

МОДИФИКАЦИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ НИТРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ АЦЕТИЛЕНОВЫМ МЕТОДОМ В УСЛОВИЯХ АНАЭРОБИОЗА

М. И. ЧУМАКОВ, В. Т. ЕМЦЕВ

(Кафедра микробиологии ТСХА, Саратовский институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов АН СССР)

В почвенно-микробиологических исследованиях в последнее время получил широкое распространение высокочувствительный ацетиленовый метод определения интенсивности связывания азота атмосферы микроорганизмами [19]. Было предложено значительное количество разнообразных модификаций этого метода как для полевых опытов [8, 12, 15, 18], так и для лабораторных [3, 5, 7, 11]. После накопления большого фактического материала, полученного этим методом, появились работы [13, 16], в которых указываются недостатки и ограничивающие факторы при его применении в почвенно-микробиологических исследованиях. Так, рекомендуется сокращать время инкубации образца почвы с ацетиленом до 1—2 ч. Но для получения значимых количеств этилена при хроматографическом анализе этого времени бывает недостаточно из-за медленной диффузии ацетилена в почве. В результате учитывается не весь образовавшийся в почве этилен. Чтобы ускорить диффузию ацетилена, предложено применять принудительную продувку газа через слой почвы [16], что позволяет сократить время на инкубацию образца с ацетиленом до 0,5 ч и выявить большую потенциальную активность азотфиксации, чем при методе [19], в 10,5—555 раз (пересчет наш). Но и данная модификация, на наш взгляд, имеет некоторые недостатки.

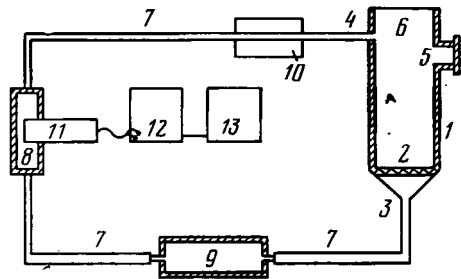
1. В применяемой для продувки через слой почвы ацетилено-воздушной смеси содержится 18 % об. кислорода, или давление кислорода равно 18,18 кПа (пересчет наш). Таким образом, инактивируется анаэробная азотфиксирующая микрофлора почвы, так как у клеток анаэробов нет кислородной защиты нитрогеназы [2]. Кроме того, частично ингибируется активность азотфиксирующих микроаэрофильных и аэробных форм микроорганизмов [4, 20—22]. А при определении нитрогеназной активности непосредственно в почве ее оптимум отмечается при пониженных концентрациях кислорода в газовой фазе (4,04 кПа) [13, 17].

2. Продувка ацетилен-воздушной смеси через почву осуществляется вручную при

помощи резиновых камер, что затрудняет точную дозировку прокачиваемого объема газа и, следовательно, воспроизводимость результатов. Это создает также неудобства при постановке параллельных повторностей или делает их практически неосуществимыми.

Предлагаемая модификация ацетиленового метода определения активности азотфиксации в почве в лабораторном опыте не имеет указанных недостатков.

Нами была сконструирована установка, позволяющая измерять нитрогеназную активность почвенной микрофлоры в контролируемых анаэробных условиях или при контролируемых значениях концентрации кислорода в газовой фазе в диапазоне 0,01—20 % об. (0,01—20,2 кПа) и строго



Устройство для определения нитрогеназной активности почвы в условиях анаэробии.

Обозначения даны в тексте.

постоянном количестве газа, проходящем через почву (рисунки).

Устройство состоит из стеклянной колонки 1 с пористым стеклянним фильтром 2, в которую помещается исследуемый образец, и имеющий два отвода 3, 4 под гибкие шланги. Через отверстие 5 (оно герметизируется пенициллиновой пробкой) отбирается газовая проба. Отверстие 6 служит для помещения в колонку почвенного монолита с растением. Гибкими шлангами 7 из поли-

хлорвинила колонка соединяется с измерительной ячейкой для датчика кислорода 8 и колонкой 9 для очистки газовой смеси от кислорода на палладиевом катализаторе (или в растворе пирагаллола). Циркуляция газовой фазы в замкнутой системе осуществляется с помощью многоканального перистальтического насоса [10]. Контроль за концентрацией кислорода в газовой фазе ведется с помощью кислородного датчика N-5972 11. Ток регистрируется прибором N-5221 (ПНР) 12, соединенным с самописцем Н-339 13.

Выбранный нами для исследований электрохимический метод определения кислорода в газовой фазе обладает по сравнению с применяемыми в настоящее время химическими и газохроматографическими методами [6, 9, 10] более высокой чувствительностью, простотой и возможностью автоматического слежения за уровнем содержания кислорода.

Исследовали темно-каштановую почву Заволжья (Саратовская область, поля Ершовской опытной станции орошаемого земледелия). Пробы отбирали в слое почвы 0—20 см. В горизонте А содержится гумуса 4,02%; P_2O_5 — 0,075; N — 0,179; K — 1,205%. Более подробное описание этого типа почвы содержится в работе [1]. Навеска почвы 15 г состояла из фракций с диаметром частиц 2,5; 1,0; 0,5; 0,3 мм, взятых в равных соотношениях. Температуру, влажность, концентрацию вносимого органического материала поддерживали на оптимальном уровне исходя из литературных и собственных данных. Газовая смесь, прокачиваемая через почву, состояла из азота и кислорода (содержание последнего регулировали). Для получения анаэробных условий остатки кислорода удаляли при помощи палладиевого катализатора или раствора пирагаллола. Аэробные условия (20% об., 20,2 кПа) создавали с помощью продувки воздухом. Ацетилен в концентрации 10% об. вносили на 1 ч, предварительно отобрав эквивалентный объем. Газовая проба 0,1—0,5 мл анализировалась на газовом хроматографе ЛХМ-8МД. Газ-носитель — азот, скорость тока 17 мл/мин, H_2 — 20 мл/мин,

Активность азотфиксации
(ацетиленредукции) почвы
(нг C_2H_4 на 1 г почвы в ч⁻¹)

Серия опыта	Анаэробные условия (Ан), 0—0,02 кПа	Аэробные условия (Аэ), 20,2 кПа	Ан: Аэ
1	633±43	234±31	2,7
2	47±30	1,03±0,32	45,6
3	339±228	15,6±6,3	21,7
4	12667±1936	9593±1723	1,3
5	11051±822	117±83	94,5
6	13481±1861	1826±199	7,4
7	13432±8003	3339±1623	4,0
8	2881±858	942±529	3,1

сорбент силикагель + 1,5% вазелинового масла, температура в колонке 90°, детектор пламенно-ионизационный. При расчете объема газовой фазы учитывался объем, занимаемый почвой, рассчитанный по объемной массе почвы.

Проведено 8 серий опытов. Повторность 3—6-кратная. Результаты обработаны статистически. Во всех сериях опытов отмечено значительное влияние концентрации кислорода газовой фазы на активность фиксации азота в почве (таблица). При снижении концентрации кислорода до 0—0,2% об. (0—0,2 кПа) активность связывания азота возрастала в 1,3—94,5 раза. Оптимум нитрогеназной активности для темно-каштановой почвы лежит в области 0—0,2% об. (0—0,2 кПа).

Таким образом, применение в контролируемых условиях низкого парциального давления кислорода (0—0,2 кПа) или полного анаэробиза при прокачке ацетилен-азотной смеси через почву дает возможность регистрировать потенциальную активность азотфиксации в среднем в 23,5 раза больше, чем в аэробных (при давлении O_2 20,2 кПа) условиях.

Следовательно, при учете концентрации кислорода в газовой фазе почвы информация о процессе азотфиксации в почве более объективна.

ЛИТЕРАТУРА

- Беррис Р. Ингибирование. — В кн.: Проблемы фиксации азота. М.: Мир, 1982, с. 504—536. — 2. Бриг В. Регуляция фиксации азота. — В кн.: Проблемы фиксации азота. М.: Мир, 1982, с. 704. — 3. Баландро Ш. П., Доммерг И. Р., Умаров М. М. Определение несимбиотической азотфиксации в ризосфере риса ацетиленовым методом. — В сб.: Повышение плодородия почв рисовых полей. М.: Наука, 1977, с. 107—116. — 4. Быкадорова Л. Р. Влияние содержания кислорода в газовой среде на активность азотфиксации микроорганизмов. — В сб.: Микробиол. процессы в почвах Зап. Сибири. Новосибирск: Наука, 1982, с. 89—97. — 5. Волкогон В. В. Способ определения азотфиксации в почве. — Микробиол. ж., 1984, т. 46, № 2, с. 89—91. — 6. Гантимурова Н. И., Дударев Ф. Ф. К вопросу определения в почвах газообразных метаболитов денитрифицирующих микроорганизмов. — В сб.: Микробиол. процессы в почвах Зап. Сибири. Новосибирск: Наука, 1982, с. 22—42. — 7. Калининская Т. А., Рао В. А., Волкова Т. Н., Ипполитов Л. Т. Определение азотфиксирующей активности почвы, занятой под посевами риса, при помощи ацетиленового метода. — Микробиология, 1973, т. 42, вып. 3, с. 483—485. — 8. Клевенская И. Л., Дударев Ф. Ф., Орлова В. В. Методы определения биологической фиксации азота культурами микроорганизмов и естественными субстратами. — В сб.: Микробиол. процессы в почвах Зап. Сибири. — Новосибирск: Наука, 1982, с. 3—22. — 9. Макаров Б. Н. Методы изучения газового режима почв. — В кн.: Методы стационарного изучения почв. М.: Наука, 1977, с. 55—87. — 10. Ландина М. М., Клевенская И. Л. Влияние плотности и влажности почвы на ее биологическую активность, процесс азотфиксации и состав почвенного воздуха. — Почвовед-

ние, 1984, № 5, с. 75—83. — 11. Садыков Б. Ф., Зуева Л. Д., Садыкова Н. Ю. Оценка продуктивности симбиотической азотфиксации ацетиленовым методом. — Микробиология, 1983, т. 52, вып. 4, с. 658—662. — 12. Садыков Б. Ф., Каппушев А. У., Зуева Л. Д. Полевой и лабораторный способы определения симбиотической азотфиксации. — Микробиология, 1983, т. 52, вып. 3, с. 517—519. — 13. Садыков Б. Ф., Зуева Л. Д., Каппушев А. У. Сравнение ацетиленового метода с прямым определением фиксации молекулярного азота. — Микробиология, 1983, т. 52, вып. 5, с. 860—863. — 14. Скиннер Ф. А. Анаэробные бактерии и их деятельность в почве. — В кн.: Почвенная микробиология. М.: Колос, 1979, с. 12—89. — 15. Умаров М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях. — Почвовед-

ние, 1976, № 11, с. 119—122. — 16. Умаров М. М. Ассоциативная азотфиксация (особенности, продуктивность, значение в азотном балансе почв). — Автореф. докт. дис. М., 1983. — 17. Усов Н. И. Почва Саратовской области. Саратов: Облгиз, 1948, с. 362. — 18. Denison R. F., Sinclair T. R., Zobel R. W., Johnson M. N., Drake G. M. — Plant a. Soil., 1983, vol. 70, p. 173—182. — 19. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. R., Burns R. C. — Plant physiol., 1968, vol. 43, N 8, p. 1185—1207. — 20. Wilcockson J. — J. Gen. Microbiol., 1977, vol. 101, N 2, p. 311—317. — 21. Wilson P. W. — Univ. Wisconsin Press, Madison, 1940. — 22. Wong P. P., Burris R. H. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, vol. 69, p. 672.

Статья поступила 27 апреля 1984 г.

SUMMARY

Construction and application principle of the modified acetylene method of determining potential nitrogenase activity of the soil in conditions of anaerobiosis were studied. O₂ concentration in the gaseous phase is shown to influence the activeness of nitrogen fixation (acetylene reduction) in the soil under laboratory experiment conditions.