. Добавление в нормальную почву комплекса фенольных соединений корней вызвало 1,5-кратное повышение численности аммонификаторов и 8-кратное повышение численности грибов. В нормальной почве с экстрактами

листьев и корней численность аммонификаторов возросла почти в 4 раза, численность грибов - почти в 2 раза. В утомленной почве с компонентом фенольных соединений корней численность аммонификаторов возросла в 3 раза, а численность грибов - в 6 раз.

К первой декаде августа численность исследованных групп микробов возросла: в нормальной почве численность аммонификаторов в 3 раза, численность грибов - в 2 раза; в утомленной почве также, соответственно в 3 и в 2 раза. В нормальной почве с комплексом фенольных соединений корней численность аммонификаторов и грибов возросла в 7 раз. В нормальной почве с экстрактами листьев и корней численность аммонификаторов и грибов была в 5 раз выше, чем в начале опыта. В утомленной почве с комплексом фенольных соединений корней численность аммонификаторов и грибов возросла соответственно в I3 и 5 раз.

Данные микробиологического анализа показывают, что к III декаде августа прирост аммонификаторов и грибов прекратился. В нормальной почве с комплексом фенольных соединений корней и в нормальной почве с экстрактами листьев и корней численность аммонификаторов возросла по сравнению с численностью I декады августа в I,5 и 6 раз, а по сравнению с численностью в начале опыта - соответственно в II и 32 раза. В утомленной почве с комплексом фенольных соединений корней численность аммонификаторов возросла по сравнению с I декадой августа незначительно ( $I \cdot 10^6$ /г) и по сравнению с началом опыта - в I4 раз. В нормальной почве численность грибов не возросла, а в утомленной почве увеличилась по сравнению с I декадой августа в 2 раза и по сравнению с началом опыта в 3 раза. В нормальной почве с комплексом фенольных соединений корней численность грибов возросла по сравнению с I декадой августа в 3 раза и по сравнению с началом опыта - в I8 раз. В нормальной почве с экстрактами листьев и корней численность грибов возросла по сравнению с I декадой августа на I6% и по сравнению с исходной численностью в 6 раз; в утомленной почве с комплексом фенольных соединений корней соответственно в 3 и в I3 раз.

Сравнение активных чисел аммонификаторов показывает, что меньше всего аммонификаторов обитает в утомленной почве (9) и в нормальной почве (I3). В нормальной почве с комп-

лексом фенольных соединений корней и с экстрактами листьев и корней активные числа аммонификаторов были в 3 и 6 раз выше, чем в нормальной почве. В утомленной почве с комплексом фенольных соединений корней активное число аммонификаторов было в 2 раза выше, чем в нормальной почве и в 3 раза выше, чем в утомленной почве.

Активное число грибов оказалось низким в нормальной почве (41), в утомленной и в нормальной почвах с экстрактами листьев и корней активные числа оказались большими (64 и 85).

Наивысшим оказалось активное число грибов в почвах с комплексом фенольных соединений корней (в нормальной почве - 207, в утомленной почве - 230). Доля грибов была наибольшей в вариантах опыта с утомленной почвой и в нормальной почве с комплексом фенольных соединений корней: отношение активных чисел аммонификаторов и грибов соответственно 1:0,07 и 1:0,05. В нормальной почве и в нормальной почве с экстрактами листьев и корней доля грибов оказалась меньшей (отношение активных чисел аммонификаторов и грибов 1:0,03 и 1:0,01).

Основываясь на суммарных данных активности микробов можно заключить, что численность грибов увеличивается под влиянием экстрактов яблоневых тканей в 2...5 раз в случае нормальной и в 4 раза в случае утомленной почвы. Для аммонифицирующих бактерий соответствующие показатели 3...6 и 3. При этом в утомленной почве без прибавки экстрактов тканей грибов в 1,5 раза больше и аммонифицирующих бактерий почти в 2 раза меньше, чем в контрольной нормальной почве. По-видимому, при применении экстрактов следует учитывать не только влияние ингибирующих веществ, но и наличие легко усваиваемых сахаров и др. соединений, в особенности у бактерий. Добавление экстракта листьев и корней и комплекса фенольных соединений корней вызвало в микрофлоре нормальной почвы более значительные изменения, чем в микрофлоре утомленной почвы.

В нормальной почве всходы яблони прорастали на 7 и 8 день (процент прорастания - 70). В нормальной почве с комплексом фенольных соединений корней и с экстрактами листьев и корней всходы прорастали на 2...5 дней позже, чем в нормальной почве и процент прорастания равнялся 30...35 (43...50% от процента прорастания в нормальной почве). Меньше всего семян проросло в утомленной почве: процент прорастания 10 (14% от процента всхожести в нормальной почве). В

утомленной почве с комплексом фенольных соединений корней яблони не прорастали.

Средняя длина всходов в конце опыта (57 день) была в нормальной почве 53 мм. В нормальной почве с комплексом фенольных соединений корней средняя длина всходов была на 50%, в нормальной почве с экстрактами листьев и корней на 27% и в утомленной почве на 70% меньше, чем в нормальной почве.

Прорастание и рост всходов в вегетационных опытах подавляется фенольными соединениями. Добавление комплекса фенольных соединений корней сделало утомленную почву более токсичной для растений, чем нормальную почву.

Результаты вегетационных опытов подтверждают данные полевых опытов с нормальной и утомленной почвами яблоневых питомников (Вийлеберг и др., 1972). Добавление экстрактов яблони в почвы привело к увеличению доли почвенных грибов в микрофлоре. Почвенные грибы, способные использовать фенольные соединения в качестве источника углерода, очевидно, развиваются в присутствии фенольных соединений относительно лучше, чем многие бактерии. По литературным данным, среди почвенных грибов найдено немало ингибиторных. В присутствии углеводоов (попавших в почву с экстрактами яблони) численность последних, по-видимому, увеличивалась. Выделенные в почву токсины могли ингибировать развитие бактерий и растений. В вегетационных опытах ингибиторами могли служить и фенольные соединения, концентрация которых значительно превышала содержание фенольных соединений в природных условиях.

## Л и т е р а т у р а

Берестецкий О.А. Влияние плодовых растений на изменение микрофлоры почвы в связи с явлением почвоутомления. — В сб.: Межвуз. совещ. по вопр. агрофитоценологии. Казань, 1967, с. 62.

Берестецкий О.А. Токсичность черноземных почв под плодовыми насаждениями. В сб.: Научные основы рационального использования почв черноземной зоны СССР и пути повышения их плодородия. Кинешев, 1968, с. 241.

Берестецкий О.А. О роли продуктов распада корневых остатков в токсичности садовых почв. В сб.: Физиол.-биохим. основы растений в фитоценозах. Киев, 1970, с. 113.

Берестецкий О.А., Мороз П.А. Влияние некоторых факторов на содержание флоридзина в корнях и листьях яблони в связи с почвоутомлением. - "Агрохимия", 1968, № 6, с. 66.

Виллеберг Л., Тийвель Х., Мозес К. О сезонной динамике микробов, участвующих в круговороте азота, в связи с почвоутомлением в яблоневых садах. - В сб.: Экология и физиол.-биохим. основы микробиол. превращения азота. Тарту, 1972, с. 186.

Запрометов М.Н. Биохимия фенольных соединений. В сб.: Тезисы симп. по фенольным соединениям I4...I7 дек. 1966 г. М., 1966, с. 43.

Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М., 1958.

Мийдла Х.И. Флоридзин в качестве фактора почвоутомления в плодовых садах. - "Агрохимия", 1965 а, №9, с. 109.

Мийдла Х.И. Фенольные соединения в качестве фактора почвоутомления в плодовых садах. В сб.: Вторая биохим. конф. прибалт. респ. и Белорусской ССР. Рига, 1965 б, с. 145.

Мирчинк Т.Г. О грибах, обуславливающих токсичность дерново-подзолистой почвы различной степени окультуренности. - "Микробиология", 1957, т. 26, № 1, с. 78.

Мишустин Е.Н., Ерофеев Н.С. Природа токсических соединений разлагающейся в почве соломы. - "Микробиология", 1966, т. 35, № 1, с. 150.

Мороз П.А. О причине почвоутомления у яблони. В сб.: Междуз. совещ. по вопр. фитоценологии. Казань, 1967, с. 64.

- Мороз П.А. Аллелопатическая роль опавших листьев и корневых остатков яблони и персика. Киев, 1968.
- Сарапуу Л.П. Физиологическое действие флоридзина как ингибитора при росте и покое у яблони. - "Физиология растений", 1965, т. 12, № 1, с. 134.
- Степанова Л.Н. Бактерии - токсинообразователи как один из факторов токсичности дерново-подзолистых почв. В сб.: Микроорганизмы в сельском хозяйстве. М., 1963, с. 354.
- Börner, H. Experimentelle Untersuchungen über die Bodenmüdigkeit beim Apfel (*Pirus malus L.*). Beiträge zur Biologie der pflanzen, 1961, B. 36, H.1. S. 97.
- Hutchinson, A., Taper, C.D., Towers, G.H. Studies of Phlo-ridzin in *Malus*. J. Biochem, Phys., 1959, vol. 37, p. 901.
- Mavaudon, L., Batistic, L. Degradation biologique de la lignine  $^{14}C$  dans le sol. - Ann. Inst. Pasteur, 1970, v. 118, № 2, p. 191.
- Miida, H. Über das Vorkommen die Veränderungen aromatischer Aldehyde der  $C_6-C_1$  -Reiche im Xylem des Apfelbaumtriebas. - "Flora", 1967, H. 158, S. 119.
- Villeberg, L. On the Development of Soil Microbes Involved in the Nitrogen Cycle in Connection with Soil Fatigue. In: "Nitrogen Supply for Plant Growth", Tartu, 1973, p. 74.

UPON THE INFLUENCE OF THE EXTRACTIVE  
SUBSTANCES OF APPLE-TREES ON SOIL MICRO-  
FLORA AND THE GROWTH OF PLANTS

L. VILLEBERG, K. PETERSON

Summary

In the course of vegetation experiments in 1970...1972 the influence of apple-tree extractive substances upon the numbers of fungi and ammonifying bacteria was investigated. A rise of 3...6 times in the numbers of bacteria, and of 2...5 times in the numbers of fungi was observed if apple-tree extractive substances were added into soil. The effect was more significant when fatigued soils were employed. The germination and sprouting of apple-tree seeds were considerably inhibited under the influence of substances applied. The influence of root phenolic compound complex was of special significance when added into fatigued soils.

## ОБ ОТНОШЕНИЯХ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ В ПОЧВЕ ЯБЛОНЕВОГО САДА

Л. Вийлеберг, Э. Тикк

В утомленных почвах яблоневых садов отношение "бактерии:грибы" меньше, чем в нормальных почвах яблоневых садов (Берестецкий, 1967, Villeberg et al., 1972). Интенсивное развитие грибных организмов приводит к нарушению естественных количественных соотношений в микробных ценозах (Петренко, 1972). В утомленных почвах многие грибы являются синтетиками антибиотиков и таким образом активно влияют на развитие бактерий, грибов, риккетсий, вирусов и простейших (Егоров, 1965), а также на развитие высших растений (Павленко, 1967, Билай, 1973).

Среди почвенных грибов основные синтетики антибиотиков относятся к родам *Penicillium* (30%) и *Aspergillus* (22%) (Мирчинк, Бондаревская, 1970; Егоров, 1969). Из них *Pen. chrysogenum*, *Pen. claviforme*, *Pen. expansum*, *Pen. notatum*, *Pen. patulum*, *Asp. fumigatus*, *Asp. terreus* и *Asp. clavatus* синтезируют антибиотики в значительных количествах. К образованию антибиотиков способны также представители родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria* и др. (Мирчинк, 1957, 1963а).

Одни антибиотики подавляют развитие только незначительного числа видов, другие подавляют развитие многих видов микроорганизмов (Thrum, Bocker, 1971). Антибиотики могут влиять: 1) на синтез клеточной стенки, например, пенициллин угнетая биосинтез гликопептидов клеточной стенки, вызывает разрушение клетки при продолжении биосинтеза белков в цитоплазме (Сазыкин, 1968, Альберт, 1971); 2) на биосинтез белка, например, хлорамфеникол блокирует включение аминокислот в белки; 3) на биосинтез нуклеиновых кислот, например, миомидин С ингибирует биосинтез как РНК, так и ДНК (Альберт, 1971). Антибиотики могут ингибировать также гликолиз, образование цитоплазматических мембран и др. процессы (Коротяев, 1956, Егоров, 1969).

Детально изучено влияние антибиотиков на высшие растения. Выяснено, что антибиотики грибов вызывают изменения в

аминокислотном составе белков, в содержании общего и белкового азота (Образцова и др., 1961, Мирчинк, 1970), а также в содержании фосфора и углеводов в надземных органах растений (Самцевич, 1972).

В почве антибиотики адсорбируются на коллоидных частицах (Звягинцев, 1963), причем активность сохраняется у некоторых антибиотиков только незначительное время (2...3 дня). у других довольно долго (70...250 дней) - (Худякова, 1963). Сохранение активности значительно зависит от типа почвы.

Исходя из вышеуказанных литературных данных, представляло интерес идентифицировать в утомленной почве яблоневого сада частые виды почвенных грибов и изучать их отношение с тест-организмами (индикаторными бактериями).

Исследовали утомленную почву яблоневого сада Вазулацкого совхоза, Тартуского района Эст. ССР, откуда в 1972 г. изолировали частые виды почвенных грибов. Пробы почвы брали в объеме кроны яблони на глубине 2...40 см. Почвенные грибы изолировали методом размазывания поверхности. Грибы выращивали на агаровой питательной среде Чапека, на агаре с пивным сусликом и на желатиновой среде с пивным сусликом. Наблюдали за морфологией грибов и окрашиванием спор с разбавленным раствором йода (Gilman, 1950, Курсанов, 1956, Fiedler, 1973). Грибы идентифицировали в секторе микробиологии Института экспериментальной биологии АН ЭССР под руководством ст. н. сотр. М. Аксель.

Влияния идентифицированных нами грибов (*Penicillium janthinellum*, *Pen. spinulosum*, *Pen. chrysogenum*, *Pen. sp.* и *Aspergillus fumigatus*) на рост некоторых бактерий (*Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*) изучали штрих-тестом (перпендикулярные и радиальные штрихи) и методом диффузии антибиотика в агар (Асеева и др., 1966, Егоров, 1969). Для штрих-теста грибы выращивали в чашках Петри на агаре с пивным сусликом. Чашки выдерживали в термостате (26° С) в течение времени, достаточного для развития колоний грибов. После этого в чашки высевали радиально или перпендикулярно - индикаторные бактерии. Чашки выдерживали в термостате (30° С) в течение 24 часов. Метод диффузии в агар заключался в следующем: в чашки Петри на МПА высевали тест-бактерии и помещали вертикально в агаровую пластинку (на глубину 1 мм) 1-см стек-

лянные трубки. В каждую трубку вносили 0,1 мл фильтрата, полученного из 6-дневной культуры соответствующего вида почвенного гриба, выращенного в пивном сусле. Чашки выдерживали в течение 20 часов в холодильнике и после этого в течение 16...18 часов в термостате (30° С). Измеряли диаметры зон подавления роста.

Из утомленной почвы яблоневого сада изолировали 6 штаммов и идентифицировали 4 вида почвенных грибов: *Pen. janthinellum*, *Pen. spinulosum*, *Pen. chrysogenum* и *Asp. fumigatus*. Одну культуру, обозначаемую *Pen. sp.*, не удалось идентифицировать с нужной точностью.

Изолированные нами грибы относятся к родам, представители которых известны как основные синтетики антибиотиков (Егоров, 1969, Мирчик и Бондаревская, 1970). Обильный синтез антибиотиков характеризует два идентифицированные нами вида: *Pen. chrysogenum* и *Asp. fumigatus*.

Для лучшего понимания результатов опыта по влиянию почвенных грибов на тест-бактерии, сконструировали простую математическую модель, позволяющую проверять достоверность следующей нулевой гипотезы: "варьирование результатов опыта сопряжено с погрешностями опыта". Такая гипотеза приводит к статистическому несоответствию. Следовательно, достоверной оказывается альтернативная нулевая гипотеза: "во взаимных отношениях почвенных грибов и тест-бактерий существует видоспецифическая антагонистическая реакция (АР)". После статистической оценки АР предполагается, что АР существует во всяком случае между теми видами грибов и бактерий, у которых положительный признак антагонистической реакции (ПАР) встречается чаще всего. Далее предполагается, что результаты каждого конкретного опыта могут оказаться с вероятностью  $p$  положительным ПАР, а с вероятностью  $1-p$ , отрицательным ПАР.

В качестве статистического критерия использовали критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ) - (Fabian, 1968).

Следовательно, исходя из нулевой гипотезы, "изученные почвенные грибы не влияют на рост *Vac. cereus*" выявляется, что при числе степеней свободы  $f=5$ , вероятность эмпирических данных (штрих-тест) равняется практически нулю (0,005), так как  $d \{31,929 > 16,750\}$ . Таким образом, нулевая гипотеза отвергается; это значит, что изученные почвенные грибы значительно подавляют рост *Vac. cereus*.

Все аналогичные рассуждения представлены в таблицах I и 2.

Таблица I

Влияние почвенных грибов на тест-бактерии  
(методом штрих-теста)

Нулевая гипотеза	Вероятность результатов опыта при правильности нулевой гипотезы	Вывод	Достоверность вывода %
Влияние грибов А...Е на рост <i>Vac. cereus</i> отсутствует	$\mu\{d_1\} > 16,750\} < 0,005$	Грибы А...Е подавляют рост <i>Vac. cereus</i>	99,5
Влияние грибов А...Е на рост <i>Vac. subtilis</i> отсутствует	$\mu\{d_2\} > 16,750\} < 0,005$	Грибы А...Е подавляют рост <i>Vac. subtilis</i>	99,5
Влияние грибов А...Е на рост <i>Ser. marcescens</i> отсутствует	$\mu\{d_3\} > 15,086\} < 0,01$	Грибы А...Е не подавляют рост <i>Ser. marcescens</i>	99,0
Влияние грибов А...Е на рост <i>Ps. fluorescens</i> отсутствует	$\mu\{d_4\} > 16,750\} < 0,005$	Грибы А...Е подавляют рост <i>Ps. fluorescens</i>	99,5

- А - *Pen. janthinellum* I
- Б - *Pen. janthinellum* II
- В - *Pen. spinulosum*
- Г - *Pen. chrysogenum*
- Д - *Asp. fumigatus*
- Е - *Pen. sp.*

Таблица 2

Влияние почвенных грибов на тест-бактерии  
(метод диффузии в агар)

Нулевая гипотеза	Вероятность результатов опыта при правильности нулевой гипотезы	Вывод	Достоверность вывода %
Влияние грибов А...Е на рост <i>Vac. cereus</i> и <i>Vac. subtilis</i> отсутствует	$p\{d_1 > 16,750\} < 0,005$	Грибы А...Е подавляют рост <i>Vac. cereus</i> и <i>Vac. subtilis</i>	99,5
Влияние грибов А...Е на рост <i>Ser. marcescens</i> отсутствует	$p\{d_2 > 11,071\} < 0,05$	Грибы А...Е не подавляют рост <i>Ser. marcescens</i>	95
Влияние грибов А...Е на рост <i>Ps. fluorescens</i> отсутствует	$p\{d_3 > 11,071\} < 0,05$	Грибы А...Е не подавляют рост <i>Ps. fluorescens</i>	95

- А - *Pen. janthinellum* I  
 Б - *Pen. janthinellum* II  
 В - *Pen. spinulosum*  
 Г - *Pen. chrysogenum*  
 Д - *Asp. fumigatus*  
 Е - *Pen. sp.*

Статистический анализ результатов опыта (штрих-тест) показывает (табл. 1), что все изученные виды грибов подавляют рост *Vac. cereus*, *Vac. subtilis* и *Ps. fluorescens*. Рост *Ser. marcescens*, наоборот, не зависит от присутствия изученных грибов. Результаты опытов (применение диффузии антибиотика в агар) показывает (табл. 2), что все изученные виды грибов подавляют *Vac. cereus* и *Vac. subtilis*. Рост *Ser. marcescens* и *Ps. fluorescens* подавляется незначительно изученными видами грибных организмов. То, что результаты опытов с применением штрих-теста и метода диффузии антибиотика в агар несколько отличаются друг от друга, очевидно, связано с различной чувствительностью методов.

Результаты опытов показывают, что между изученными видами почвенных грибов (*Pen. janthinellum* I и II, *Pen. spinulosum*, *Pen. chrysogenum*, *Pen. sp.*, *Asp. fumigatus*) и тест-бактерий (*Vac. cereus*, *Vac. subtilis*, *Ps. fluorescens*) в лабораторных условиях существуют антагонистические взаимоотношения. Можно предполагать, что аналогичные взаимоотношения между почвенными грибами и бактериями существуют и в местах их естественного обитания.

Анализ результатов показывает, что *Asp. fumigatus* и *Pen. sp.* подавляют рост всех тест-бактерий. *Pen. chrysogenum* подавляет рост *Vac. cereus*, *Vac. subtilis* и *Ps. fluorescens*, но не влияет на рост *Ser. marcescens*. *Pen. spinulosum* и *Pen. janthinellum* II (но не *Pen. janthinellum* I) подавляют рост двух тест-бактерий — *Vac. cereus* и *Vac. subtilis* —, но не влияет на рост *Ser. marcescens* (в опытах с применением метода диффузии антибиотика в агар, также и на рост *Ps. fluorescens*).

Одной из причин низкой численности почвенных бактерий в утомленной почве яблоневое сада могут оказаться антибиотики, образовавшиеся из почвенных грибов и подавляющие рост почвенных бактерий. По литературным данным, активность антибиотиков сохраняется в почве довольно долго (Худякова, 1963) и концентрация их на коллоидных частицах почвы достаточно высока для того, чтобы подавлять рост различных почвенных микробов (Звягинцев, 1963). Рост бактерий в почве могут ингибировать, кроме изученных видов, и другие почвенные грибы, численность которых в почве, однако, незначительная.

## Л и т е р а т у р а

- Альберт Э. Избирательная токсичность. М., 1971, с. 432.
- Асеева И.В., Бабьева И.П., Звягинцев Д.Г. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. М., 1966.
- Билай В.И. Изучение токсинообразующих грибов. В сб.: Методы экспериментальной микологии. Киев, 1973, с.142...164.
- Берестецкий О.А. Влияние плодовых растений на изменение микрофлоры почвы в связи с явлением почвоутомления. В сб.: Межвуз. совещ. по вопросам агрофитоценологии. Казань, 1967, с. 62...63.
- Берестецкий О.А. Токсичность черноземных почв под плодовыми насаждениями. В сб.: Научные основы рационального использования почв черноземной зоны СССР и пути повышения их плодородия. Кишинев, 1968, с. 241...242.
- Вийдеберг Л., Тийвель Х., Мозес К. О сезонной динамике микробов, участвующих в круговороте азота, в связи с почвоутомлением в яблоневых садах. В сб.: Экология и физиолого-биохим. основы микробиол. превращения азота. Тарту, 1972, с. 186...190.
- Звягинцев Д.Г. Адсорбция микроорганизмов почвами и ее влияние на их активность. В сб.: Микроорганизмы в сельском хозяйстве. М., 1963, с. 277...298.
- Коротяев А.И. К механизму действия хлоромипетина. - "Микробиология", 1956, т. 25, № 4, с. 451...457.
- Курсанов Л.И. Микология. М., 1956, 480 с.
- Мирчинк Т.Г. О грибах, обуславливающих токсичность дерново-подзолистой почвы различной степени окультуренности. - "Микробиология", 1957, т. 24, № 1, с. 78...86.

- Мирчинк Т.Г. Распространение грибов-токсикообразователей в некоторых типах почв и образование токсинов в естественных условиях. В сб.: Микроорганизмы в сельском хозяйстве. М., 1963, с. 336...352.
- Мирчинк Т.Г., Бондаревская Ф.Г. Фитотоксины почвенных сапрофитных грибов. В сб.: Микроорганизмы в сельском хозяйстве. М., 1970, с. 312...323.
- Образцова А.А., Петренко М.Б., Клищевская М.С. Участие микроорганизмов ризосферы в питании и развитии сельскохозяйственных растений на мощном черноземе. В сб.: Микроорганизмы и эффективное плодородие почвы. М., 1961, с. 81...90.
- Павленко В.Ф. Взаимодействие растений с естественной и искусственно внесенной в почву микрофлорой. В сб.: I межвузовское совещание по вопросам агрофитоценологии. Казань, 1967, с. 60...61.
- Петренко М.Б. Влияние бессменного выращивания растений на микробиологические процессы в почве. В сб.: Экология и физиолого-биохимические основы микробиологического превращения азота. Тарту, 1972, с. 176...181.
- Сазыкин Ю.О. Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов. М., 1968, с. 448.
- Самцевич С.А. Взаимоотношения микроорганизмов почвы и высших растений. В сб.: Микроорганизмы почвы и растение. Минск, 1972, с. 3...68.
- Худякова Ю.А. Современные методы исследования почвенной и ризосферной микрофлоры. В сб.: Вопросы численности и продуктивности почвенных микроорганизмов. Л., 1972, с. 88...95.
- Егоров Н.С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М., 1965, 207 с.
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М., 1969, 478 с.

Fabian, V. Statistische Methoden. Berlin, 1968, S. 272-277.

Fiedler, H.J. Mikrobiologische Methoden. Dresden, 1973, Band  
2. S. 172.

Gilman, J.A. Manual of Soil Fungi. Iowa, 1950.

Thrum, H., Bocker, H. Antibiotika - woher, wofür? Leipzig-  
Jena-Berlin, 1971, S. 45-46.

UPON THE RELATIONS BETWEEN FUNGI AND  
BACTERIA IN THE SOIL OF APPLE-ORCHARDS

L. VILLEBERG, E. TIKK

Summary

Five strains of fungi, numerously represented in fatigued soils of apple-orchards, were isolated from such soils. Four of them were identified as *Penicillium janthinellum*, *P. chrysogenum*, *P. spinulosum* and *Aspergillus fumigatus*, the fifth could be determined as *Penicillium* sp. only. The strains inhibited the growth of the greater part of the test-objects (*B. cereus*, *B. subtilis*, *Ps. fluorescens*) in the conditions of laboratory cultivation. The authors postulate the possibility of analogical relations in soil conditions. Such relations may explain the low numbers of bacteria in fatigued soils.

## СОДЕРЖАНИЕ

В. Т о х в е р. К изучению почвенной денитрификации: специфичность агентов процесса .....	3
V. T o h v e r. Upon the Investigations of Soil Denitrification: Specificity of Agents of the Processus. Summary .....	17
В. Т о х в е р. Об энзимологических основах подхода к изучению почвенной денитрификации....	18
V. T o h v e r. Upon the Enzymology of Denitrification. Summary.....	44
А. Л а в и н г, А. Л а а з и м е р, В. Т о х в е р. Сравнительное исследование нитратредуктазных систем <i>Achromobacter agile</i> и <i>Pseudomonas denitrificans</i> .....	45
A. L a v i n g, A. L a a s i m e r, V. T o h v e r. A comparative Study in Nitrate Reductase Systems of <i>Achromobacter agile</i> and <i>Pseudomonas denitrificans</i> . Summary.....	65
Я. С и м и с к е р, Л. К у х л б е р г, Э. Р у л л. Использование глюкозы денитрифицирующей бактерией <i>Achromobacter agile</i> .....	66
J. S i m i s k e r, L. K u h l b e r g, E. R u l l. Upon the Utilization of Glucose and Nitrate by <i>Achromobacter agile</i> . Summary .....	73
В. Т о х в е р. О круглогодичной количественной динамике почвенных сапрофитных бактерий, в частности денитрификаторов .....	74
V. T o h v e r. Upon the Year Round Quantitative Dynamics of Soil Saphrophytic Bacteria, Especially of the Denitrifiers. Summary.....	83

В. Т о х в е р. Изменение денитрификационных способностей почв при их окультуривании .....	84
V. T o h v e r. The Changes in Denitrification Abilities of Soil when Being Cultivated. Summary .....	98
В. Т о х в е р. Влияние вегетации на денитрификационные показатели почв. ....	99
V. T o h v e r. The Influence of Vegetation upon the Denitrification Indicators of Soils. Summary.....	118
Л. В и й л е б е р г. Зависимость численности микроорганизмов от содержания фенольных соединений в почвах яблоневых садов.....	119
L. V i i l e b e r g. Upon the Numbers of Microorganisms in Apple-Orchard Soil in Connexion with the Content of Phenolic Compounds. Summary.....	127
Л. В и й л е б е р г, К. П е т е р с о н. Влияние экстрактов яблони на почвенную микрофлору и на рост растений .....	128
L. V i i l e b e r g, K. P e t e r s o n. Upon the Influence of the Extractive Substances of Apple-trees on Soil Microflora and the Growth of Plants. Summary.....	138
Л. В и й л е б е р г, Я. Т и к к. Об отношениях грибов и бактерий в почвах яблоневого сада.	139
L. V i i l e b e r g, E. T i k k. Upon the Relations between Fungi and Bacteria in the Soil of Apple-Orchards. Summary.....	148

К изучению почвенной денитрификации: специфичность агентов процесса. Тохвер В. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 3 - 16 с. (русс.).

На основе анализа литературных и собственных оригинальных данных сделано заключение, что денитрификаторы почвы не представляют собой специфической, четко разграниченной физиологической группы микробов. В зависимости от конкретных условий, большинство почвенных сапрофитов может перейти на нитратное дыхание. По легкости переключения на этот тип энергообмена в природе имеется целая градация. "Физиологическую группу" денитрификаторов нельзя сравнивать с действительно специализированными группами микробов.

Табл. - 3. Библ. - 45 назв.

Об энзимологических основах подхода к изучению почвенной денитрификации. Тохвер В. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 18 - 43 с. (русс.).

Дается литературный обзор по проблеме существования в денитрификаторах флавопротениной и цитохромной энзимных систем восстановления нитратов. Приводятся оригинальные данные по этому вопросу по *Achromobacter agile* и *Pseudomonas denitrificans*. При помощи мутантного анализа доказывается самостоятельность рассматриваемых систем. Характеризуются видовые различия в изученных культурах.

Табл. - I. Библ. - 87 назв.

Сравнительное исследование нитратредуктазных систем *Achromobacter agile* и *Pseudomonas denitrificans*. Лавинг А., Лаазмер А. и Тохвер В. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 45-64 с. (русс.).

Экспериментальные данные показывают, что дикие штаммы *Achromobacter agile* и *Pseudomonas denitrificans* характеризуют наличие двух нитратредуктаз. Активность нитратредуктазных систем в различной мере подчиняется влиянию кислорода: кислород подавляет активность цитохромной системы и даже повышает активность флавопротеидной системы. В бесклеточных экстрактах наученных денитрификаторов обнаружен при совместном влиянии кислорода и нитрата аддитивный эффект. Физиологические функции нитратредуктазных систем мало дифференцированы: флавопротеидная система, кроме ассимиляторной, может выполнять и диссимиляторную функцию.

Рис. - 5. Табл. - 6. Библ. - 19 назв.

Использование глюкозы денитрифицирующей бактерией *Achromobacter agile*. Смирский Я., Кухлберг Л. и Рудя Э. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 66-72 с. (русск.).

Исследовали усвоение глюкозы и нитрата растущими культурами и суспензиями клеток *Achromobacter agile*. Установили, что в анаэробных условиях в присутствии нитрата использование глюкозы растущими культурами происходит без заметного образования продуктов неполного окисления глюкозы. Фторацетат в концентрации  $5,5 \cdot 10^{-3}$  М подавляет использование глюкозы и нитрата как в растущих культурах, так и в суспензиях клеток. Предполагается, что в окислении глюкозы и в восстановлении нитрата у *Achromobacter agile* участвуют реакции цитратного цикла.

Рис. - 3. Библ. - 5 назв.

О круглогодичной количественной динамике почвенных сапрофитных бактерий, в частности денитрификаторов. Тохвер В. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 74-82 с. (русс.).

При замерзании почвы численность интактных бактериальных клеток в ней резко снижается. Одновременно появляются в большом количестве различные карликовые формы, напоминающие фрагменты клеток. Часть этих форм сохраняет способность к регенерации в целые клетки. Установлено, что традиционные методы количественного анализа почвенных бактерий непригодны для изучения количественного содержания микробов в почве. Предлагается редуцировать количественные данные при сравнении почв с различным содержанием воды не на 1 г сухой почвы, а на 1 см<sup>3</sup> сырой почвы.

Табл. - 2. Библ. - 6 назв.

Изменение денитрификационных способностей почв при их окультуривании. Тохвер В. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 84-97 с. (русс.).

Численность денитрификаторов возрастает в результате окультуривания различных лесных почв тем больше, чем беднее исходная почва по содержанию питательных элементов и чем хуже ее физическое состояние. При окультуривании же богатых почв с хорошими исходными свойствами подъем в численности денитрификаторов незначителен. Окультуривание почвы приводит к повышению их потенциальной активности нитратовосстановления до газообразных продуктов.

Рис. - 3. Табл. - 3. Библ. - 17 назв.

Влияние вегетации на денитрификационные показатели почв. Тохвер В. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 99 - 117 с. (русс.).

В почве под растениями наблюдается характерная количественная динамика сапрофитных бактерий, в том числе денитрификаторов. На участках, выдерживаемых в безрастительном состоянии, такой динамики не обнаруживают. В периоды активного вегетативного роста растений численность сапрофитных бактерий значительно снижается в горизонтах расположения корневой системы растений. Денитрификационные потери азота находятся в обратной зависимости от интенсивности роста растений. В денитрифицирующей бактериофлоре обнаружены изменения количественного и качественного характера в зависимости от растительных сообществ даже в одном и том же типе почвы.

Рис. - 4. Табл. - 5. Библ. - 22 назв.

Зависимость численности микроорганизмов от содержания фенольных соединений в почвах яблоневых садов. Вийлеберг Л. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 119-126 с. (русс.).

Роль фенольных соединений (сиреневой кислоты, ванилиновой кислоты, р-гидроксibenзойной кислоты, флоретиновой кислоты, флоризина) в почвоутомлении, видимо, состоит в отборе микрофлоры: в ризосфере яблоней повышается численность почвенных грибов.

Изученные фенольные соединения не могут быть непосредственной причиной почвоутомления, потому что концентрации, ингибирующие рост яблонь, от 10 до 100 раз превышает количества фенольных соединений, наблюдавшихся в наших опытах.

Табл. - 2. Библ. - 18 назв.

Влияние экстрактов яблони на почвенную микрофлору и на рост растений. Вийлеберг Л. и Петерсон К. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 128 - 137 с. (русс.).

Добавление экстрактов яблони (комплекса фенольных соединений корней, экстракта листьев и корней) в почву привело к увеличению доли почвенных грибов в микрофлоре. Среди почвенных грибов найдено немало ингибиторных грибов.

Прорастание и рост всходов в вегетационных опытах подавляется фенольными соединениями. Добавление комплекса фенольных соединений корней сделало утомленную почву более токсичной для растений, чем нормальную почву.

Табл. - 2. Библ. - 20 назв.

Об отношениях грибов и бактерий в почве яблоневого сада. Вийлеберг Л., Тикк Э. Ученые записки Тартуского гос. ун-та, вып. 352. Труды по микробиологии. II. Вопросы денитрификации и почвоутомления. Тарту, 1974, 139-147 с. (русс.).

Из утомленной почвы яблоневого сада изолировали 5 и идентифицировали 4 вида почвенных грибов: *Pen. janthinellus*, *Pen. chrysogenus*, *Pen. spinulosum*, *Pen. sp.* и *Asp. fumigatus*. Методами штрих-теста и диффузии антибиотика в агар обнаружено, что в лабораторных условиях изолированные виды почвенных грибов подавляют рост большинства видов тест-бактерий (*Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, *Ps. fluorescens*). Можно предполагать, что аналогичные взаимоотношения между изученными грибами и бактериями существуют и в природных условиях. Следовательно, одной из причин низкой численности почвенных бактерий в утомленной почве яблоневого сада является влияние на них антибиотиков, синтезируемых почвенными грибами.

Табл. - 2. Библ. - 24 назв.