

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

УДК 631.46+576.8.095.312

На правах рукописи

ЕГОРОВ Владимир Иванович

СВОБОДНОЖИВУЩИЕ АЗОТФИКСАТОРЫ
ПОДЗОЛИСТЫХ ПОЧВ КОЛЬСКОГО ПОЛУОСТРОВА

(03.00.07 – Микробиология)

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ленинград

1979

Работа выполнена в Полярно-альпийском ботаническом саду-институте ордена Ленина Кольского филиала им. С.М. Кирова АН СССР.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Т.А. КАЛИНИНСКАЯ

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Т.В. АРИСТОВСКАЯ, кандидат биологических наук А.И. ЧУНДЕРОВА.

Ведущая организация: Тимирязевская сельскохозяйственная академия, кафедра микробиологии.

Защита состоится "23" *ноября* 1979 г.
в 13³⁰ час. на заседании специализированного совета,
шифр К 020.26.01 по присуждению ученой степени кандидата
биологических наук во Всесоюзном научно-исследовательском
институте сельскохозяйственной микробиологии.

Адрес: 188620, Ленинград-Пушкин-6, шоссе Подбельского,
дом 3, БНИИСХИ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии.

Автореферат разослан *19 октября* 1979 г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
кандидат биологических наук

И.Ф. ВАСИК

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Изучение процесса несимбиотического азотосушения в подзолах Мурманской области представляет значительный общобиологический интерес. Вклад несимбиотических азотфиксаторов в азотный баланс почв в разных климатических условиях неодинаков. Проведение исследований по изучению жизнедеятельности азотфиксирующей микрофлоры в экстремальных условиях Севера позволит восполнить пробелы в наших знаниях об особенностях биологического круговорота азота в этом регионе.

Необходимость в расширении и уточнении представлений об интенсивности протекания процесса несимбиотической азотфиксации в почвах Заполярья обусловлена также и тем, что в последние годы, в связи с интенсивным развитием сельскохозяйственного производства, в почву вносятся во все возрастающих количествах минеральные азотные удобрения и азотсодержащие отходы животноводства.

Без знания биологического круговорота азота в легко ранимых биогеоценозах Севера невозможно оценить влияние вмешательства человека на состояние экологического равновесия в этой части биосферы.

Кроме того, исследование биологических процессов и способов их активизации в почвах является одним из необходимых элементов развития эффективного овощного и кормового хозяйства в Мурманской области.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось выявление роли несимбиотических азотфиксаторов в природных и культурных биогеоценозах Кольского полуострова. Для объективной оценки интенсивности и особенностей процесса несимбиотического азотосушения в почвах Крайнего Севера необходимо было изучить следующие вопросы:

I. Изменение численности аэробных и анаэробных азотфиксаторов в зависимости от вида почвы, ее географического положения в пределах Кольского полуострова, содержания воднорастворимого органического вещества и азота легкогидролизуемых соединений, гидротермических условий вегетационного периода, срока отбора образцов.

2. Выделение в чистую культуру и изучение физиолого-биохимических свойств отдельных представителей наиболее многочисленных групп азотфиксаторов.

3. Изучение динамики несимбиотической азотфиксирующей активности почв и влияние приемов окультуривания на изменение ее величины.

Научная новизна. Впервые была определена продуктивность несимбиотической азотфиксации в подзолистых почвах, расположенных за Полярным Кругом. Изучена динамика численности аэробных и анаэробных азотфиксаторов в зависимости от условий среды обитания. Выявлено, что в почвах этих географических широт преобладает анаэробный процесс несимбиотического азотнакопления; среди микроорганизмов, вырастающих на среде Эмби, азотфиксаторы составляют незначительную часть (несколько процентов) от общего числа олигонитрофилов. Изучены физиолого-биохимические свойства факультативного анаэроба *Bacillus polumуха*, выделенного из почв Кольского полуострова.

Практическая значимость. Полученные данные могут быть использованы при подсчете общей продукции биологического азота в различных биогеоценозах и при изучении генезиса почв. Результаты исследований являются теоретической основой для разработки приемов активирования биологической фиксации азота в почвах Кольского полуострова. Предложена оригинальная конструкция камеры, предназначенной для определения фиксации азота в полевых условиях.

Апробация. Материалы диссертации доложены на У съезде Всесоюзного микробиологического общества (Ереван, 1975); на IV Всесоюзном совещании по физиолого-биохимическим основам взаимодействия растений в фитоценозах (Киев, 1976); на IV Всесоюзной конференции молодых ученых ботанических садов (Батуми, 1976); на научном семинаре отдела почвенных микроорганизмов ИНИИ АН СССР (Москва, 1978).

Объем работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и заключения. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 рисунками и 25 таблицами. Список использованной литературы включает 202 наименования, в том числе 37 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования. Изучение распространения несимбиотических азотфиксаторов проводили на основе микробиологического анализа образцов типичных иллювиально-гумусовых подзолов разных районов Мурманской области. Сезонные изменения численности и активности микроорганизмов определяли на стационарных площадках, заложенных в подзоне северной тайги, в вертикальных природных зонах Хибинского горного массива.

Целинные почвы характеризуются низкой продуктивностью, маломощностью профиля, сильной завадушенностью, высокой кислотностью, малой емкостью поглощения, неблагоприятным составом органического вещества (преобладанием фульвокислот над гуминовыми, значительным содержанием негидролизующих веществ), бедностью его азотом. Отношение C:N в гор.А₀ очень широкое (39-45), в минеральных горизонтах оно уменьшается (до 22-36).

Почвы горного профиля отличаются от почв подзоны северной тайги более высоким содержанием органического вещества и несколько лучшей обеспеченностью азотом.

Уровень окультуренности исследуемых освоенных почв неодинаков. В хорошо окультуренном иллювиально-малогумусном подзоле реакция пахотного слоя близка к нейтральной, насыщенность основаниями составляет 65-67%. Кислотность слабо окультуренного иллювиально-многогумусного подзола высокая (рН_{KCl} - 4.1), насыщенность основаниями сравнительно незначительная (24-31%).

Методы исследования. Численность анаэробных бактерий определяли на оптимальных дифференциальных средах по В.Т.Емцеву (1965). Количество спор оценивали посевом на соответствующие питательные среды почвенной суспензии, пастеризованной при 80±2°C в течение 10 мин. Численность факультативных анаэробов учитывали на жидкой безазотной среде М.В.Федорова с 1% сахарозы и добавлением ломтиков картофеля и меда, олигонитрофилов - на плотной питательной среде Эпхи. Аэробные азотфиксирующие ассоциации определяли или методом жидких культур с использованием среды Т.А.Калининской (1967), или ацетиленовым методом (Hardy et. al., 1968). Азотфиксирующую активность почв выявляли ацетиленовым (Калининская

и др., 1974; Hardy et.al. 1973) и изотопным (Калининская, 1970) методами. Для определения азотфиксирующей активности почв ацетиленовым методом в полевых условиях использовалось специальное устройство нашей конструкции, позволяющее проводить исследования с почвами без нарушения их естественного сложения. Содержание водно-растворимых органических веществ в почве определяли по Тьрину, азота легкогидролизуемых соединений или методом Тьрина-Кононовой, или Корифильда (Шконде, 1971). Изучение морфологических и физиолого-биохимических признаков бактерий проводили по методикам, описанным в руководствах (Большой практикум, 1962; Родина, 1965). Статистическая обработка данных осуществлялась на ЭВМ "Минск-22" в вычислительном центре Кольского филиала АН СССР.

Несимбиотические азотфиксаторы подзолистых почв Кольского полуострова.

Распространение азотфиксаторов в почвах. Анаэробные и факультативно-анаэробные азотфиксаторы обитают в значительных количествах в подзолистых почвах Кольского полуострова. Численность микроорганизмов зависит от вида почвы. Наибольшее количество анаэробов обнаружено в богатых органическим веществом окультуренных глеево-подзолистой и торфяно-подзолистой кливниально-гумусной почвах — более 3 млн. клеток в 1 г почвы. Образцы целинных почв менее заселены микроорганизмами в сравнении с окультуренными: численность анаэробов в них колеблется от сотен — тысяч клеток (гор. А₂ и В) до десятков-сотен тысяч клеток (гор. А₀) в 1 г почвы.

В целинных почвах преобладают маслянокислые бактерии, в то время как в освоенных заметно возрастает роль ацетонобутиловых, особенно в почвах с невысоким содержанием органического вещества.

Олигонитрофилы — одна из самых многочисленных групп почвенных микроорганизмов. Численность их в минеральных горизонтах целинных почв варьирует в пределах десятков и сотен тысяч клеток в 1 г; в верхнем горизонте А₀ целинных и в гор. А_{пах} окультуренных почв их количество достигает десятков миллионов клеток в 1 г. В целинных почвах выявляется тенденция уменьшения количества бактерий, вырастающих на среде Энбк.

при переходе от иллювиально-малогумусных подзолов к иллювиально-многогумусным.

Динамика несимбиотических азотфиксаторов в почвах и ее зависимость от условий среды обитания. Для целинных подзолов Кольского полуострова характерна приуроченность максимальной микробиологической активности к верхнему гор. A_0 . С глубиной биогенность почв резко уменьшается. В минеральных горизонтах A_2 и B численность азотфиксаторов в течение вегетационного периода варьировала от нескольких десятков до сотен и тысяч клеток, тогда как в органогенном гор. A_0 количество их достигало десятков и сотен тысяч клеток в 1 г почвы, что связано с характером гумусообразования, а, следовательно, и распределения питательных веществ в подзолах.

Заселенность почв азотфиксаторами в течение вегетационного периода в 1974 г. была обычно выше, чем в 1973 г. Это объясняется влиянием гидротермических условий, которые были неодинаковы в эти годы. Вегетационный период 1973 г. характеризовался экстремальными условиями (засушливым летом и холодной влажной осенью), в то время как в 1974 г. лето было теплым и влажным. При сравнении изучаемых двух видов целинных подзолистых почв по численности микроорганизмов видно, что в 1973 г. обильнее заселен иллювиально-многогумусный подзол, тогда как в 1974 г. более биогенным оказался иллювиально-малогумусный. Большое влияние на жизнедеятельность микробов оказывает степень увлажненности почв. Иллювиально-малогумусные почвы формируются в верхних сухих частях пологих склонов, поэтому в засушливый период развитие микроорганизмов здесь сдерживается недостатком влаги. Иллювиально-многогумусный подзол занимает пониженные участки местности, в засушливый 1973 г. он был более увлажненным в течение всего вегетационного периода.

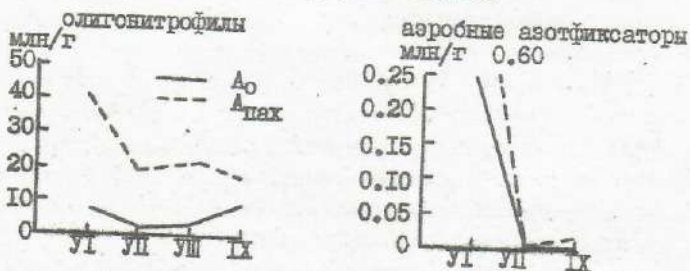
Повышенное количество осадков, выпавших в 1974 г. отрицательно сказалось на развитии микроорганизмов в иллювиально-многогумусном подзоле (ухудшение условий аэрации) и стимулировало их активность в иллювиально-малогумусном.

Изучение динамики численности олигонитрофилов в 1973 г. проводили с одновременным определением в этом же почвенном разведении количества аэробных азотфиксирующих ассоциаций

методом жидких культур.

Динамика олигонитрофильных и факультативно-симбиотрофных микроорганизмов была сходной (рис.1). Отмечается уменьшение численности их в летний период в сравнении с весенним и осенним сроками отбора образцов. В отличие от олигонитрофилов осенний максимум аэробных азотфиксирующих ассоциаций в большинстве случаев выражен слабо. Количество аэробных азотфиксаторов обычно не превышало 1% от общего числа обнаруженных олигонитрофилов и колебалось от нескольких десятков до сотен тысяч клеток в 1 г почвы.

Иллювиально-малогумусный подзол



Иллювиально-многогумусный подзол

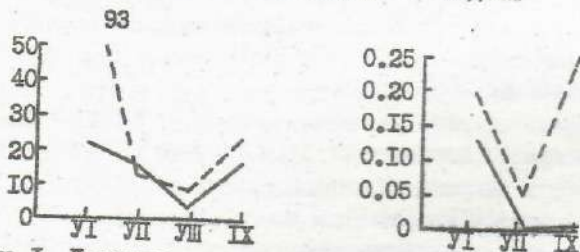


Рис.1. Динамика численности олигонитрофильных микроорганизмов и аэробных азотфиксаторов в гор. А₀ и А_{пах} почв.

Численность факультативно-анаэробных азотфиксаторов варьировала от десятков и сотен тысяч клеток в 1 г (Гор. А₀ целинных почв) до 2.5 млн клеток (в пахотном горизонте окультуренных).

В течение вегетационного периода выявляется два максимума численности *Clostridium pasteurianum* - в весенне-летний период и осенью (рис.2). В целинных почвах маслянокислые бактерии находятся преимущественно в вегетативной форме, хо-

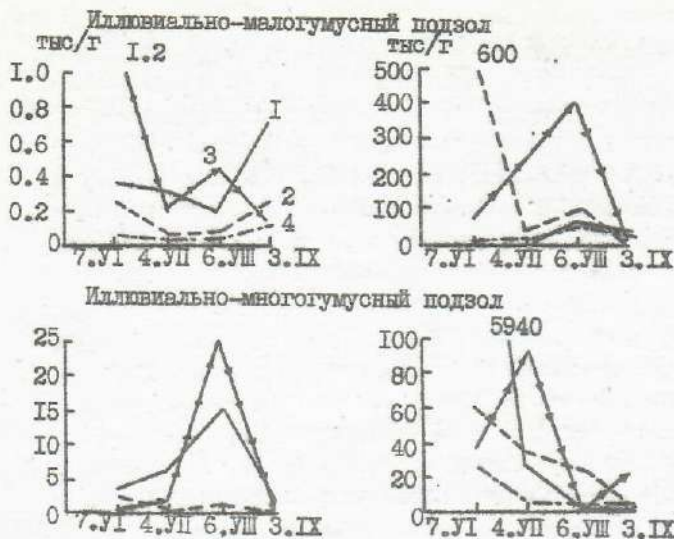


Рис.2. Динамика численности анаэробных азотфиксаторов в гор.А₀ и А_{пах} почв: 1 - вегетативные клетки *Cl. pasteurianum*, 2 - споры; 3 - вегетативные клетки *Cl. acetobutylicum*, 4 - споры.

тя соотношение вегетативных и спорных форм в течение сезона меняется. В окультуренном иллювиально-малогумусном подзоле в июне, июле 1973 г. и в июле 1974 г. вегетативные клетки не были обнаружены. В августе появились вегетативные клетки бактерий, но количество спор было все еще значительным. В окультуренном иллювиально-многогумусном подзоле в отдельные сроки отбора образцов также были обнаружены только споры кластридий - в августе 1973 г., в июне и июле 1974 г.

Для ацетонобутиловых бактерий, развивающихся в целинных почвах, так же как и для маслянокислых, характерно преобладание вегетативных клеток над спорами. Однако динамика численности *Cl. acetobutylicum* отличается от динамики *Cl. pasteurianum* - ацетонобутиловые бактерии лучше развиваются в летний период. В окультуренных подзолах *Cl. acetobutylicum* наиболее многочисленны в то время, когда *Cl. pasteurianum* биохимически неактивны, т.е. находятся в почве в виде спор. Отчетливо проявляется закономерная смена маслянокислых бак-

терий ацетобутиловыми.

Закономерности динамики численности микроорганизмов, выявленные для почв подзоны северной тайги, проявляются и в почвах горного профиля, но содержание микроорганизмов в этих почвах в связи с более суровыми климатическими условиями обычно в 1.5–2 раза ниже, в сравнении с количеством их в почвах предгорий. В целинных почвах горно-тундрового пояса и в примитивных почвах вершины горы Вудьяврчорр выявлены случаи нахождения *Cl. pasteurianum* и *Cl. acetobutylicum* только в форме спор. Периодическое существование бактерий в форме спор указывает на наличие неблагоприятных факторов для их жизнедеятельности в этих почвах. В горно-тундровом подзоле численность анаэробов выше в нижележащих горизонтах A_1 и B , чем в гор. A_0 . Такой характер распределения анаэробных азотфиксаторов в горно-тундровой почве, по-видимому, связан с климатическими особенностями этой природной зоны — иссушением верхнего слоя почвы сильными ветрами, свойственными для тундрового пояса, неблагоприятным воздействием резких колебаний температур, проявляющихся более сильно в гор. A_0 .

При развитии почвообразовательного процесса роль азотфиксирующих микроорганизмов возрастает. Так, если в образцах мелковема, мало затронутого почвообразованием, численность микроорганизмов колеблется в пределах десятков-сотен клеток в 1 г., а в образцах примитивных почв под мхом и лузулой — сотен или тысяч клеток, то в почвах с полным профилем (в горно-лесном и горно-тундровом поясах) количество их достигает десятков тысяч клеток в 1 г.

Данные по динамике содержания водно-растворимого гумуса показывают, что в целинных почвах наиболее богат доступным органическим веществом органогенный горизонт A_0 . С глубиной количество его резко падает. По обеспеченности водно-растворимым органическим веществом изучаемые виды целинных подзолистых почв мало отличаются друг от друга. В окультуренных почвах количество доступного углерода в иллювиально-многогумусном подзоле обычно намного выше, чем в иллювиально-малогумусном. По обеспеченности им окультуренные почвы в 5–10 раз беднее гор. A_0 и в 1.5–2 раза богаче гор. A_2 и B целинных почв.

Наибольшее количество подвижных соединений азота обнаружено в органогенных горизонтах целинных почв. С глубиной количество азота уменьшается, однако в иллювиальном горизонте В содержание его выше, чем в гор. А₂. По обеспеченности подвижными соединениями азота окультуренные почвы занимают промежуточные положения между органогенным гор. А₀ и иллювиальным гор. В.

Обращают на себя внимание довольно значительные величины количества азота легкогидролизуемых соединений, обнаруживаемого в мелкозем и примитивных почвах горы Будьяврчорр в сравнении с содержанием в них водно-растворимого органического углерода. По-видимому, в этих почвах органическое вещество имеет преимущественно микробное происхождение с более узким чем у растительных остатков отношением C: N. Поэтому при их разложении образуется значительное количество соединений азота.

Статистическая обработка данных показала, что для гор. А₀ целинных почв достоверной корреляции между численностью азотфиксаторов и содержанием растворимого гумуса и подвижных соединений азота не обнаружено. Особенностью подзолистых почв является богатство органическим веществом гор. А₀. Поэтому в органогенных горизонтах целинных подзолов развитие микроорганизмов лимитируется не содержанием доступных источников углерода и азота, а другими экологическими факторами. Для минеральных горизонтов целинных почв выявлена слабая корреляция ($r = 0.33-0.48$) между численностью *Cl. acetobutylicum*, влажностью, содержанием водно-растворимого гумуса и подвижных соединений азота. Численность олигонитрофильных микроорганизмов в этих горизонтах коррелирует с влажностью и содержанием водно-растворимого органического вещества ($r = 0.36-0.50$). Таким образом, развитие микроорганизмов в нижних горизонтах подзолистых почв сдерживается, помимо действия невыявленных факторов, ограниченным количеством доступных питательных веществ.

Для окультуренных почв в вегетационный период 1973 г. обнаружена тесная корреляционная связь ($r = 0.71-0.83$) между численностью несимбиотических азотфиксаторов (за исключением *Cl. acetobutylicum*) и содержанием водно-растворимого

углерода. В 1974 г. динамика содержания водно-растворимого гумуса в окультуренных почвах была слабо выражена, и достоверной корреляции между изучаемыми показателями в этих почвах не выявлено. По-видимому, факторы, лимитирующие развитие микрорганезмов, со временем меняются.

Азотфиксирующие микроорганизмы подзолистых почв Кольского полуострова. Как уже было отмечено выше, азотфиксирующие ассоциации составляют незначительную часть от общего числа олигонитрофилов. Для подтверждения этого вывода, основанного на данных изучения динамики численности микроорганизмов, проводились специальные исследования по выявлению азотфиксаторов среди олигонитрофилов. С этой целью все колонии, выросшие на твердой питательной среде Эмби, распределялись по морфологическим признакам на группы. Несколько колоний из каждой группы испытывали на ацетиленовосстанавливающую способность в аэробных и анаэробных условиях.

Азотфиксирующая часть олигонитрофилов обычно не превышает несколько процентов от общего числа (табл. I). Только в отдельных случаях количество их возрастает до 20-30%. Больше всего азотфиксаторов обнаружено в образцах из горизонтов $A_{\text{пах}}$ окультуренных и A_0 целинных почв. В нижних горизонтах исследуемых почв они чаще всего не выявляются. Последующие микроскопические исследования культур, выделенных из колоний, обладающих ацетиленовосстанавливающей активностью, показали, что большинство из них нечистые и состоят из ассоциаций спорных кластридиальных клеток и неспорных прямых и изогнутых палочек, или кластридиальных палочек и дрожжей. По-видимому, данные, представленные в табл. I завышены, так как в число азотфиксаторов могли войти и те морфологически сходные с ними колонии, которые не имели симбиоза с анаэробными фиксаторами азота. Чтобы устранить эту методическую ошибку, на следующем этапе работы мы испытывали каждую колонию, выросшую на чашке Петри, на способность к восстановлению ацетилена. Для этих исследований были взяты осенние образцы горизонтов $A_{\text{пах}}$ окультуренного и A_0 целинного кильвиально-малогумусного подзола. В гор. $A_{\text{пах}}$ обнаружено 3% азотфиксаторов от общего числа микроорганизмов, выросших на среде Эмби, в гор. A_0 - 4,4%. Изучение морфологических,

Таблица I

Ацетиленвосстанавливающая способность колоний, выросших на среде Зиси, 1976 г.

Почва	Горизонт и глубина, см	22.У1				14.У1				3/У1			
		Общее в том числе		% азот		Общее		% азот		Общее		% азот	
		число колони- ий	след фиксиро- ван	число колони- ий	фиксиро- ван	число колони- ий	фиксиро- ван	число колони- ий	фиксиро- ван	число колони- ий	фиксиро- ван	число колони- ий	фиксиро- ван
Иллювиально-ме- логумусный под- зол, целина	A ₀ 0-6	66	1	1.5	69	0	0	113	0	0	0	0	0.9
	A ₂ 6-8	40	0	0	96	29	30.2	36	0	0	0	0	0
	B 8-18	80	0	0	288	0	0	34	0	0	0	0	0
То же, окульту- ренная	A _{цех} 0-20	85	22	25.9	62	11	17.7	60	7	11.7	0	0	11.7
	A ₀ 0-7	46	14	30.4	47	4	8.5	32	0	0	0	0	0
	A ₂ 7-14	44	0	0	-	-	-	76	0	0	0	0	0
Многогумусный подзол, целина.	B 14-22	46	0	0	37	1	2.7	130	0	0	0	0	0
	A _{цех} 0-17	127	6	4.7	325	2	0.6	125	0	0	0	0	0
	речная												
Слабоподзолистая иллювиально- многогумусная.	A ₀ 0-5	95	22	23.2	108	7	6.5	41	9	22.0	0	0	0
	B 5-16	40	3	7.5	35	0	0	85	0	0	0	0	0
	Осфорванная												
Скрытоподзоли- стая иллювиаль- но-гумусная	A ₀ 0-4	76	16	21.1	269	4	1.5	50	0	0	0	0	0
	A ₁ 4-12	33	0	0	129	3	2.3	30	0	0	0	0	0
	B 12-25	65	0	0	210	17	8.1	34	0	0	0	0	0

физиолого-биохимических свойств чистых культур, выделенных на среде Эшби, показало, что в аэробных условиях из азотфиксаторов растут в основном виды, близкие к *Vas. rolumuxa*. Изученные штаммы *Vas. rolumuxa* отличаются невысокой азотфиксирующей активностью и продуктивностью фиксации азота. Они способны усваивать в аэробных условиях на жидкой среде Т.А.Калининской до 1.84 мг азота воздуха на 1 г использованной глюкозы.

Несимбиотическая азотфиксация в почвах

Данные общей численности азотфиксаторов и азотфиксирующей активности целинных и окультуренных почв, которая определялась в аэробных и анаэробных условиях (табл.2), показали, что в почвах Кольского полуострова преобладает анаэробный процесс несимбиотического накопления азота. Так, во всех изучаемых почвах среди азотфиксаторов доминируют анаэробные микроорганизмы. Активность анаэробной фиксации азота в гор. А₀ целинных почв в 2-4 раза выше аэробной. В минеральных горизонтах целинных и пахотных слоев окультуренных почв разница между анаэробной и аэробной азотфиксацией хотя и менее значительна, но также существует.

В целинных почвах максимальная азотфиксирующая активность приурочена к верхнему гор. А₀. С глубиной численность микроорганизмов и их активность резко снижаются, что связано с характером распределения питательных веществ в подзолах. Только в горно-тундровой почве отмечена более высокая анаэробная азотфиксирующая активность нижележащего гор. А₁ в сравнении с гор. А₀. Характер распределения микроорганизмов в почвенном профиле и их активность определяются не только общим запасом органических веществ в том или ином горизонте, но и многими другими факторами: составом органического вещества (доступности его для микроорганизмов), гидротермическими условиями, степенью токсичности и др. (Аристовская, 1965).

Изучение азотфиксирующей активности образцов почв высокогорной пустыни подтвердили вывод, сделанный на основе результатов микробиологического анализа о том, что эти почвы малоактивны.

Таблица 2

Средневегетационные данные о численности микроорганизмов и азотфиксирующей активности почвы за 1976 г. *

Почва	Горизонт и глубина, см	Вес горд-зонта, г/га	Микроорганизмы, тыс/г		Азотфиксирующая активность			
			анаэробные	аэробные	аэробные условия	анаэробные условия		
			МКГ/кг, сутки	КГ/Га, сезон	МКГ/кг, сутки	МКГ/Га, сезон		
Ильиньско-мало-гумусный подзол, целина	A ₀ 0-6	120	0.34	10.13	23	0.33	104	1.50
	A ₂ 6-8	220	0.19	1.85	2	0.05	4	0.11
	B 8-18	1100	0.04	3.31	2	0.26	3	0.40
То же, окультуренная	A _{цех} 0-20	2200	492.50	675.00	2	0.52	4	1.06
	A ₀ 0-7	140	7.58	17.50	24	0.40	54	0.91
	A ₂ 7-14	770	0.37	0.49	2	0.19	4	0.37
Ильиньско-много-гумусный подзол, целина.	B 14-22	880	0.06	0.27	2	0.21	7	0.74
	A _{цех} 0-17	1870	259.38	1012.50	3	0.67	14	3.14
	A ₀ 0-5	100	3.99	50.38	16	0.19	53	0.64
Горно-лесная слабо-подзолистая ильиньско-многогумусная	B 5-16	1210	1.52	0.56	3	0.44	8	1.16
	A ₀ 0-4	80	0.73	11.53	13	0.13	22	0.21
	A ₁ 4-12	860	0.34	8.84	2	0.21	41	4.33
Горно-тундровая оторфованная слабо-подзолистая ильиньско-многогумусная	B 12-25	1430	0.14	7.13	2	0.34	5	0.86

* Азотфиксирующую активность определяли ацетиленовым методом. Расчет активности азотфиксационных исходных из моллярного соотношения восстановленных C₂H₂ и N₂ = 3 : 1

Азотфиксация в целинных почвах за вегетационный период 1976 г. составила в аэробных условиях 0,5-0,8, в анаэробных - около 2, а в окультуренных соответственно - 0,5-0,7 и 1-3 кг/га (использовался ацетиленовый метод определения фиксируемого азота с инкубированием образцов при 27°C).

Для подтверждения результатов, полученных косвенным ацетиленовым методом, в образцах почв, отобранных в августе, определялась азотфиксирующая активность одновременно ацетиленовым и изотопным методами. В варианте опыта без внесения глюкозы достоверная азотфиксация, определяемая изотопным методом, обнаружена во всех горизонтах целинного иливизально-малогумусной подзола и в гор. А₂ иливизально-многогумусной почвы (табл.3). Определения азотфиксации ацетиленовым методом показали наличие ее во всех образцах почв. Подобные расхождения в результатах, по-видимому, обусловлены различной чувствительностью применяемых методов.

Данные азотфиксирующей активности, полученные изотопным методом, близки к данным, полученным ацетиленовым методом в анаэробных условиях. Можно считать, что ацетиленовый метод объективно характеризует азотфиксирующую активность исследуемых почв.

Добавление глюкозы способствовало резкому увеличению активности азотфиксации только в окультуренной иливизально-малогумусной почве. В других образцах внесение глюкозы или не вызвало никаких изменений активности, или эти изменения были незначительны.

В вегетационный период 1977 г. азотфиксирующую активность почв определяли каждую неделю, причем одну часть почвенных образцов после добавления ацетилена помещали в термостат при температуре 27°C, другую - в почву (инкубирование в природных температурных условиях). Исследования проводили с наиболее активной целинной и окультуренной иливизально-малогумусной почвой. Температура инкубирования образца оказывает существенное влияние на азотфиксирующую активность почвы как в аэробных, так и в анаэробных условиях (табл.4). Активность гор. А₀ при инкубировании в термостате более чем в 4 раза превышает азотфиксирующую активность, выявленную

Таблица 3
 Азотфиксирующая активность почв (мг/кг за 21
 сутки), определенная изотопным и азетиленовым
 методами

Почва	Горизонт и глубина, см	Изотопный метод		Азетиленовый метод (без глюкозы)	
		без глюкозы	с глюкозой	аэробные условия	анаэроб- ные ус- ловия
Иллювиально-мало- гумусный подзол, целина	A ₀ 0-6	1.92	2.47	0.55	1.74
	A ₂ 6-8	0.17	0.14	0.02	0.06
	B 8-18	0.14	0.39	0.04	0.04
То же, окультуренная	A _{пах} 0-20	0	20.31	0.06	0.11
Иллювиально-много- гумусный подзол, целина	A ₀ 0-7	0	3.02	0.32	0.88
	A ₂ 7-14	0.22	0.28	0.02	0.08
	B 14-22	0	0.39	0.04	0.23
То же, окультуренная	A _{пах} 0-17	0	1.34	0.06	0.21
Слабоподзолистая иллювиально-много- гумусная	A ₀ 0-5	0	2.52	0.25	0.42
	B 5-16	0	0	0.04	0.17
Оторфованная скри- топодзолистая иллю- виально-гумусная	A ₀ 0-4	0	3.39	0.42	0.29
	A _I 4-12	0	0	0.04	0.17
	B 12-25	0	0	0.04	0.02

в температурных условиях почвы. В минеральных горизонтах A₂ и B целинной и в пахотном слое окультуренной почв влияние температуры инкубирования на азотфиксирующую способность менее значительно, что, по-видимому, связано с различным количеством доступного органического вещества в этих образцах почв. Верхний горизонт A₀ богат органическим веществом, поэтому инкубирование при оптимальной температуре способствует усилению размножению микроорганизмов и увеличению азотфиксирующей активности.

Жизнедеятельность микроорганизмов в минеральных горизонтах целинных и пахотном слое окультуренных почв лимитируется в первую очередь содержанием доступных углеродных

Таблица 4

Влияние температуры инкубирования на азотфиксирующую активность почвы (средневегетационные данные за июнь-август 1977 г.)

Почва	Горизонт	Инкубирование в термостате				Инкубирование в почве			
		аэробные условия		анаэробные условия		аэробные условия		анаэробные условия	
		мкг/кг	г/га	мкг/кг	г/га	мкг/кг	г/га	мкг/кг	г/га
		сут-зон	сут-зон	сут-зон	сут-зон	сут-зон	сут-зон	сут-зон	сут-зон
Иллювиально-малогумусный подзол, целина	A ₀	30.5	330	68.4	740	6.1	70	15.9	170
	A ₂	0.6	20	0.8	30	0.4	10	0.5	20
	B	0.5	50	0.7	60	0.3	30	0.4	40
То же, окультуренная	A _{пах}	0.9	180	1.3	260	0.6	120	0.7	140

соединений, поэтому температура инкубирования оказывает слабое влияние на активность этих образцов. Температура почвы в момент отбора образцов колебалась от 2-14°C в целинной до 7-16°C в окультуренной почвах.

Несимбиотическая азотфиксация за 3 месяца вегетационного периода 1977 г. составила в целинной почве 0.11-0.23, в окультуренной - 0.12-0.14 кг/га.

Изучение динамики несимбиотической фиксации азота методом изолирующих камер (полевым методом) показала, что в окультуренном варианте почвы наблюдались два основных пика азотфиксирующей активности (рис.3): первый пик соответствовал периоду интенсивного разложения навоза, второй пик был обусловлен влиянием выделений овса, находящегося в фазе колошения. Для целинной почвы выявлены сравнительно невысокие колебания активности в течение вегетационного периода.

По этим данным за счет несимбиотической азотфиксации в целинную почву поступило за 3 месяца вегетационного периода 1977 г. 45.6 г азота на 1 га, а в окультуренную - 170 г/га.

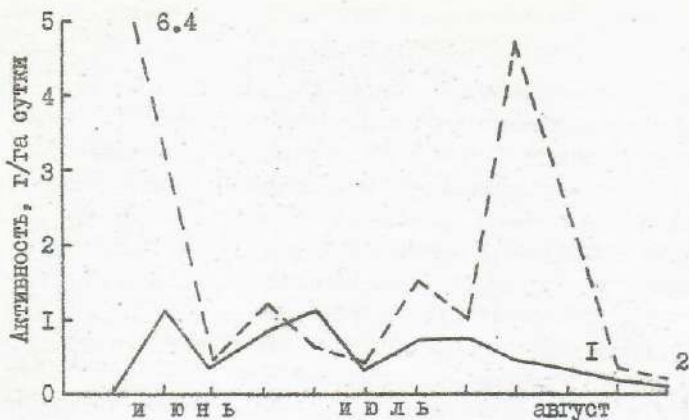


Рис.3. Динамика азотфиксирующей активности целинной (1) и окультуренной (2) почв (метод изолирующих камер).

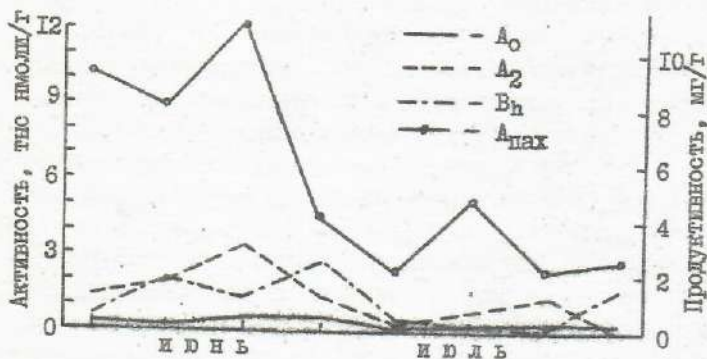


Рис.4. Динамика потенциальной азотфиксирующей активности и продуктивности азотфиксации иллювиально - мелзгумусного подзола.

Влияние приемов окультуривания на азотфиксирующую активность почв

В условиях лабораторных опытов выявляли влияние известкования и добавления доступного органического вещества (глюкозы) на азотфиксирующую активность почв. Известкование является одним из необходимых приемов активизации жизнедеятельности азотфиксаторов. Однако реакция среды, по-видимому, не является единственной причиной, определяющей биологическую азотфиксацию в почвах. Так, известкование вызвало появление активности в некоторых образцах минеральных горизонтов почв, тогда как в органогенных горизонтах A_0 и после нейтрализации процесс азотфиксации подавлен.

Внесение доступного органического вещества не стимулирует азотфиксирующую активность образцов горизонтов A_0 и A_1 . В минеральных горизонтах A_2 и B после добавления органического вещества активность сравнительно высокая, причем период азотфиксации начинается через 5-8 суток инкубирования с глюкозой и заканчивается через 36-72 суток.

В окультуренных почвах наблюдается резкое возрастание активности под влиянием внесения источника углеродного питания; метаболизм глюкозы заканчивается за 6-13 суток.

Изучение динамики потенциальной азотфиксирующей активности иллювиально-малогумусного подзола в первые два месяца вегетационного периода 1977 г. выявило наличие максимумов и минимумов активности во всех образцах в течение периода наблюдений (Рис.4). Только активность гор. A_0 постоянно оставалась на низком уровне.

Продуктивность потенциальной азотфиксации в образцах целинной почвы колебалась от 0 до 3 мг на I г потребленной глюкозы. В окультуренном варианте фиксация азота осуществлялась более экономично - на I г использованной глюкозы связывалось 2.5-11.5 мг азота.

Варьирование величины продуктивности азотфиксации в течение вегетационного периода говорит о том, что, по-видимому, основное влияние на активность почвенных азотфиксаторов оказывает микробные ассоциации, состав которых меняется в зависимости от типа почв, свойств отдельных их горизонтов, гидротермических условий вегетационного периода, состава рас-

тельности и других факторов.

Влияние удобрений на численность и активность азотфиксирующих микроорганизмов изучали в условиях мелкоделяночного опыта, поставленного на иллювиально-мелогумусном подзоле. Испытывалась эффективность фосфорно-калийных удобрений, полного минерального удобрения ($N_{120}P_{80}K_{80}$) и сочетания минеральных удобрений с органическими ($NPK + \text{навоз}$, 100 т/га).

Применение минеральных удобрений в дозах, рекомендуемых для почв Мурманской области, не оказывает существенного влияния на численность и активность несимбиотических азотфиксаторов. При совместном внесении минеральных и органических удобрений активизируется процесс несимбиотического азотнакопления, но влияние этих удобрений кратковременно и зависит от условий вегетационного периода. В вариантах опыта с внесением минеральных удобрений и без удобрений произрастание овса в большинстве случаев стимулирует жизнедеятельность несимбиотических азотфиксаторов; в варианте с минеральными и органическими удобрениями стимуляции не наблюдается.

Выводы

1. В целинных подзолах Кольского полуострова наибольшая численность азотфиксаторов и максимальная азотфиксирующая активность их выявлены в органогенном горизонте. С глубиной величина этих показателей резко снижается. Заселенность подзолов микробами зависит от вида почвы, содержания доступного органического вещества, гидротермических условий вегетационного периода.

2. Олигонитрофилы — одна из самых многочисленных групп почвенных микроорганизмов. Численность их в мелкоземе, примитивных почвах и минеральных горизонтах целинных почв с полным профилем варьирует в пределах десятков и сотен тысяч клеток в 1 г. В органогенном гор. A₀ целинных и пахотном слое окультуренных почв количество олигонитрофилов достигает нескольких десятков миллионов клеток в 1 г. Азотфиксаторы составляют 1-4% от общего числа олигонитрофилов.

3. Азотфиксирующие формы олигонитрофилов в основном

представлены факультативным анаэробом *Bacillus polymyxa*, активность которого не превышает 2 мг N_2 на 1 г использованной глюкозы.

4. Численность анаэробных и факультативно-анаэробных азотфиксаторов в целинных почвах сравнительно невысокая: в минеральных горизонтах и примитивных почвах количество микроорганизмов варьировало по сезонам года от нескольких десятков до сотен-тысяч клеток в 1 г; в гор. A_0 численность их составляла тысячи-десятки тысяч клеток, а в отдельные сроки отбора образцов достигала сотен тысяч клеток в 1 г.

В окультуренных почвах численность азотфиксаторов колеблется в пределах сотен тысяч-миллионов клеток в 1 г.

Среди анаэробных азотфиксаторов в целинных почвах доминируют маслянокислые бактерии, в освоенных заметно возрастает роль ацетобутиловых, особенно в почвах с невысоким содержанием органического вещества.

5. В целинных почвах подзоны северной тайги и горно-лесного пояса *Cl. pasteurianum* и *Cl. acetobutylicum* выявляются в основном в форме вегетативных клеток, хотя соотношение вегетативных клеток и спор в течение вегетационного периода меняется. В оторфованной скрытоподзолистой или гливиально-гумусной почве горно-тундрового пояса, примитивных почвах арктической пустыни и окультуренных почвах нередко случаи нахождения микробов только в форме спор.

6. В течение вегетационного периода наблюдается два максимума численности *Cl. pasteurianum* в весенне-летний период и осенью; *Cl. acetobutylicum* лучше развивается летом. Проявляется закономерная смена маслянокислых бактерий ацетобутиловыми и наоборот.

7. При определении азотфиксирующей активности почв большое значение имеют температурные условия инкубирования. Активность образцов из гор. A_0 при инкубировании в термостате ($27^{\circ}C$) более чем в 4 раза выше азотфиксирующей активности, выявленной в температурных условиях почвы. Для минеральных горизонтов A_2 и В целинной почвы и пахотного слоя окультуренной почвы влияние температуры инкубирования на азотфиксацию проявляется в меньшей степени.

8. Процесс несимбиотического азотнакопления в подзолах

Кольского полуострова заторможен. Накопление азота в почвах за счет несимбиотической фиксации его в вегетационные периоды 1976-1977 гг. по данным полевого ацетиленового метода, лабораторных изотопного и ацетиленового методов (с учетом температурного коэффициента) составило менее 1 кг/га. Активность почв в анаэробных условиях в 1.5-5 раз выше в сравнении с активностью их в аэробных условиях.

9. Для окультуренной почвы в течение вегетационного периода выявлено два основных пика азотфиксирующей активности: первый пик соответствует периоду интенсивного разложения внесенного весной навоза, а второй пик обусловлен влиянием корневых выделений овса, находящегося в фазе колошения. Для целинной почвы характерны сравнительно невысокие колебания активности в течение вегетационного периода.

10. Окультуривание благоприятно влияет на численность несимбиотических азотфиксаторов и потенциальную азотфиксирующую активность почв. В течение вегетационного периода потенциальная азотфиксирующая активность почв варьирует. Продуктивность азотфиксации в образцах целинной почвы колебалась от 0 до 3 мг, в окультуренной - от 2.5 до 11.5 мг на 1 г потребленной глюкозы.

11. Известкование является одним из необходимых приемов улучшения условий жизнедеятельности несимбиотических фиксаторов азота. Применение калийных, фосфорных и азотных удобрений в дозах, рекомендуемых для почв Мурманской области, не оказывает существенного влияния на численность и активность несимбиотических азотфиксаторов. Органические удобрения в сочетании с минеральными активизируют процесс несимбиотического азотонакопления в почвах, влияние этих удобрений сравнительно кратковременно и зависит от гидротермических условий вегетационного периода.

Рекомендации

1. Изучение актуальной азотфиксирующей активности почв необходимо проводить в условиях, близких к естественным. Одним из методов, удовлетворяющих этому требованию, может служить полевой ацетиленовый метод в нашей модификации. Применение предложенной и испытанной нами изолирующей камеры позво-

ляет сравнительно просто решать методические трудности, связанные с введением, отбором для анализов газовой смеси и поддержанием определенной концентрации ацетилена при исследовании процесса фиксации азота в почвах с ненарушенным сложением.

2. Процесс несимбиотического азотсбора, а следовательно, и плодородие почв Кольского полуострова можно повысить осуществлением комплекса агротехнических мероприятий:

а) периодическим проведением известкования; известкование не только снижает кислотность почв, но и улучшает питание микроорганизмов кальцием, играющим важную роль в поддержании ригидности, определенной степени проницаемости оболочек клеток;

б) внесением высоких доз органических удобрений, способствующих увеличению количества доступного энергетического вещества для микробов и улучшающих водно-физические свойства почв;

в) применением искусственных поливов в засушливый период; искусственные поливы будут способствовать интенсификации распада органического вещества, а, следовательно, и улучшению углеродного питания азотфиксаторов.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Егоров В.И., 1975. Влияние содержания водно-растворимого органического вещества на видовой состав анаэробных азотфиксаторов в подзолистых почвах Кольского полуострова. Тез. докл. У съезда Всесоюзного микробиологического общества, Ереван, 52-53.

2. Егоров В.И., 1976. Распространение анаэробных азотфиксирующих и олигонитрофильных микроорганизмов в подзолистых почвах Кольского полуострова. Сб. "Почвенные исследования на Кольском полуострове", Апатиты, 82-89.

3. Егоров В.И., Кислик Е.Е., 1976. Влияние *Avena sativa* на численность и активность несимбиотических азотфиксаторов в полевом опыте с применением удобрений. Тез. докл. LV Всесо-

ленного совещания по физиолого-биохимическим основам взаимодействия растений в фитоценозах, Киев, 109-110.

4. Егоров В.И., 1976. Численность анаэробных азотфиксаторов в почвах заповедной территории Полярно-альпийского ботанического сада. Сб. "Охрана среды и рациональное использование растительных ресурсов. Изд. "Наука", М., 277-278.

5. Егоров В.И., 1978. Динамика несимбиотических азотфиксаторов в подзолистых почвах Кольского полуострова. Почвоведение, № 5, 66-74.

6. Егоров В.И., Калининская Т.А. и Миллер В.М., 1978. Несимбиотическая фиксация азота в подзолистых почвах Кольского полуострова. Микробиология, т.57, вып.5, 854-859.

7. Егоров В.И., 1978. Несимбиотическая фиксация азота в почвах профиля горы Вудъяврчорр. Сб. "Микробиологические исследования на Кольском полуострове", Апатиты, 18-33.

8. Егоров В.И., 1979. Модификация ацетиленового метода определения азотфиксирующей активности почв в полевых условиях. Микробиология, вып.3, 561-564.

9. Егоров В.И., Калининская Т.А., 1979. Несимбиотическая фиксация азота в почвах Крайнего Севера. Тез. докл. УИ симпозиума "Биологические проблемы Севера", Апатиты, II-12.