

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕСИМБИОТИЧЕСКОЙ АЗОТФИКСАЦИИ В РИЗОСФЕРЕ РИСА АЦЕТИЛЕНОВЫМ МЕТОДОМ

Ж. П. Баландро, И. Р. Доммерг, М. М. Умаров

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;
Центр биологического почвоведения, Нанси, Франция

Известно, что даже в отсутствие минеральных и органических удобрений поливной рис (*Oriza sativa*) может давать удовлетворительные урожаи в течение многих лет. Источником азота для растений являются при этом продукты, аккумулируемые несимбиотическими почвенными и водными азотфиксирующими микроорганизмами (Мишустин, 1972; Becking, 1974; Yoshida, 1970), которые можно разделить на три группы: 1) свободноживущие фотосинтезирующие микроорганизмы — синезеленые водоросли и фотосинтезирующие бактерии (Штина, 1971; Chopra, Dube, 1971; Watanabe, Yamamoto, 1971); 2) симбиотические синезеленые водоросли, такие как *Anabaena*, растущая в симбиозе с различными видами *Azolla* (Becking, 1974; Moore, 1969); 3) гетеротрофные бактерии, обитающие в ризосфере риса.

В настоящем сообщении будут рассмотрены некоторые проблемы фиксации азота свободноживущими гетеротрофными бактериями в ризосфере риса.

ПРИМЕНЕНИЕ АЦЕТИЛЕНОВОГО МЕТОДА ДЛЯ СИСТЕМЫ ПОЧВА — РИС

Предложенный в 1967 г. Харди (Hardy et al., 1968) ацетиленовый метод определения азотфиксации получил в последние годы широкое развитие. В настоящее время известны три способа оценки активности азотфиксации в почве: 1) способ почвенных проб, когда комочки почвы или почва с отрезками корней инкубируются в атмосфере ацетилена (Dobereiner, 1968; Yoshida, Ancajas, 1970); 2) способ почвенных монолитов, заключающийся в инкубировании вырезанного вместе с исследуемым растением монолита почвы в воздухонепроницаемых контейнерах (Dart, 1971); 3) полевое определение, при котором поверхность почвы покрывается газонепроницаемым колпаком, под который вводится ацетилен, а также пропан в качестве внутреннего стандарта (Balandreau, Dommergues, 1973).

В связи с тем, что основным условием получения достоверных результатов при применении ацетиленового метода является минимальное нарушение естественного состояния почвы, более предпочтительными являются способ почвенных монолитов и полевой способ с внутренним стандартом. В лабораторных условиях, при выращивании растений в вегетационных сосудах или цилиндрах, вся система почва — растение может быть инкубирована с ацети-

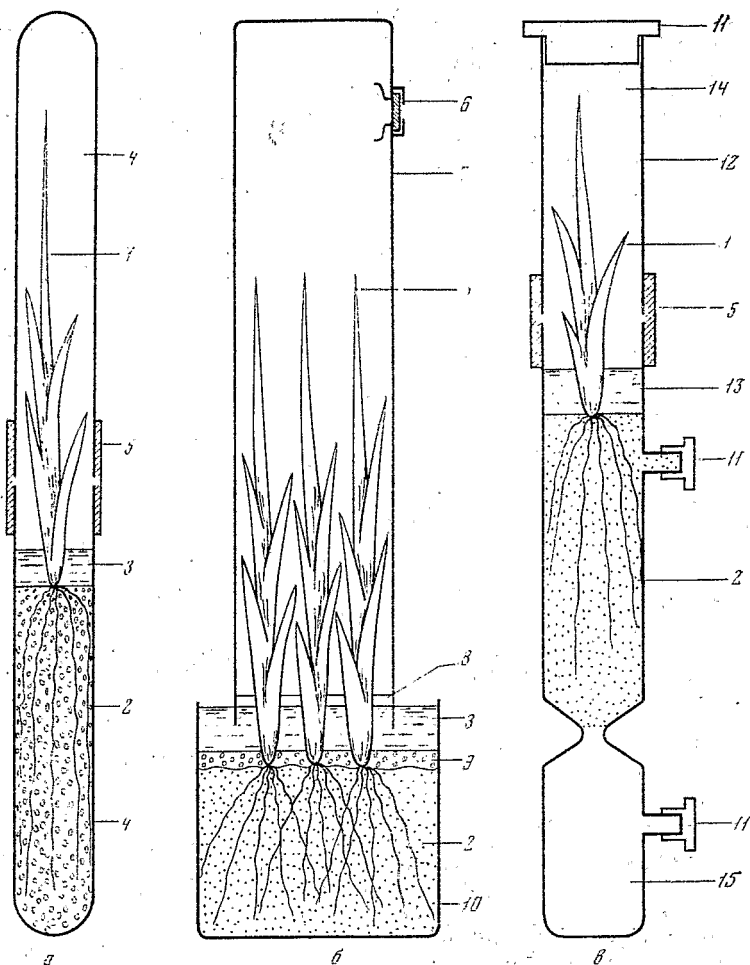


Рис. 1. Схема различного типа инкубационных камер для измерения активности $N_2(C_2H_2)$ фиксации в системе почва — рис

a — камера, состоящая из двух пробирок; *б* — вегетационный сосуд, накрыт полиэтиленовым мешком; *в* — приспособление, позволяющее вводить C_2H_2 отдельно к стеблям и корням растений; 1 — растение; 2 — почва или песок; 3 — вода; 4 — пробирка; 5 — резиновое кольцо; 6 — устройство для отбора проб; 7 — полиэтиленовый мешок; 8 — слой парафина; 9 — парафинированный песок (для подавления роста водорослей); 10 — вегетационный сосуд; 11 — резиновые пробки; 12 — стеклянный цилиндр; 13 — парафиновая перемычка; 14 — верхняя камера; 15 — нижняя

леном в различного рода камерах, позволяющих получить замкнутый объем (рис. 1).

Влияние скорости диффузии C_2H_2 и C_2H_4 внутри системы почва — растение на оценку активности азотфиксации. Растение риса, как известно, может транспортировать кислород из атмосферы

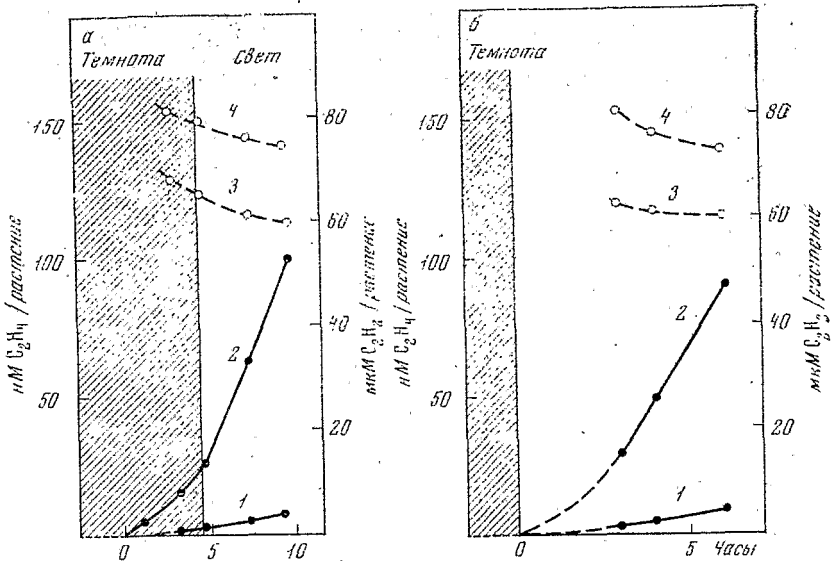


Рис. 2. Динамика C_2H_2 — C_2H_4 в системе почва — рис, инкубированной в приспособлении «в» (см. рис. 1)

а — C_2H_2 введен в верхнюю камеру; б — в нижнюю камеру; 1 — C_2H_4 в верхней камере; 2 — то же в нижней камере; 3 — C_2H_2 в нижней камере; 4 — то же в верхней

в корни и далее в почву ризосферы через воздухоносные ткани (Ishizuka, 1971; Luxmoore e. a., 1970). Помимо кислорода, могут переноситься и другие газы, в том числе азот (Yoshida e. a., 1972) и ацетилен (Balandreau e. a., 1975). Благодаря этому, ацетилен, введенный в газовую фазу системы почва — растение, может быстро диффундировать в ризосферу растения, что подтверждается результатами эксперимента (рис. 2).

Система почва — рис находилась в приборе «в» (рис. 1), который имел две инкубационные камеры — верхнюю и нижнюю, что позволяло вводить C_2H_2 или только в верхнюю камеру или только в нижнюю. При введении ацетилена в верхнюю камеру в нижней обнаруживались ацетилен и этилен (средняя скорость образования последнего составляла 14,8 нМ/растение в час). Во втором случае, когда ацетилен вводили непосредственно в нижнюю камеру, средняя скорость появления этилена была несколько большей, чем в первом случае — 19,9 нМ. Но в обоих вариантах содержание этилена в верхней камере было значительно ниже, что свидетельствовало о слабой его диффузии из корней в растение и затем в атмосферу. Таким образом, в случае затопленного риса (когда газы проникают в почву главным образом через растения), удовлетворительная диффузия C_2H_2 и C_2H_4 из газовой фазы в ризосферу и, что наиболее важно, обратно из ризосферы, по видимому затруднена, вследствие чего возможно занижение фак-

тической величины азотфиксации. Эта трудность может быть преодолена применением для определений сравнительно небольших монолитов почвы.

Длительность инкубации с ацетиленом оказывает существенное влияние на результат оценки активности азотфиксации. При кратковременной (1 час) инкубации на свету активность составила 0,5 мкМ C_2H_4 /г сухих корней/час, тогда как при длительной (8 час) инкубации она достигла величины 3–4 мкМ C_2H_4 /г сухих корней/час. Соответствующие величины активности азотфиксации при инкубации в темноте составили 0,2 и 1,0 мкМ. Высокий уровень N_2 (C_2H_2) фиксации, индуцированный длительной инкубацией, может быть результатом как прямого действия ацетилена на ризосферные микроорганизмы (Bergersen, 1970), так и непрямого — через стимуляцию корневой эксудации. Такая стимуляция возможна или в виде патологической реакции растения на C_2H_2 и C_2H_4 , или, что более вероятно, посредством активизации фотосинтеза в условиях повышенного содержания углекислого газа в инкубационном сосуде, выделяющегося при дыхании почвы. В силу этого длительная инкубация с ацетиленом является мало пригодной, кроме случаев, когда можно избежать непропорциональной диффузии газов в почве.

Освещение системы почва — растение в период инкубации должно быть максимально приближено к полевым условиям, так как на активность азотфиксирующих бактерий в ризосфере сильное влияние оказывает интенсивность фотосинтеза (Dart e. a., 1972). Наши эксперименты с системой рис — почва также показали, что освещение, после продолжительного выдерживания в темноте, приводит к быстрому возрастанию N_2 (C_2H_2) фиксирующей активности (рис. 2).

Экстраполяция результатов измерения азотфиксации в пространстве и во времени — ответственный момент при переходе от данных, полученных в ограниченных условиях лабораторного эксперимента, к условиям значительных территорий и вариаций в характеристиках почвы. Пространственные вариации параметров затопленных почв не являются значительными и, очевидно, не оказывают существенного влияния на суммарный результат азотфиксации. Гораздо более важны суточные и сезонные вариации активности азотфиксации (Balandreau e. a., 1974). Вследствие этого, пробы для анализа должны отбираться как можно более регулярно с учетом суточного периодизма и многократно в течение сезона.

Определенные сведения о величине вклада отдельных групп микроорганизмов в суммарный процесс азотфиксации может дать применение «гнотобиотических систем». Такие системы состоят из стерильно выращенных растений, инокулированных чистыми культурами азотфиксирующих микроорганизмов. Выращивание растений можно проводить на песке в камерах типа «в» (рис. 1), закрытых ватными пробками (при инкубации с ацети-

Таблица 1

Азотфиксирующая активность различных систем почва — рис и «гнотобиотической»

Система	Время инкубации с ацетиленом, час	Наличие водорослей	$N_2(C_2H_2)$ фиксирующая активность, $\text{нМ } C_2H_4/\text{г}$ сухих корней в час	
			день	ночь
Рисовое поле	3	+	30000	2000
Модельная, рис — почва	24	+	—	3800
То же	3	+	1500	200
»	3	+ *	600	100
«Гнотобиотическая» рис — <i>Beijerinckia</i> sp.	3	—	1000	—

* Водоросли присутствовали, но их активность была подавлена укрытием поверхности почвы слоем парафинированного песка.

леном — резиновыми). В наших исследованиях активности азотфиксации в ризосфере риса использовались системы, состоявшие из стерильных проростков риса, инокулированных чистыми культурами различных видов азотфиксирующих бактерий или их ассоциациями. В качестве одной из модельных систем применялась система: 4-недельные проростки риса плюс *Beijerinckia* sp. Азотфиксирующая активность этой системы составляла в среднем 1000 $\text{нМ } C_2H_4/\text{г}$ сухих корней/час и была близка к активности более сложной системы почва — рис (табл. 1). Несмотря на присутствие им недостатки, гнотобиотические системы дают возможность избежать влияния множества трудноучитываемых факторов и позволяют сделать вывод о высокой потенциальной активности системы рис — азотфиксирующие бактерии.

При сравнении величин активности азотфиксации, полученных в модельных опытах в лабораторных условиях, с данными полевых определений, обращает на себя внимание высокая активность природных систем, что говорит о существовании в почве целого комплекса азотфиксирующих микроорганизмов.

Полевые определения $N_2(C_2H_2)$ фиксации свидетельствуют о высокой потенциальной способности затопленных почв к азотфиксации.

На рисовых плантациях Филиппин количество фиксированного микроорганизмами азота составляло около 70 $\text{кг}/\text{га}$ в год (Yoshida e. a., 1972). Примерно такие же величины получены для почв под рисом в Японии и на Береге Слоновой Кости. Под посевами других злаковых растений и в природных экосистемах в условиях тропиков и умеренного климата активность

азотфиксации, определенная по апетиленовому методу, была значительно меньшей:

Экосистема	Активность N_2 (C_2H_2) фиксации, мг/авота на га
Плантация риса, Филиппины (Yoshida e. a., 1972)	78,9 за сухой сезон
Незасеянное поле, Филиппины (Yoshida e. a., 1972)	42,5 за сухой сезон
Плантация риса, Берег Слоновой Кости	72 в год
То же проса *	4 »
» кукурузы, Франция *	1,5 »

* Данные авторов статьи.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ГЕТЕРОТРОФНУЮ АЗОТФИКСАЦИЮ В РИЗОСФЕРЕ РИСА

В связи с тем, что ризосфера не является изолированной ячейкой в сложной системе почва — растение, микробиологическая азотфиксирующая активность в ризосфере вообще и гетеротрофная активность в частности зависят не только от собственно почвенных факторов, но также от климата и свойств самого растения, что в совокупности составляет ячейку экосистемы со следующими компонентами: атмосфера (свет, CO_2 , влажность воздуха), почва (влажность, тип почвы, растворенные газы, азот, калий, фосфор, молибден и др.), растение (корневые выделения, N_2 и O_2 — диффузия через растение).

Влияние освещения исследовалось нами в лабораторных условиях и в полевом эксперименте. В вегетационных камерах в системе 3-4-недельные проростки риса — почва активность азотфиксации при интенсивности света в 3 тыс. люкс была в 10 раз ниже, чем при интенсивности в 30 тыс. люкс, что составляло, соответственно, 200 нМ и 2000 нМ/г сухих корней/час. В полевом эксперименте на посевах риса была выявлена суточная периодичность, вызванная сменой дня и ночи (рис. 3, по Balandreau, Villemín, 1973). Это явление наблюдалось и в лабораторных экспериментах с применением вегетационных камер, но величина абсолютного максимума была примерно в 10 раз ниже (рис. 4).

Для некоторых модельных систем почва — растение может иметь значение влажность воздуха, влияющая на степень раскрытия устьиц у растений, однако для затопленного риса этот фактор не должен играть существенной роли.

Концентрация углекислоты в атмосфере оказывает значительное влияние на активность азотфиксации в симбиотических системах (Havelka, Hardy, 1974), что, по-видимому, важно и для системы почва — рис. Влияние его в полевых условиях пока не определено, но лабораторные исследования показывают, что как понижение концентрации CO_2 в воздухе, так и ее повышение во время

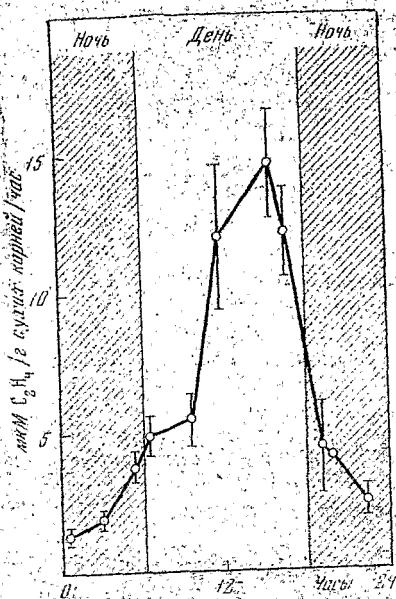


Рис. 3. Суточная динамика $N_2(C_2H_2)$ фиксации на плантации риса в провинции Ламто (Берег Слоновой Кости, по Balandreau, Willemin, 1974)

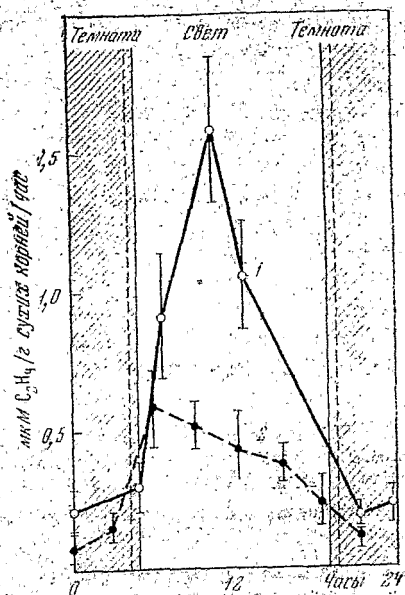


Рис. 4. Суточная динамика $N_2(C_2H_2)$ фиксации двух систем почва — рис в вегетационных камерах

1 — почва из провинции Ламто (Берег Слоновой Кости), продолжительность освещения 14 час.; 2 — почва из провинции Камарг (Франция), продолжительность освещения 15 час.

инкубации с ацетиленом приводит к аномальным результатам. Так, в экспериментах с гнобиотической системой было установлено, что без газообновления в атмосфере камеры (камера была герметизирована на время инкубации с ацетиленом) активность $N_2(C_2H_2)$ фиксации была на уровне 300 нМ C_2H_4 /г сухих корней/час и возросла до 1500 нМ после введения дополнительного количества углекислоты.

Переувлажненность, как известно, благоприятствует несимбиотической азотфиксации в ризосфере некоторых растений (Knowles, 1974). По данным Т. А. Калининской с соавт. (1973) и Йошиды (Yoshida, 1974; Yoshida, Ancajas, 1973), подобное же явление наблюдается и для риса. При этом азотфиксация была постоянно значительно выше при наличии растений, чем в их отсутствие, что свидетельствует о ведущей роли ризосферы в процессе гетеротрофной азотфиксации.

Органические формы азота в общем угнетают азотфиксацию как в сложных системах, так и в чистых культурах микроорганизмов. Показано (Yoshida, Ancajas, 1973), что внесение органи-

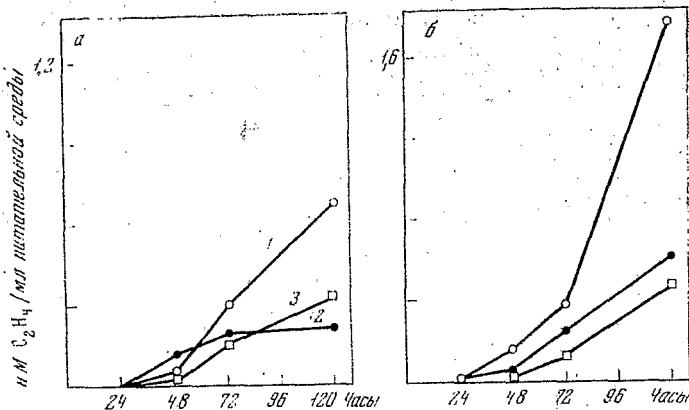


Рис. 5. Динамика восстановления C_2H_2 монокультурами ризосферных бактерий и их ассоциацией при росте на среде Федорова — Калининской с глюкозой (а) и крахмалом (б)

1 — *Bacillus* sp. + *Beijerinckia* sp.; 2 — *Beijerinckia* sp.; 3 — *Bacillus* sp.

ческого азота в количестве 16 мг/100 г почвы полностью подавляет азотфиксацию в системе рис — почва. По нашим наблюдениям, добавка минеральных форм азота в систему рис — почва в количестве 10 мг/100 г почвы понижало азотфиксацию на 90%.

Кроме азота, ряд других элементов — фосфор, молибден, калий — могут оказывать определенное влияние на активность азотфиксации, изменяя корневую эксудацию. По данным Трольденье (Trolldenier, 1973), недостаток калия вызывает у риса сильную экскрецию органических веществ, приводящую к резкому возрастанию микробной активности. Эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы о непрямом эффекте недостатка калия, стимулирующем азотфиксацию.

Влияние растения на активность азотфиксации проявляется как результат специфичности корневых выделений (Sadhu, Das, 1971), их количества и различий в скорости диффузии газов (N_2 , O_2) из стебля в ризосферу.

Азотфиксирующие бактерии в ризосфере риса. Уже предварительные исследования показали, что в ризосфере риса преобладают аэробные азотфиксаторы, о чем свидетельствуют приводимые ниже данные по численности азотфиксирующих микроорганизмов в ризосфере риса (тыс. на г сухой почвы).

Почва	Аэробы	Анаэробы
Неризосферная (контроль)	3200	372
Ризосферная	21900	1350
Ризосферная и корни	61500	4726

Этот факт легко объясняется относительно высоким содержанием кислорода в ризосфере риса (Aimi, 1960; Ishizuka, 1971).

Азотфиксирующие нефотосинтезирующие бактерии, выделенные из ризосферы риса, относились к следующим родам: *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azotomonas*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* (Balandreau e. a., 1975; Dohereiner, 1968; Mahmoud, Ibrahim, 1970; Rouquerol, 1963; Yoshida, 1970). При этом во многих почвах, и даже с нейтральной реакцией, *Azotobacter* занимал довольно незначительное место по сравнению с другими группами азотфиксаторов. Бактерии рода *Beijerinckia* обычны для тропических почв, но нередко они встречаются и в почвах зоны умеренного климата (Balandreau, Willemin, 1973). Выделенная вами из почвы под рисом провинции Камарг (Франция) ассоциация азотфиксирующих микроорганизмов *Beijerinckia* sp.—*Bacillus* sp. при культивировании на среде Федорова — Калининской показала значительно более высокую активность N_2 (C_2H_2) фиксации, чем эти же организмы в монокультуре (рис. 5). Ассоциация была использована в гнотобиотических системах и показала способность расти на корневых выделениях риса.

ВЫВОДЫ

1. Ацетиленовый метод может быть использован для определения количества фиксированного азота как в условиях лабораторных модельных систем почва — рис или систем рис — азотфиксирующие микроорганизмы (гнотобиотические системы), так и для полевых определений. Однако, метод нуждается в дальнейшем усовершенствовании, в особенности при полевых определениях.

2. Идентификация микроорганизмов-азотфиксаторов, изучение их физиологии — в частности, их способности утилизировать корневые выделения растений, выяснение роли фотосинтезирующих и гетеротрофных азотфиксаторов, изучение первичных экологических детерминант, таких как анаэробизм, формы почвенного азота, фосфора, молибдена, калия и др. — все это представляет широкое поле деятельности для лабораторных и полевых исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Калининская Т. А., Рао В. Р., Миллер Ю. М. 1973.— Микробиология, 42, 729.
- Мишустин Е. Н. 1972. Микроорганизмы и продуктивность земледелия. М., «Наука».
- Штина Э. А. 1971. В сб.: Новое в изучении биологической фиксации азота. М., «Наука».
- Aimi R. 1960.— Proc. Crop. Sci. Soc. Japan, 29, 51.
- Balandreau J. P., Dommergues Y. R. 1973.— Bull. Ecol. Res. Comm., Stockholm, 17, 247.
- Balandreau J. P., Rinaudo G., Fares-Hamad I., Dommergues Y. R. 1975. In: Nitrogen fixation in the Biosphere, vol. 1. W.D.P. Stewart ed. Cambridge Univ. Press.
- Balandreau J. P., Millier C. R., Dommergues Y. R. 1974.— Appl. Microbiol., 27, 662.
- Balandreau J. P., Villemin G. 1973.— Rev. Ecol. Biol. Sol., 10, 25.

- Becking J. H. 1971. In: Nitrogen — 15 in soil — plant studies. Intern. Atomic Agency, Vienna.
- Becking J. H. 1974. In: The proceeding of the international symposium on N₂ fixation. Pullman, USA.
- Bergersen F. J. 1970.— Aust. J. Biol. Sci., 22, 1015.
- Chopra T. S., Dube J. N. 1971.— Plant a. Soil, 35, 453.
- Dart P. J. 1971.— J. Exper. Bot., 22, 163.
- Dart P. J., Day J. M., Harris D. 1972. In: FAO/IAEA Technical Report — use of isotopes for study of fertilizer utilisation by legume crops, 85, 149.
- Dobereiner J. 1968.— Presq. Agropec. Bras., 3, 1.
- Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. 1968.— Plant Physiol., 43, 1185.
- Havelka V. D., Hardy R. W. F. 1974. In: The Proceeding of the international symposium on N₂ fixation. Pullman, USA.
- Ishizuka Y. 1971.— Advances in Agronomy, 23, 241.
- Knowles R. 1974. In: Dinitrogen fixation. Hardy R.W.F. e. a., ed. Wiley — Interscience, N. Y.
- Luxmoore R. J., Stelzy L. H., Letey J. 1970.— Agron. J., 62, 329.
- Mahmoud S. A. Z., Ibrahim A. N. 1970.— Acta Agron. Acad. Sci. Hung., 19, 71.
- Moore A. W. 1969.— Bot. Rew., 35, 17.
- Rouquerol T. 1963.— Ann. Inst. Pasteur, 105, 319.
- Sadhu M. K., Das T. M. 1971.— Plant a. Soil, 34, 541.
- Trolldenier G. 1973.— Plant a. Soil, 38, 267.
- Watanabe A., Yamamoto Y. 1971.— Plant a. Soil. Spec., vol. 403.
- Yoshida T. 1970. In: Annual Report the International Rice Research Institute. Manila.
- Yoshida T. 1971. In: Annual Report the International Rice Research Institute. Manila.
- Yoshida T., Ancajas R. R. 1970.— Soil Sci. a. Plant Nutrit., 16, 234.
- Yoshida T., Ancajas R. R. 1971.— Soil Sci. Soc. America Proc., 35, 156.
- Yoshida T., Ancajas R. R. 1973.— Soil Biol. Biochem., 5, 153.
- Yoshida T., Roncal R. A., Bautista E. M. 1972. In: 2nd ASEAN Soil Conf., Djakarta.

АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ АССОЦИАЦИИ С RHODOPSEUDOMONAS SP. В ЗАТОПЛЯЕМЫХ ПОЧВАХ ПОД РИСОМ

Ш. З. Мамилов

Институт микробиологии и вирусологии АН КазССР

Избыточное увлажнение и затопление почв, используемых для возделывания риса, создает в них своеобразные экологические условия, при этом характерным является наличие анаэробноз. Эта особенность находит отражение в развитии почвенной микрофлоры и, в частности, азотфиксирующих микроорганизмов. Резко возрастает численность анаэробных фиксаторов азота — таких как *Clostridium pasteurianum*. Деятельность аэробных фиксаторов азота является частично или полностью.

В настоящее время получено много данных о том, что кроме известных азотфиксаторов (азотобактер, анаэробные бак-

Acad. Sci. U.S.S.R.
АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ
Institut de Microbiologie

DOMERGUES

ПОВЫШЕНИЕ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВ РИСОВЫХ ПОЛЕЙ

Accroissement de la fertilité des sols
des rizières



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
МОСКВА 1977
Moscow

3. 11. DEC. 1977

Edit. "Nauka" = Science
O. R. S. I. O. N.

Collection de Publications

no 8973 Bio. Sole