

УДК 631.461.51:631.445.24

## НЕСИМБИОТИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА АТМОСФЕРЫ В ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЕ И ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЕЕ ИНТЕНСИВНОСТЬ

ЕМЦЕВ В. Т., ПОКРОВСКИЙ Н. П., ХРУШКОВА Т. А.  
(Кафедра микробиологии)

В последнее время повысился интерес к вопросам биологии и биохимии фиксации азота, чему способствовали появление новых методов исследований, успехи в смежных областях, открытие новых азотофиксирующих микроорганизмов и др. Изучаются генетические и физиологические факторы, условия окружающей среды, которые оказывают влияние на процесс фиксации молекулярного азота атмосферы. В связи с острой необходимостью увеличения продуктов питания в мире работы по фиксации азота атмосферы были включены в международную биологическую программу; азотофиксация и фотосинтез были выделены в число основных физиологических процессов, от которых зависит все производство продуктов.

Чрезмерное использование азотных удобрений, характерное для интенсивного земледелия, может привести к расточительным потерям источников биологической фиксации атмосферного азота. Поэтому внесение азотных удобрений должно быть строго сбалансировано и обосновано с учетом возможности почвы накапливать азот биологическим путем. К сожалению, до настоящего времени определение размеров накопления азота в полевых условиях в результате деятельности микроорганизмов было весьма трудным делом. Это объясняется недостаточной чувствительностью применяемых методов определения количества азота в почве, фиксируемого микроорганизмами.

В последние годы для изучения фиксации азота атмосферы в почве широко используется ацетиленовый метод [12], основанный на способности нитрогеназного комплекса азотофиксирующих микроорганизмов восстанавливать ацетилен в этилен [8, 18]. К преимуществам этого метода относится не только его высокая чувствительность (в  $10^3$  и  $10^6$  раз выше, чем чувствительность изотопного метода и метода Кьельдаля соответственно), но и возможность использования его как в лабораторных, так и в полевых условиях. Наиболее успешно ацетиленовый метод применяется для исследования несимбиотической фиксации азота в почвах. Фиксация азота несимбиотическими микроорганизмами наблюдается во всех почвах и может варьировать от 1,5 до 100 кг азота на гектар [2, 3, 6, 7, 9, 13, 14, 16, 19, 20]. Такую вариабельность, по-видимому, можно объяснить обусловленностью интенсивности несимбиотической фиксации азота в почве многими климатическими и почвенными факторами — температурой, осадками, влажностью воздуха, светом, органическим веществом, рН и Eh почвы и многими другими [2, 4, 10, 11, 12, 15, 17, 21, 22].

Целью наших исследований являлось изучение несимбиотической фиксации атмосферного азота в дерново-подзолистой почве в связи с некоторыми факторами (удобрения, известкование, растительный покров и др.), определяющими ее интенсивность.

## Методика

Объектом исследований служила дерново-среднеподзолистая почва многолетнего опыта, заложенного на Опытной станции полеводства Тимирязевской академии<sup>1</sup>. Для анализа были взяты образцы почвы со следующих полей многолетнего опыта: пара бессменного (с 1912 г.) и в севообороте, бессменных (с 1912 г.) и в севообороте культур ячменя с подсевом клевера и озимой ржи по фонам: 1 — без удобрений, 2 — РК, 3 — НРК, 4 — НРК + навоз с известкованных и неизвесткованных делянок. Дозы удобрений: N — 100 кг/га; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> — 150 и K<sub>2</sub>O — 120 кг/га, навоз — 30 т/га. Известкование проводится с осени 1949 г. один раз в 6 лет на половине всех полей (рН неизвесткованной почвы < 4,5, известкованной > 5,5). Более подробные данные, характеризующие изучаемую почву, представлены в работе [1].

Активность азотофиксации в дерново-подзолистой почве определяли ацетиленовым методом [12]. Согласно имеющимся представлениям [5], ацетиленовый метод позволяет определять «актуальную» (полевую) и «потенциальную» активность азотофиксации в почве. Актуальную активность азотофиксации определяли в образцах почвы, взятых с различных полей и перенесенных в лабораторию. Специальным буром из пахотного горизонта брали почвенные образцы размером 2×6 см, которые помещали в банки объемом 300 мл. В закрытые резиновыми пробками банки, не проводя замены воздуха на специальную газовую фазу, вводили ацетилен в количестве 10% от объема сосуда. Банки выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем шприцем из колб отбирали 0,5 мл газовой пробы и на газовом хроматографе «Хром-4» с помощью пламенно-ионизационного детектора определяли количество образовавшегося этилена. Контролем служил воздух в колбах с почвой, в которые не вводили ацетилен. Для разделения газов использовали силикагель АСК (частицы 0,25—0,5 мм), которым заполняли металлическую колонку длиной 1,2 м и диаметром 3 мм. Газ-носитель азот, постоянная скорость его тока 42 мл/м. Количество этилена определяли по стандартным пикам калибровочной кривой. Количество фиксированного азота в почве рассчитывали по формуле

$$A = \frac{(a_2 - a_1) 2N \cdot 1000V}{0,5 \cdot 3m},$$

где  $a_1$  и  $a_2$  — количество соответственно фонового и восстановленного этилена, нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> на 0,5 мл газовой пробы за 24 ч; 2N — молекулярная масса азота, г; V — объем газовой фазы сосуда, мл; 0,5 — объем газовой пробы, вводимой в колонку хроматографа, мл; 3 — соотношение между восстановленным этиленом и аммиаком; m — масса образца почвы, г; A — количество фиксированного азота, мкг на 1 кг за 24 ч.

Одновременно с проведением анализов на «актуальную» активность азотофиксации отбирали образцы почвы для определения «потенциальной» активности азотофиксации. С этой целью в сосуды объемом 15 мл помещали образец почвы массой 5 г. Затем вносили глюкозу в количестве 1% от массы образца и стерильной водой доводили влажность почвы до 100% от полной влагоемкости. Сосуды закрывали резиновыми пробками, закрепляли их металлическими зажимами и вводили 10% ацетилена. После 24-часовой инкубации в термостате при 28° определяли количество образовавшегося этилена по ранее описанной методике. В контрольных сосудах (без ацетилена) определяли эндогенный этилен. Повторность опытов 3-кратная.

<sup>1</sup> Авторы выражают глубокую благодарность зав. кафедрой земледелия и методики опытного дела проф. Б. А. Доспехову за предоставленную возможность взятия почвенных образцов с делянок многолетнего опыта Д. Н. Прянишникова.

## Результаты исследований

Исследования показали (табл. 1 и 2), что в почве бессменного пара и в севообороте фиксации азота атмосферы в результате деятельности свободноживущих азотофиксаторов составляла 0,6—0,7 мкг N на 1 кг почвы за сутки, т. е. уровень ее был довольно низкий. Внесение минеральных удобрений в пару не оказало существенного влияния на этот процесс. Навоз способствовал некоторому усилению связывания азота, однако уровень фиксации не превышал 1 мкг на 1 кг почвы. Иная картина наблюдалась в том случае, когда почва была занята растениями. Под ячменем с подсевом клевера и под озимой рожью уровень азотфиксации был значительно выше, чем в почве пара, как при бессменном посеве, так и в севообороте. По-видимому, в ризосфере растений создаются более благоприятные условия для развития свободноживущих азотофиксаторов. Причем внесение минеральных и органических удобрений не только способствует развитию растений, но и повышает уровень азотфиксации в почве. Интересно отметить, что активность фиксации азота атмосферы в почве, занятой растениями (ячмень с подсевом клевера и озимая рожь), довольно существенно возрастает по известкованному фону. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей [4]. Наблюдения также показали, что активность азотфиксации в почве под растениями колеблется в течение вегетационного периода. Это, возможно, связано с тем, что растения в разные фазы развития выделяют в почву различные количества корневых выделений, служащих источником энергии и питания для азотфиксирующих бактерий. В почве под озимой рожью уровень азотфиксации был наивысшим в фазу колошения.

Таблица 1

**Активность азотфиксации в почве многолетнего пара и под бессменными посевами сельскохозяйственных культур (мкг N на 1 кг почвы в сутки)**

Вариант опыта	13/V	2/VI	17/VI	6/VII	10/VIII	24/VIII	6/IX	20/IX
<b>Пар, известкованный</b>								
Без удобрений	0,5	0,6	0,2	0,6	0,3	0,5	0,3	0,4
РК	0,6	0,5	0,5	0,7	0,4	0,3	0,3	0,5
НРК	0,4	0,4	0,7	0,6	0,6	0,4	0,6	0,4
НРК+навоз	0,6	0,7	1,0	0,8	0,6	0,7	0,6	0,5
Навоз	0,7	0,7	1,0	0,7	0,8	0,6	0,9	0,6
<b>Ячмень+клевер, известкованный</b>								
Без удобрений	0,5	1,2	2,2	3,0	3,3	5,1	9,8	3,7
РК	0,7	1,6	2,5	3,3	3,6	5,7	11,0	5,8
НРК	0,5	2,3	3,8	5,1	12,9	15,5	39,0	11,4
НРК+навоз	0,8	2,7	4,4	6,2	11,0	20,3	20,2	10,3
Навоз	0,7	3,0	4,3	4,7	12,3	17,4	22,8	9,4
<b>Оз. рожь, неизвесткованная</b>								
Без удобрений	0,8	1,6	2,4	2,7	2,0	1,5	1,7	1,2
РК	1,2	1,9	2,3	3,0	2,4	2,0	2,4	1,5
НРК	1,1	2,0	3,7	3,9	3,7	3,3	2,7	2,0
НРК+навоз	1,8	2,7	3,9	4,0	4,1	3,8	2,4	1,9
Навоз	1,7	2,6	3,3	4,4	3,6	3,5	3,0	2,6
<b>Оз. рожь, известкованная</b>								
Без удобрений	1,0	2,5	3,7	3,5	2,9	2,2	3,0	2,0
РК	1,7	4,0	4,2	5,1	3,6	2,3	2,7	2,4
НРК	1,0	4,7	7,3	8,2	4,3	4,1	4,0	2,9
НРК+навоз	2,2	5,4	6,6	11,1	4,9	4,2	3,5	3,6
Навоз	1,8	6,2	6,0	8,8	4,4	3,6	4,2	3,2

Активность азотофиксация в почве, находящейся в системе севооборота  
(мкг N на 1 кг почвы в сутки)

Вариант опыта	26/V	9/VI	23/VI	9/VII	18/VIII	30/VIII	9/IX	22/IX
Пар, неизвесткованный								
Без удобрений	0,6	0,5	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3
PK	0,6	0,7	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,4
PKK	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7	0,4	0,5	0,4
PKK+навоз	0,5	0,5	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,5
Пар, известкованный								
Без удобрений	0,6	0,6	0,7	0,4	0,5	0,4	0,5	0,3
PK	0,5	0,7	0,6	0,5	0,7	0,5	0,5	0,4
PKK	0,5	0,5	0,4	0,7	0,6	0,7	0,6	0,5
PKK+навоз	0,8	1,0	0,8	0,7	1,0	0,6	0,8	0,7
Ячмень+клевер, неизвесткованный								
Без удобрений	0,7	0,9	2,0	2,1	1,8	2,0	2,1	1,8
PK	0,8	1,2	1,9	2,2	2,6	3,4	2,5	2,3
PKK	0,5	1,2	2,5	2,8	3,4	4,0	6,7	6,0
PKK+навоз	0,8	2,2	3,3	2,5	3,3	4,5	7,1	7,5
Ячмень+клевер, известкованный								
Без удобрений	0,6	1,5	2,2	2,0	2,7	3,7	5,0	4,8
PK	0,7	1,7	3,7	3,5	4,7	4,4	9,1	6,2
PKK	0,6	2,7	3,5	5,0	10,3	14,0	20,5	10,7
PKK+навоз	0,9	3,0	5,1	4,9	8,7	14,9	17,7	12,5
Оз. рожь, неизвесткованная								
Без удобрений	1,5	1,3	2,0	1,9	1,7	2,0	1,1	1,0
PK	1,7	2,0	2,6	3,3	2,3	2,7	1,8	1,6
PKK	1,7	2,6	4,1	4,5	3,5	3,1	2,8	2,3
PKK+навоз	2,0	3,1	4,3	3,9	3,3	3,7	3,3	2,9
Оз. рожь, известкованная								
Без удобрений	2,0	3,3	3,4	3,0	2,2	2,4	3,0	2,6
PK	2,6	4,0	5,2	4,9	4,0	3,6	2,9	2,9
PKK	3,1	5,8	7,0	9,4	6,1	3,5	3,7	4,0
PKK+навоз	3,8	4,9	8,1	10,7	5,6	4,1	3,5	3,6

Существенной разницы в активности азотофиксация в почве под бессменными посевами сельскохозяйственных культур и в системе севооборотов не обнаружено.

О потенциальной активности азотофиксация в дерново-подзолистой почве можно судить по данным табл. 3. Особенно значительно повысилась потенциальная активность азотофиксация в известкованной почве — она оказалась в десятки и сотни раз больше, чем в неизвесткованной. Причем минеральные и органические удобрения оказывали положительное влияние на потенциальную активность в почве пара только в вариантах с известкованием.

В почве под сельскохозяйственными культурами потенциальная активность азотофиксация также была выше по известкованному фону. В результате применения минеральных и особенно органических удобрений активность азотофиксация значительно возросла (иногда в десятки раз при внесении навоза под озимую рожь). По-видимому, удобрения, внесенные по известкованному фону, оказывают большое влияние на азотофиксирующую активность в почве опосредственно, через растение. Благоприятные условия культивирования растений, создающиеся вследствие применения удобрений, сказываются на их росте и развитии и обуславливают увеличение экзосмоса корневых выделений,

Потенциальная активность азотофиксаци в дерново-подзолистой почве  
(мкг N на 1 кг почвы в сутки)

Культура	Дата анализа	Без удобрений	PK	NPK	NPK+ +навоз	Навоз
<b>Монокультура</b>						
Пар, неизвесткованный	13/V	3	1	1	2	3
	6/VII	4	4	3	6	9
Ячмень+клевер, почва известкованная	13/V	448	725	1 020	1 190	2215
	6/V	520	850	1 940	2 450	5130
Оз. рожь, почва неизвесткованная	13/V	10	8	15	27	23
	6/VII	27	79	54	61	73
Оз. рожь, почва известкованная	13/V	537	306	820	2 805	7480
	6/VII	507	480	2 030	6 820	7500
<b>Севооборот</b>						
Пар, неизвесткованный	26/V	5	4	4	6	—
	9/VII	4	6	6	6	—
Пар, известкованный	26/V	236	187	1 670	2 470	—
	9/VII	306	295	850	1 500	—
Ячмень+клевер, почва неизвесткованная	26/V	25	11	21	70	—
	9/VII	17	40	75	95	—
Ячмень+клевер, почва известкованная	26/V	375	450	725	680	—
	9/VII	824	1030	2 110	10 850	—
Оз. рожь, почва неизвесткованная	26/V	23	24	36	55	—
	9/VII	32	55	87	81	—
Оз. рожь, почва известкованная	26/V	950	815	12 700	37 400	—
	9/VII	1350	2580	32 500	40 500	—

используемых азотофиксаторами в почве. Это приводит к усилению активности азотофиксаци в почве. Следовательно, определение потенциальной активности азотофиксаци в почве позволяет более четко выявить действие того или иного фактора на интенсивность связывания азота атмосферы в почве.

### Выводы

1. Изучение активности азотофиксаци в дерново-подзолистой почве с помощью ацетиленового метода показало, что этот показатель зависит от вида культивируемого растения и фазы его развития.

2. Известкование дерново-подзолистой почвы существенно сказалось на активности азотофиксаци в почве не только под растениями, но и в почве пара. Причем минеральные и органические удобрения оказали положительное влияние на активность фиксации азота в почве только по фону с известкованием.

3. Изучение потенциальной активности азотофиксаци в почве позволяет более четко определить влияние внешних факторов на интенсивность связывания молекулярного азота атмосферы в почве.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Доспехов Б. А., Братерская А. Н., Кирюшин Б. Д. Действие 60-летних бесменных культур на агрохимические свойства дерново-подзолистой почвы. «Изв. ТСХА», 1975, вып. 2, с. 49—53. — 2. Калининская Т. А. и др. Определение азотофиксирующей активности почвы, занятой под посевами риса, при помощи ацетиленового метода. «Микробиология», 1973, т. 42, вып. 3, с. 481—485. — 3. Мишустин Е. Н. Биосфера и азот в земледелии. В сб.: Экология и физиолого-биохимические основы микробиологического превращения азота. Тарту, 1972, с. 17—24. — 4. Чундерова А. И., Зубко И. К., Князева В. Л. Влияние окультуривания дерново-подзолистых почв на их азотофиксирующую активность. Бюл. ВНИИ с.-х. микробиол. Л., 1975, № 17,

вып. 2, с. 56—61. — 5. Умаров М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях. «Почвоведение», 1976, № 11, с. 119—123. — 6. Balandreau T., Vellemin G. "Rev. Ecol. Biol. Sol.", 1973, vol. 10, N 1, p. 25—33. — 7. Day T. M. et al. "Soil Biol. Biochem.", 1975, vol. 7, N 2, p. 107—112. — 8. Dilworth M. T. "Biochem. Biophys. Acta", 1966, vol. 127, p. 285—294. — 9. Döbereiner T. et al. "Plant. a. Soil", 1972, vol. 37, N 1, p. 191—196. — 10. Dommergues J. et al. "Soil Biol. Biochem.", 1973, vol. 5, N 1, p. 83—89. — 11. Hardy R. W. F. et al. "Soil Biol. Biochem.", 1973, vol. 5, N 1, p. 47—81. — 12. Hardy R. W. F. et al. "Plant Physiol.", 1968, vol. 43, N 8, p. 1185—1207. — 13. Tensen H. L. In: Soil Nitrogen. Amer. Soc. Agron.,

Monograph, 1965, N 10, p. 440. — 14. Nelson A. D. et al. "Canad. J. Microbiol.", 1976, vol. 22, N 4, p. 523—530. — 15. Paul E. A. et al. "Plant a. Soil", 1971, special vol., p. 495—507. — 16. Raju P. N., et al. "Proc. Nat. Acad. Sci." USA, 1972, vol. 69, N 11, p. 3474—3478. — 17. Rinaudo G. "Rev. Ecol. Biol. Sol.", 1974, t. 11, N 2, v. 149—168. — 19. Schollhorn R., Burris R. H. Federation Proc.", 1966, vol. 25, p. 710. — 19. Steyn P. L., Delwiche C. C. "Environ. Sci. Technol.", 1970, vol. 4, N 12, p. 1122—1128. — 20. Tjepkema T. "Soil Biol. Biochem.", 1975, vol. 7, N 2, p. 179—180. — 21. Vlasak K., Shivashanker K. "Agricultura (Heverlee)", 1973, vol. 21, N 4, p. 213—220. — 22. Ioshida T., Ancajas R. R. "Soil Sci. Soc. America Proc.", 1971, vol. 35, N 1, p. 156—158.

*Статья поступила 16 мая 1977 г.*

#### SUMMARY

The activity of nitrogen fixation in soddy-podzolic soil has been studied by acetylene method at the Field Experiment station of the Timiryazev Academy in a perennial experiment. Liming of soddy-podzolic soil produces an essential influence on the activity of non-symbiotic nitrogen fixation both in plant rhizosphere and in fallow land, a favourable effect of mineral and organic fertilizers on the activity of air nitrogen biological fixation being shown in the soil only on a liming background.