

**Российский государственный аграрный университет –
МСХА имени К.А. Тимирязева**

А. В. К о з л о в

**Методы почвенной микробиологии
и энзимологии в экосистемных
исследованиях**

Учебно-методическое пособие для вузов

*Рекомендовано для студентов и аспирантов высших учебных заведений,
обучающихся по биологическим и аграрным направлениям подготовки,
а также для работников научно-исследовательских учреждений*

Москва – 2023 г.

УДК 631.461 : 631.465 : 631.427.2

ББК 28.4/40.3

К 59

Автор:

Козлов Андрей Владимирович – доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой микробиологии и иммунологии Российского государственного аграрного университета-МСХА имени К.А. Тимирязева (г. Москва)

Рецензенты:

Романова Елена Михайловна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биологии, экологии, паразитологии, водных биоресурсов и аквакультуры Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина (г. Ульяновск)

Мамонтов Владимир Григорьевич – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры почвоведения, геологии и ландшафтоведения Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева (г. Москва)

Козлов А.В.

К 59 Методы почвенной микробиологии и энзимологии в экосистемных исследованиях: учебно-методическое пособие для вузов / А.В. Козлов. – М.: Плодородие, 2023. – 152 с.

ISBN 978-5-6046665-0-0

Учебно-методическое пособие, представленное в качестве комплекса учебного материала и научно-методических прописей проведения лабораторных и полевых исследований, объединяет классическую методологию почвенной микробиологии и дополняет ее современными принципами и методами определения биологического состояния пула почвообитающих микроорганизмов и их экологического статуса в естественном и антропогенно преобразуемом почвенном покрове. Пособие также описывает методические подходы в оценке биохимической и ферментативной активности педомикробиоты на различные виды природных явлений и антропогенного воздействия.

Пособие предназначено в качестве учебно-теоретического материала и лабораторно-методических разработок, необходимых для обеспечения учебного процесса и выполнения научных исследований студентами высших учебных заведений, обучающихся на биологических и сельскохозяйственных направлениях подготовки («Биология», «Почвоведение», «Экология и природопользование», «Агрехимия и агропочвоведение»), а также аспирантами, научными работниками и специалистами-практиками в области почвоведения, микробиологии, экологии, геологии, биогехимии и агрохимии.

УДК 631.461 : 631.465 : 631.427.2

ББК 28.4/40.3

ISBN 978-5-6046665-0-0

© Козлов А.В., 2023

© ООО «Плодородие», 2023

О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. Общие положения	7
1.1. Техника безопасности и правила работы в микробиологической лаборатории.....	7
1.2. Правила отбора проб почвы на микробиологический анализ.....	8
Глава 2. Подготовка материалов и посуды к микробиологическому анализу	12
2.1. Помещение и поверхности.....	12
2.2. Химическая посуда и инструменты.....	13
2.3. Вода и питательные среды.....	15
Глава 3. Принципы и подходы к учету деятельности микроорганизмов почвы	21
3.1. Роль почвенной микробиоты в формировании плодородия и ее значение в экосистемах.....	21
3.2. Определение биомассы почвенных микроорганизмов.....	22
<i>Регидратационный метод определения биомассы микроорганизмов по Благодатскому, Мирчинк и Паникову</i>	23
3.3. Определение относительной численности почвенных микроорганизмов....	27
<i>Метод посева на твердые питательные среды по Коху с разведением почвы по Пастеру</i>	30
<i>Метод посева на жидкие питательные среды способом предельных разведений почвы</i>	36
3.4. Определение биологической активности почвенных микроорганизмов.....	42
<i>Основы почвенной энзимологии</i>	44
<i>Особенности пробоотбора почвы при изучении ферментативной активности</i>	48
Глава 4. Структура микробного сообщества почвы	49
4.1. Экологическая классификация почвенной микробиоты.....	49
4.2. Особенности микробиоценоза в ризосфере растений.....	54
<i>Метод отделения ризосферы от корневой системы встряхиванием по Красильникову</i>	57
<i>Метод отделения ризосферы от корневой системы отмыванием корней по Теппер</i>	57
<i>Метод определения каталазной активности почвы по Галстяну</i>	58
Глава 5. Функции почвенных микроорганизмов	61
5.1. Разложение растительных остатков и органических удобрений.....	61
5.1.1. Разложение азотсодержащих компонентов.....	62
<i>Метод определения относительной численности аммонификаторов</i>	62
<i>Метод определения протеазной активности почвы по Галстяну и Арутюнян</i> ..	64
<i>Метод определения относительной численности иммобилизаторов</i>	68
<i>Метод определения инвертазной активности почвы по Купревичу и Щербаковой</i> ..	70
<i>Метод определения относительной численности нитрификаторов</i>	74
<i>Метод определения нитрифицирующей способности почвы</i>	75
5.1.2. Разложение безазотистых компонентов.....	79
<i>Метод определения относительной численности целлюлозолитиков</i>	80
<i>Метод определения целлюлазной активности почвы по Багнюку и Щетинской</i>	82
<i>Метод определения потенциального дыхания почвы по Галстяну</i>	86

<i>Метод определения актуального дыхания почвы по Карпачевскому.....</i>	87
<i>Метод определения актуальной целлюлозолитической способности почвы.....</i>	90
<i>Метод определения потенциальной целлюлозолитической способности почвы.</i>	90
5.2. Деструкция минералов почвы, удобрений и мелиорантов.....	91
5.2.1. Фосфатмобилизующая функция.....	92
<i>Метод определения относительной численности фосфатредуцентов.....</i>	92
<i>Метод определения фосфатазной активности почвы по Галстяну.....</i>	94
5.2.2. Калий- и кремниймобилизующая функция.....	97
<i>Метод определения относительной численности калий- и кремниймобилизующих микроорганизмов.....</i>	99
5.3. Трансформация промежуточных органических веществ почвы.....	100
<i>Метод определения относительной численности олиготрофов.....</i>	101
<i>Метод определения относительной численности олигонитрофилов.....</i>	101
<i>Метод определения относительной численности олигокарбофилов.....</i>	103
5.4. Трансформация гумусовых веществ почвы.....	104
<i>Метод определения относительной численности автохтонной микробиоты... </i>	108
<i>Метод определения полифенолоксидазной активности почвы по Козлову.....</i>	111
<i>Метод определения пероксидазной активности почвы по Козлову.....</i>	113
5.5. Полифункциональные группы микроорганизмов почвы и их роль в почвообразовательных процессах.....	116
5.5.1. Грибы.....	117
<i>Метод определения относительной численности грибов.....</i>	119
5.5.2. Актиномицеты.....	120
<i>Метод определения относительной численности актиномицетов.....</i>	120
5.6. Специфические функции микроорганизмов почвы и их роль в почвообразовательных процессах.....	121
5.6.1. Азотфиксация.....	121
<i>Метод определения относительной численности азотфиксаторов.....</i>	122
<i>Метод отбора клубеньков бобовых растений.....</i>	124
5.6.2. Денитрификация.....	125
<i>Метод определения относительной численности денитрификаторов.....</i>	125
5.7. Оценка степени обогащенности почвы микроорганизмами и расчет эколого-трофических индексов микробного пула.....	126
Глава 6. Санитарная функция почвы и антропогенное загрязнение.....	135
6.1. Определение токсичности почв методом почвенных пластин.....	138
6.1.1. Определение общего токсикоза почвы.....	138
6.1.2. Определение микробного токсикоза почвы.....	139
6.2. Определение токсичности почв методом водной вытяжки.....	141
6.3. Оценка степени фитотоксичности почвы.....	142
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	144
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ И ПОНЯТИЙ.....	145
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ И РЕКОМЕНДУЕМОЙ УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЙ И НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ).....	149

Введение

Почвообитающая микробиота является одним из самых сложных объектов в части изучения ее биологии и экологических особенностей взаимодействия со средой обитания. С одной стороны, относительная физиологическая простота позволяет изучать многие фундаментальные законы экологии на примере именно микроорганизмов, в том числе обитающих в почвах. Тем самым подтверждается, что почва как среда обитания является наиболее оптимальной и благоприятной для сохранения своего эволюционно сложившегося микробиологического генофонда. С другой стороны, в гетерогенных внутрпочвенных условиях складывается особые условия, которые определяют особенности поведения и различного функционала микробиоты, координально отличающиеся от их иных экологических ниш. С третьей стороны, современная ноосфера и различного рода проявления антропогенеза неизбежно вносят свой хронический вклад в общее состояние микробного пула почв и зачастую изменяют биохимическую активность микроорганизмов, что, в свою очередь, корректирует общее состояние и экологические особенности почвенных микробиоценозов.

К настоящему времени в научной литературе накопилось достаточно много сведений о почвообитающих микроорганизмах и различного рода их биологической активности, которая проявляется в вариациях их численности и метаболического статуса, в уровне потенциальной способности к трансформации органо-минеральной почвенной матрицы и привносимых в почву веществ-поллютантов, а также в общем эколого-трофическом состоянии.

Классические и современные методы исследования почвенных микроорганизмов затрагивают особенности микробного состава и биологической активности почвенного покрова, сформированного как в естественных условиях, так и в условиях различного вида антропогенного воздействия на почвы.

Современные методологические представления почвенной микробиологии гласят, что для полноценного понимания об экологическом статусе почвообитающей микробиоты использование молекулярно-биологических методов должно обязательно дополняться классическими методами микробиологических исследований, в том числе методами определения относительной численности эколого-трофических и физиологиче-

ских групп микроорганизмов, биохимической (в том числе ферментативной) активности почвы, способности продуцирования почвенной микробиотой различных метаболитов (метаболическая активность), а также методами изучения аппликационной трансформации веществ и интенсивности микробного продуцирования из почвы различных газов (CO_2 , CH_4 , N_2 , NH_3 , N_2O и т.д.).

Настоящее учебно-методическое пособие содержит комплекс классических методов микробиологического исследования почв, которые применимы для различных естественных и антропогенно преобразуемых экосистем, имеющее целью качественного дополнения при использовании современных молекулярно-биологических методов, в том числе метагеномной методологии.

Глава 1. Общие положения

1.1. Техника безопасности и правила работы в микробиологической лаборатории

Преподаватели и студенты микробиологической лаборатории всегда должны помнить о том, что в работе с культурами почвенных микроорганизмов они имеют дело с живыми микроскопическими клетками, далеко не всегда безопасными для здоровья человека. Поэтому во время работы необходимо соблюдать следующие правила личной и коллективной безопасности.

1. В подготовленную к микробиологическим исследованиям лабораторию входить только в халате и сменной обуви. Если халат преднамеренно оставлялся в лаборатории на плечиках под ультрафиолетовым облучением для стерилизации, то, войдя в лабораторию, его быстро одевают и наглухо застегивают, находясь непосредственно в потоке ультрафиолета, который затем немедленно отключают. Категорически запрещается находиться в стерильной лаборатории без специально подготовленной одежды, а также выходить за пределы лаборатории в стерильном халате.
2. В помещении микробиологической лаборатории категорически запрещается курить, хранить продукты питания и принимать пищу. Нельзя вносить в лабораторию посторонние и не нужные в работе вещи и предметы.
3. Перед началом работы обязательно проверяют исправность приборов, полное наличие реактивов, инструментов, посуды и др. О замеченных недостатках и неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту.
4. Во время работы нельзя зажигать одну спиртовку от другой, переносить горящие спиртовки со стола на стол.
5. Не касаться руками, металлическими и другими предметами контактных частей электросети. Не включать без ведома преподавателя любую электроаппаратуру, в том числе ламинарный бокс и ультрафиолетовый облучатель.
6. В работе необходимо постоянно соблюдать чистоту, сдержанность и опрятность, не допускать излишних разговоров и ненужных перемещений, работать по возможности сидя.

7. Почвенный материал, используемый в учебных или исследовательских целях, должен рассматриваться исследователем как нестерильный и, в определенной степени, небезвредный.
8. Все этапы работы с исследуемым материалом должны проводиться в условиях *in vitro* (стерильно!) со строгим соблюдением правил асептики.

1.2. Правила отбора проб почвы на микробиологический анализ

Отношение исследователя к процедуре отбора почвенных проб должно быть на уровне отношения к проведению сложных и трудоемких лабораторных операций, так как все получаемые в последующем результаты микробиологических исследований напрямую зависят от того, насколько грамотно и рационально был продуман подход к пробоотбору.

Пробоотбор почвы осуществляется на основании следующих нормативных документов:

- ГОСТ 28168-89 «Почвы. Отбор проб».
- ГОСТ 17.4.3.01-83 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб».
- ГОСТ 17.4.4.02-84 «Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа».
- МУ 2.1.7.730-99 «Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест».
- МР ФЦ/4022 «Методы микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации».

Цели микробиологического исследования почв сельскохозяйственных угодий могут состоять из:

- оценки плодородия почвы на основе качественных и количественных показателей деятельности микробиоты;
- оценки санитарно-химического и санитарно-бактериологического состояния почвы;

- оценки способности почвы к быстрому самоочищению от загрязнения на основе краткосрочной динамики ее биологической активности.

Оценка плодородия почв на основе учета деятельности микроорганизмов проводится вместе с оценкой физико-химического и агрохимического состояния почв при исследовании влияния каких-либо факторов (внесение удобрений и мелиорантов, технологии возделывания культур, исследования рекультивируемых и залежных земель и т.п.) на продуктивность и качество сельскохозяйственных культур. В таком случае в зависимости от поставленных задач и в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84 пробоотбор осуществляют не менее 1-2^х раз в год (например, начало и конец вегетации), послойно, с глубины почвенных горизонтов, типичных для данной почвенной разности. В зависимости от характера источника воздействия, возделываемой культуры и рельефа местности на каждые 0,5-20 га территории закладывают не менее одной *пробной площадки* размером не менее 100 м².

Санитарно-химическая и санитарно-бактериологическая оценка состояния почв проводится в случаях возникновения риска *химического* или *биологического* загрязнения почвы, предотвращение или устранение которого в целом является собой контроль за *санитарным состоянием почвы*. Такой подход в оценке возможен, например, при возникновении ситуации периодического внесения в почву очень высоких доз органических удобрений или других патогенных загрязнителей, а также в местах складирования органических отходов, в том числе отходов птице- и животноводческих комплексов без оборудования специализированных навозохранилищ и жижеборников. В подобных случаях в соответствии с ГОСТ 17.4.3.01-83 и МУ 2.1.7.730-99 пробы почвы отбирают не менее 2^х раз в год (весна и осень) послойно с глубины 0-5 и 5-20 см, при этом в зависимости от рельефа местности и условий землепользования на каждые 0-15 га закладывается не менее одной пробной площадки размером 100-200 м².

Для этих целей на одной пробной площадке отбирают 10 *объединенных проб*, каждая из которых должна состоять из 3^х *точечных проб* по 200-250 г. Общая масса одной объединенной пробы должна составлять не более 1 кг.

Исследования по динамике биологической активности загрязненной почвы, проводимые при необходимости оценки ее санитарного состояния и способности к самоочищению *за короткий промежуток времени*, возможны в ситуациях временного хранения больших масс органических удобрений или других токсичных веществ непосредственно на поверхности почвы, а также при чрезмерном краткосрочном агротехническом, агрохимическом или техногенном воздействии на сельскохозяйственные земли, что приводит в последующем к проблеме их рекультивации. В таком случае в соответствии с МУ 2.1.7.730-99 пробоотбор осуществляется периодически в течение 3^х месяцев (например, за период после негативного воздействия); в первый месяц отбор и анализ почвы проводится еженедельно, в последующие два – раз в месяц. При этом закладывают не менее 1 экспериментальной (опытной) и 1 контрольной (естественной) пробной площадки по 25 м² каждая с отбором одной объединенной пробы не менее чем из 5 точечных с массой почвы по 200 г каждая. Глубина отбора составляет 0-25 см, масса объединенной пробы почвы должна составлять не менее 1 кг.

Пробные площадки закладывают на участках с однородным почвенным и растительным покровом с учетом хозяйственного использования отдельно разграниченных полей и участков. В условиях изучения влияния на почву органических удобрений или других отходов в качестве источника элементов питания или источника патогенных микроорганизмов места закладки пробных площадок наносятся на *координатную сетку* плана землепользования с учетом распределения этих отходов на площади. При предположительно равномерном распределении удобрений или одинаковой загрязненности почвы закладку пробных площадок планируют более равномерно, при предположительно контрастном распределении – организуют в соответствии с особенностями внесения удобрений или отходов на территории.

Точечные пробы на площадке отбирают по диагонали, методом конверта, окружности, или буквы Z с помощью стерильного ножа, шпателя или почвенного бура. Перед взятием образца инструмент пробоотбора также стерилизуют самой почвой, неоднократно втыкая его в почву по рукоять. Затем точечные пробы почвы смешивают в объединенную пробу, которая помещается в стерильную широкогорлую банку с крышкой, бумажный или полиэтиленовый пакет. К таре прикрепляется этикетка с ин-

двигательным номером пробы, номером площадки, местом и датой отбора, глубиной взятия образца и прочими характеристиками, затем проба доставляется в лабораторию.

Биологическое исследование почвы проводится из свежих образцов в течение 5 часов после пробоотбора. Допускается анализ образцов в течение 2^х суток при низкотемпературных условиях хранения (не более +5 °С) в холодильнике.

При невозможности проведения анализа в течение 2^х суток образцы почвы высушивают на открытом воздухе непосредственно после отбора при температуре не выше +30°С с последующим хранением высушенных образцов в бумажных пакетах в течение не более 3^х месяцев.

Иногда используют метод замораживания почвенных образцов в морозильных камерах. В таком случае микробиологический анализ почвы проводят сразу после ее оттаивания.

В любом случае приемы высушивания и замораживания почвы должны рекомендоваться к использованию как можно реже, так как в таких образцах численность микроорганизмов и их биохимическая активность очень сильно изменяется, что в итоге сказывается на реальности гипотезы исследования.

Глава 2. Подготовка материалов и посуды к микробиологическому анализу

2.1. Помещение и поверхности

В микробиологической лаборатории, содержащейся в чистоте и порядке, регулярно (1-2 раза в неделю) проводят гигиеническую влажную уборку с применением дезинфицирующих средств.

В день проведения микробиологических исследований до и после закладки опыта проводят тщательную дезинфицирующую уборку, которая включает мытье полов дезраствором (2-3% раствор соды, 3-5% раствор фенола или 0,5-3,0% раствор хлорамина), протирание рабочих столов стерильной водой, а затем 70% этиловым или изопропиловым спиртом.

Воздух в лаборатории очищают продолжительным проветриванием через форточку в течение 30-60 мин, которое проводят во время влажной уборки помещения. Затем включают ультрафиолетовое облучение лаборатории не менее чем на 60 мин. Воздействие УФ-лучей на пол, поверхности столов и воздух должно быть продолжительным и не должно встречать препятствий на лучевом потоке; в качестве источника облучения используются специализированные бактерицидные лампы типа ОБН-150, БУФ-15, БУФ-30 и подобные.

Необходимо помнить, что при длительном нахождении человека под ультрафиолетовым облучением оно может вызвать тяжелые поражения сетчатки глаз, что может привести к ухудшению зрения. Поэтому при включении лампы лабораторию незамедлительно покидают на все время обработки, не допуская проникновения в нее посторонних лиц.

Рабочее место требует соблюдения особых условий чистоты. В течение проведения работ на столе поддерживают порядок, до и после работы поверхность тщательно дезинфицируют ватным тампоном, сначала смоченным стерильной водой, затем 3% раствором фенола или, лучше, 70% этанолом. Если поверхность стола кафельная, то после работы также можно воспользоваться дезинфекцией горящим факелом: накрученный на металлический пинцет ватный тампон смачивают в 70% этаноле, поджигают и в горящем виде протирают кафель – сначала вдоль, а затем поперек поверхности.

При выполнении микробиологических исследований нужно строго следить за чистотой рук: периодически во время работы (от этапа к этапу), а также по окончании работы их дезинфицируют ватным тампоном, смоченным в 70% этаноле. В работе с почвой рекомендуется использовать резиновые или латексные перчатки.

Если в исследованиях планируется использование ламинарного бокса, то после предварительной влажной уборки и проветривания помещения внутренние поверхности ламинара протираются стерильной водой и 70% этанолом. Затем в нем включается вытяжная вентиляция и УФ-облучение не менее чем на 20-30 мин. При подготовительной продувке бокса лабораторию также рекомендуется покинуть, так как выходящие из шкафа пары формалина, которым смочены воздушные фильтры, могут быть токсичны для человека.

Во время работы при случайном попадании исследуемого субстрата (почвы или почвенной суспензии) на стерильный стол, его немедленно удаляют сначала сухим ватным тампоном, а затем – смоченным в 70% растворе этанола.

По окончании работы использованные чашки Петри, пробирки, пипетки, шпатели и прочие инструменты сначала обеззараживают, оставляя на 2-3 часа в любом вышеуказанном дезрастворе, затем моют. В конце занятия бактериальные культуры и другой материал студенты сдают преподавателю, а рабочее место приводят в порядок. Перед уходом из лаборатории необходимо вымыть руки с мылом и обработать спиртом.

2.2. Химическая посуда и инструменты

В работе с микробиотой почвы, как правило, требуется большое количество разнообразной химической посуды. Это чашки бактериологические (чашки Петри), пробирки и штативы к ним, ватные и резиновые пробки, конические колбы и пипетки различного объема, автоматические кнопочные микропипетки, шпатели Дригальского, спиртовки, бактериологические петли и прочее. Все множество необходимой посуды перед работой подготавливается мытьем, сушкой, упаковкой и стерилизацией.

Мытье стеклянной посуды проводят в теплом растворе мыла с последующим ополаскиванием в проточной воде. Если посуда достаточно грязная, то в зависимости от степени загрязнения применяют 15-минутное

выдерживание в 10% растворе HCl или хромовой смеси с последующим отмыванием посуды раствором мыла и ополаскиванием в проточной воде.

Сушку посуды проводят на крафт-бумаге, для чашек Петри лицом вниз, для колб и прочего стекла – на боку. На расстеленном бумажном листе раскладывают посуду и естественным образом сушат.

Вся стеклянная посуда перед стерилизацией в обязательном порядке упаковывается в бумагу, в качестве которой обычно используют крафт, оберточную и, за редким исключением, газетную бумагу. Колбы, стаканы и прочие широкогорлые емкости ставят на небольшой лист, края которого заворачивают в горло по спирали. Пипетки заворачивают продовольственным способом по 10 штук, затыкая перед этим концы пипеток ватой; шпатели заворачивают также, но по одному. Фарфоровые чашки – по 5 штук в один небольшой бумажный лист (20×20 см).

Пробирки, необходимые для приготовления разведений почвы, а также для микробиологического посева методом предельных разведений, упаковывают продовольственным способом в большой лист бумаги по 10 штук, предварительно заткнув каждую пробирку ватной пробкой.

Чашки Петри, собранные в комплекты (в комплекте крышка – большего диаметра и дно – меньшего), упаковывают либо по 3-5 штук, выкладывая их стопкой в центр бумажного листа и загибая по два противоположных края к центру, либо по одному комплекту, заворачивая их методом «ушек». Выкладывается один собранный комплект вверх дном на прямоугольный лист бумаги, боковые стороны которого накладываются на середину чашки, заходя друг на друга. Затем верхняя часть бумаги складывается «домиком», также заходя одним краем на другой, а полученный кончик (ушко) загибают на заднюю сторону чашки. Прижимая пальцами ушко к чашке, переворачивают ее ушком вниз и проделывают аналогичную манипуляцию с верхними незагнутыми краями. Завернутые таким образом и собранные в стопку комплекты чашек сами собой держат бумагу, прижимая свои «ушки» соседней чашкой снизу.

Вся стеклянная и фарфоровая посуда, как правило, стерилизуется сухим горячим воздухом в сушильных шкафах. Упакованную посуду помещают в холодный шкаф, нагревают до определенной температуры и выдерживают фиксированное время. По окончании стерилизации шкаф оставляют закрытым для снижения температуры примерно до +70 °С. Затем шкаф приоткрывают, дают полностью остыть и вынимают стерильную

посуду. Продолжительность нагрева зависит от температуры внутри шкафа (табл. 1, табл. 3), но в любом случае ее не рекомендуется повышать более +170°C вследствие сильного обугливания бумаги и ватных пробок.

Таблица 1
Условия стерилизации стеклянной посуды
сухим жаром

Температура, °С	Экспозиция, мин.
140	180
150	150
160	120
170	60

Мелкие металлические инструменты (иглы, пинцеты, ножницы, петли и пр.), а также предметные стекла, стеклянные палочки, горлышки колб и пробирок стерилизуют прокаливанием (фламбированием) в пламени горелки непосредственно перед использованием. В пламени также кратковременно обжигают ватные пробки при *посеве* и *пересеве культур*, розливе сред и воды.

2.3. Вода и питательные среды

Питательные среды и воду обычно стерилизуют насыщенным водяным паром под давлением выше атмосферного (автоклавированием). Подготовленные (сваренные) среды, а также дистиллированную воду разливают в конические колбы на половину объема, плотно закрывают ватной пробкой, которую затем заворачивают в кальку и затягивают шпагатом или резинкой.

Колбы со средами и водой автоклавируют при определенных условиях температуры и давления в соответствии с индивидуальным составом питательных сред, так как далеко не все химические компоненты выдерживают сильное нагревание. Необходимое давление и продолжительность нагрева прописаны индивидуально для каждой среды в соответствующем разделе изучения микробиоты почвы. Стерилизованные питательные среды рекомендуется использовать непосредственно после автоклавирования. Если это невозможно, то после автоклавирования колбы остужают, помещают в холодильник и хранят не более 3^х месяцев.

Воду для микробиологического анализа также можно стерилизовать длительным кипячением (не менее 30 мин. с момента закипания) в кониче-

ской колбе, прикрытой ватной пробкой. После кипячения колбу сразу закрывают пробкой и оставляют остужаться. Из такой воды делают обязательный холостой посев на изучаемую питательную среду и производят контрольный учет непогибших клеток.

Ассортимент питательных сред, используемых в разных отраслях микробиологии и медицины, насчитывает более 1500 видов. Как природные, так и синтетические по происхождению, из них лишь немногие используются в микробиологических исследованиях почвы, поскольку для полноценного описания состояния микробиоценоза почвы достаточно выявить динамику численности некоторых групп микроорганизмов, культивируемых на определенных питательных средах (табл. 2):

Агар Эшби (АЭ) – основная среда для культивирования свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов (свободных diaзотрофов) почвы.

Агар Федорова-Калининской (АФК) – основная среда для культивирования ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов (ассоциативных diaзотрофов) почвы.

Мясопептонный агар (МПА) – среда для культивирования микроорганизмов, способных проводить аммонификацию в почве, т.е. способных потреблять органический азот.

Крахмало-аммиачный агар (КАА) – среда для культивирования микроорганизмов, способных проводить деструкцию олиго-, полисахаридов и иммобилизацию азота, т.е. способных потреблять минеральный (NH_4^+) азот.

Среда Виноградского – среда для культивирования микроорганизмов, способных проводить нитрификацию, то есть способных потреблять минеральный (NO_3^-) азот.

Среда Гильтая – среда для культивирования денитрифицирующих микроорганизмов.

Агар Гетчинсона-Клейтона (АГК) – среда для культивирования аэробных целлюлозолитических микроорганизмов.

Алюмосиликатный агар (АСА) – среда для культивирования силикатных литотрофных микроорганизмов.

Агар Менкиной (АМЕН) – среда для культивирования фосфатных органотрофных микроорганизмов.

Агар Муромцева (АМУР) – среда для культивирования фосфатных литотрофных микроорганизмов.

Голодный агар (ГА) и нитритный агар (НА) – основные среды для культивирования микроорганизмов, участвующих в трансформации гумусовых веществ почвы.

Агар Гаузе № 1 – основная среда для культивирования актиномицетов.

Агар Чапека-Докса кислый – основная среда для культивирования микроскопических мицелиальных грибов.

При обычном приготовлении (варке) питательных сред соли и агар растворяют в 1 л дистиллированной воды в конической колбе при нагревании на асбестовой сетке и постоянном перемешивании стеклянной палочкой.

Приготовление питательных сред зачастую имеет свои особенности, которые для некоторых из них описаны ниже:

Агар Эшби

К 1 литру состава среды при нагревании также добавляют 0,1 г **сульфата калия (K_2SO_4)** и приливают 1 мл **раствора микроэлементов по Федорову**, затем среду доводят до кипения.

Раствор микроэлементов по Федорову (г/л дист. воды): H_3BO_3 – 5,0 г, $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 5,0 г, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 г, KCl – 0,5 г, $NaBr$ – 0,5 г, $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ – 0,3 г. Все реактивы последовательно растворяют в 1-ом литре дистиллированной воды при медленном нагревании на асбестовой сетке и перемешивании стеклянной палочкой.

Агар Федорова-Калининской

К 1 литру состава среды при нагревании также приливают 1 мл **раствора микроэлементов по Федорову** и 0,02 мл **дрожжевого автолизата (экстракта)**, затем среду доводят до кипения.

Дрожжевой автолизат: 10 г сухих дрожжей (типа «Саф-Момент» и пр.) растворяют в небольшой конической колбе в 100 мл дистиллированной воды, добавляют 2-3 кристаллика тимола, прикрывают корковой пробкой и ставят в термостат на 3-х суточную инкубацию при $+50^\circ C$. По мере разжижения дрожжей смесь 1-2 раза в сутки встряхивают. Готовый автолизат должен иметь коричневый оттенок и приятный кондитерский сладковатый запах. Затем содержимое колбы тщательно перемешивают, дово-

дят до кипения на асбестовой сетке, кипятят 20 мин. на слабом огне, фильтруют через бумажный фильтр и автоклавируют при 1,5 атм. в течение 15 мин. Готовый автолизат хранят в холодильнике.

Среда Гильтая

Среда готовится из двух растворов. В первом растворе (250 мл воды) растворяют навески **аспарагина** и **нитрата калия (KNO_3)**, во втором (500 мл воды) – остальные реактивы. Оба раствора сливают в мерную колбу на 1 л и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Алюмосиликатный агар

К 1 литру состава среды также добавляют 1,5 г тонкого порошка **ортофосфата кальция $Ca_3(PO_4)_2$** .

Агар Менкиной

К 1 литру состава среды также добавляют 2,5 г **лецитина**, растворенного в 5 мл 96%-ого этанола.

Агар Муромцева

К 1 литру состава среды также добавляют 0,2 г **сульфата калия K_2SO_4** и 4 г тонкого порошка **ортофосфата кальция $Ca_3(PO_4)_2$** .

Агар Чапека-Докса кислый

Перед автоклавированием в 1 литр состава среды вносят 4 мл концентрированной **молочной кислоты**.

Тщательная подготовка к микробиологическому анализу является залогом получения приемлемых результатов исследования.

Таблица 2

**Химический состав основных синтетических питательных сред,
применяемых в почвенной микробиологии**

		Химические компоненты среды, г/л дистиллированной воды																								
		агар-агар	CaCO ₃							MgSO ₄ • 7H ₂ O	NaCl	KCl	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	KNO ₃	Na ₂ CO ₃	NaNO ₂	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	цитрат Na	аспарагин	глюкоза	сахароза	крахмал	целлюлоза	
Питательная среда	Агар Эмби	20	5,00	-	-	-	-	-	0,20	0,20	-	0,20	-	-	-	-	-	-	2,00	-	-	-	20	-	-	-
	Агар Федорова-Калининской	20	-	-	-	-	-	-	0,50	0,50	-	1,74	0,91	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-
	Мясопептонный агар	Приготовление производится в соответствии с методикой, изложенной на упаковке готового сухого препарата МПА (другие названия питательной среды: питательный агар на основе мяса, мясо-ферментный агар, ГРМ-агар).																								
	Крахмало-аммиачный агар	20	3,00	-	-	-	-	-	1,00	1,00	-	1,00	-	-	-	-	-	-	2,00	-	-	-	10	-	-	-
	Среда Виноградского	-	5,00	-	-	-	-	-	2,00	2,00	-	2,00	-	-	-	-	-	-	2,00	-	-	-	-	-	-	-
	Среда Гильотая	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,10	2,00	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-
	Агар Гетчинсона-Клейтона	15	-	-	-	-	-	-	0,10	0,30	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
	Алюмосиликатный агар	15	2,00	-	-	-	-	-	0,15	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-
	Агар Менкиной	20	5,00	-	-	-	-	-	0,30	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	0,50	-	-	10	-	-	-	-
	Агар Муromцева	30	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	10	-	-	-	-
	Голодный агар	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Нитритный агар Теллер	20	-	-	-	-	-	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Агар Гаузе № 1	20	-	-	-	-	-	-	0,01	0,50	-	0,50	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-
	Агар Чапека-Докса кислый	20	3,00	-	-	-	-	-	0,01	0,50	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-

Таблица 3

Условия стерилизации микробиологических питательных сред

Виды питательных сред	Режим стерилизации	
	давление пара, атм.	экспозиция, мин.
<i>автоклавирование</i>		
натуральные питательные среды (картофельный агар, овсяный агар и т.п.); питательные среды с почвенной вытяжкой	2,0 – 3,0	30
жидкие и агаризованные питательные среды, не содержащие сахаров и других веществ, разлагающихся при +120°C	1,5 – 2,0	20
жидкие и агаризованные питательные среды, содержащие сахара и другие вещества, разлагающихся при +120°C	1,0 – 1,5	20
<i>тиндализация (дробная стерилизация)</i>		
среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревания выше +100°C	прогревание текучим паром в автоклаве с незавинченной крышкой: 2-3 раза по 30-40 мин с периодичностью через сутки. В промежутки между прогреваниями выдерживают в термостате при +30°C в течение 8 ч.	
среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревания (белки, гормоны, некоторые витамины)	многократная фильтрация через бактериальные фильтры	

Глава 3. Принципы и подходы к учету деятельности микроорганизмов почвы

3.1. Роль почвенной микробиоты в формировании плодородия и ее значение в экосистемах

Почва, как биокостное вещество планеты, трансформирует минеральные и органические составляющие остатков растений и животных, внесенных удобрений и почвообразующей породы и, тем самым, определяет свое главное участие в формировании плодородия педосферы – потенциального запаса условий питания и жизни для дикорастущих и культурных растений.

Несмотря на свои малые размеры (масса одной бактериальной клетки не превышает $2 \cdot 10^{-14}$ г, грибной споры – $1 \cdot 10^{-11}$ г) и общее незначительное содержание в почвенном теле (около 1-10% от запаса органического вещества), именно микробное сообщество определяет трансформацию вещества почвы.

Практически все питательные элементы, усваиваемые корнями растений, связаны с микробным преобразованием. Они освобождаются либо в процессе гидролитического распада растительных и животных остатков, либо в результате протекания преобразующих окислительно-восстановительных процессов в почве, осуществляемых также микроорганизмами. С другой стороны, извлечение из пород и удобрений даже таких элементов, как фосфор, калий, железо, кремний, происходит в результате деструкции минералов различными группами *литотрофной* и *органотрофной микробиоты*. При этом, воздействие на минеральную часть не ограничивается очагами развития соответствующих микроорганизмов, но также проявляется и косвенно, путем действия агрессивных органических кислот и полифенолов, образующихся в процессе их метаболизма. Кислотные вещества, фильтруясь через почвенную толщу, вызывают деструкцию минеральной составляющей почвы и удобрений.

Агротехнические и агрохимические приемы повышения урожайности сельскохозяйственных культур также увеличивают количество микроорганизмов в почве и усиливают их жизнедеятельность. При увеличении микробной заселенности почвенной толщи ускоряются минерализационные процессы и увеличивается общая скорость оборачиваемости микробиомассы, а, следовательно, и биогенного вещества, что приводит к упро-

щению вещественного состава почвы, повышению доступности элементов питания и росту ее эффективного плодородия. Именно поэтому для обеспечения формирования потенциального урожая культурных растений значимость определения количественных и качественных характеристик микробного состояния почвы чаще всего имеет не меньшее значение, чем определение химической характеристики почвы. В целом, понимание общего состояния микробиоценоза почв складывается на основе всестороннего рассмотрения его деятельности в виде определения микробной заселенности почвы (общая биомасса микроорганизмов), определения эффективного и потенциального количества микробиоты (относительная численность микроорганизмов) и определения эффективности их жизнедеятельности (биологическая (в том числе биохимическая и метаболическая) активность микроорганизмов).

3.2. Определение биомассы почвенных микроорганизмов

Биомасса микроорганизмов является существенным компонентом органического вещества почв. Относительно его содержания общая микробиомасса составляет 1-4% в почвах умеренной зоны и 2-10% в почвах тропиков. В целом запас сырой биомассы микроорганизмов в пахотном слое колеблется от 0,5 до 15 т/га для бактерий и от 5 до 20 т/га для грибов.

Представляя собою «живой» фонд биогенных элементов, биомасса микроорганизмов накапливает значительные количества азота (более 110 кг/га), фосфора (более 80 кг/га) и калия (более 70 кг/га), а также служит весьма емким резервуаром кальция (более 10 кг/га), серы, кремния и других элементов. Данная планетарная функция почвенного микробиоценоза в виде концентрирования питательных элементов в педосфере образует биохимический барьер на пути вымывания и другого абиогенного удаления вещества из почвы. С другой стороны, высвобождение биогенных элементов в почвенный раствор за счет постепенного отмирания и минерализации накопленной биомассы микробиоты положительно сказывается на образовании потенциального урожая сельскохозяйственных культур.

Несмотря на ежегодные сезонные колебания, показатель общей массы микроорганизмов почвы достаточно консервативен во времени и пространстве, поэтому его более или менее заметное увеличение, приводящее, как правило, к повышению продуктивности пашни, возможно только при

длительных агротехнических и агрохимических воздействиях на агроэкосистему.

Результаты по определению биомассы микроорганизмов почвы могут быть использованы для оценки ее потенциальной биологической активности в зависимости от приемов применения мелиорантов, органических и минеральных удобрений на пашне, а также для оценки негативного агрогенного и техногенного воздействия на почву.

Регидратационный метод определения биомассы микроорганизмов по Благодатскому, Мирчинк и Паникову

Принцип метода

Метод основан на процессе высвобождения в раствор внутриклеточных компонентов микроорганизмов при обезвоживании их клеток. За счет температурной денатурации клеточных белковых структур происходит нарушение целостности цитоплазматических мембран, вследствие чего клеточное вещество выходит в жидкую фазу. При этом мягкое высушивание (регидратация) почвы при умеренно высоких температурах (не более +70°C) не приводит к разрушению почвенного органического вещества. Поэтому такой прием является достаточно специфическим селективным средством воздействия именно на живые микроорганизмы, характеризующиеся в естественном (нативном) состоянии наличием барьера проницаемости.

Учитывая, что среди прочих химических элементов углерод имеет максимальную концентрацию в микробной клетке (табл. 5), общую биомассу микроорганизмов почвы целесообразнее определять именно через его содержание. Поэтому в высвобожденном органическом веществе цитоплазмы клеток колориметрическим способом определяется количество углерода с последующим его пересчетом в собственно микробиомассу, а также в азот, фосфор и другие элементы биомассы микроорганизмов в зависимости от цели исследования.

Ход работы

Навеску свежей почвы в 5 г, просеянной через сито с диаметром ячеек в 5 мм и взвешенной с точностью до 0,01 г, помещают в коническую колбу на 50-100 мл и, не закрывая колбы, ставят в термостат (или сушиль-

ный шкаф) на мягкое высушивание при температуре +65...+70°C на 24 ч. Параллельно ставят навеску почвы для определения влажности.

После завершения высушивания в колбу вливают 25 мл (для типичных серых и темно-серых лесных, черноземных и торфяных почв) или 10 мл (для подзолистых и светло-серых лесных почв) 0,5 М раствора K_2SO_4 и встряхивают на ротаторе в течение 30 мин. Затем суспензию центрифугируют в течение 10 мин при 6000 об./мин. В полученной надосадочной жидкости определяют содержание углерода органических веществ методом бихроматного окисления.

Для этого 1,6 мл прозрачного центрифугата смешивают в пробирке с 2,4 мл сернохромовой смеси, пробирки помещают в разогретый до +140°C сушильный шкаф и выдерживают ровно 20 мин. Вместе с опытными образцами в сушильный шкаф на прогревание также помещают пробирку с 5 мл раствора сернохромовой смеси (холостой раствор для последующего колориметрирования). Затем пробирки вынимают, содержимое охлаждают и колориметрируют при $\lambda = 590$ нм в кюветах на 10 мм против холодного раствора.

Аналогичным образом, определяют углерод органического вещества почвы без мягкого высушивания в термостате, то есть определяют углерод свежей почвы. Для этого также берут навеску в 5 г, но не прогревают ее при +65...+70°C в течение суток, а сразу приливают к ней определенный объем 0,5 М раствора K_2SO_4 и далее в соответствии с методикой.

Построение калибровочного графика

2,5022 г глюкозы или 2,3771 г сахарозы растворяют в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл полученного рабочего раствора будет содержаться 1 мг углерода. Затем в 6 конических колб приливают указанные в таблице 4 исходные объемы рабочего раствора и выпаривают досуха на песчаной или кипящей водяной бане. К полученным осадкам в колбах приливают по 5 мл сернохромовой смеси. Одновременно в отдельной колбе готовят холодной раствор сернохромовой смеси для последующего колориметрического сравнения: в колбу приливают 5 мл сернохромовой смеси. Все 7 колб ставят в разогретый до +140°C сушильный шкаф ровно на 20 мин., затем колориметрируют каждый рабочий раствор при $\lambda = 590$ нм в кюветах на 10 мм. относительно холодного раствора.

По полученным данным строят калибровочный график, где по оси ординат откладывают значения отсчета по прибору (оптические плотности калибровочных растворов), а по оси абсцисс – соответствующие им значения концентрации углерода (мг).

Таблица 4

Исходные данные для построения калибровочного графика

№ колбы	Количество рабочего раствора глюкозы, мл	Содержание С, мг	Отсчет по прибору
1	0,1	0,1	
2	0,5	0,5	
3	1,0	1,0	
4	5,0	5,0	
5	10,0	10,0	
6	15,0	15,0	

Расчет результатов анализа

Полученное по графику содержание С (мг) пересчитывают в углерод микробной биомассы $C_{M/B}$ (мг/1 г абс.-сух. почвы) по следующей формуле:

$$C_{M/B} = (C_{\Pi} - C_C) \cdot K_w / 0,3 \cdot m \quad (1)$$

где $C_{M/B}$ – углерод микробиомассы, мг/1 г абс.-сух. почвы;

C_{Π} – углерод микробной биомассы подсушенной почвы, мг;

C_C – углерод микробной биомассы свежей почвы, мг;

0,3 – поправочный коэффициент, примерно равный доле

клеточных компонентов, высвобождаемых после регидратации;

m – навеска почвы, г;

K_w – поправка на влажность почвы, рассчитываемая по формуле:

$$K_w = (100 + W) / 100 \quad (2)$$

где W – влажность почвы, %.

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец	Масса образца, г	K_w	Углерод подсушенной почвы, мг	Углерод свежей почвы, мг	Углерод микробиомассы, мг/г абс.-сух.почвы	Запас микробной массы, кг/га	Оценка обогащенности
№	m		C_{Π}	C_C	$C_{M/B}$	–	Табл. 6

Если помимо углерода необходимо посчитать накопленный микробными клетками азот, фосфор или другой элемент, то по пропорции перево-

дят полученное значение микробного углерода в биомассу элемента с помощью данных таблицы 6.

Если же необходимо посчитать собственно биомассу микроорганизмов, то, исходя из того, что химический состав всех бактериальных клеток почвы примерно одинаков (табл. 5), полученное значение концентрации углерода умножают на коэффициент перевода **2** и получают микробную биомассу в мг на 1 г абс.-сух. почвы, которую далее можно пересчитать в кг/га.

Таблица 5

Приблизительный элементный состав бактериальной клетки

Элемент	Среднее содержание в клетке, % от сух. вещества	Элемент	Среднее содержание в клетке, % от сух. вещества
C	50	K	1
O	20	Na	1
N	14	Ca	0,5
H	8	Mg	0,5
P	3	Fe	0,2
S	1	прочие	≈ 0,3

Реактивы

- 1) **раствор K_2SO_4 – 0,5 М:** 87 г сульфата калия растворяют в 500 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л, затем доводят до метки водой.
- 2) **серно-хромовая смесь:** 6 г бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) растворяют в 400 мл дистиллированной воды, затем к полученному раствору в термостойчивой колбе осторожно приливают 2 л конц. H_2SO_4 (пл. 1,84).

Трактовка полученных результатов

Полученные значения биомассы микробиоценоза почвы оцениваются по ориентировочной обогащенности в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6

Шкала степени обогащенности почвы биомассой микроорганизмов (Звягинцев Д.Г., 1980)

Степень обогащенности почвы микробной биомассой	Сухая биомасса бактерий, кг/га
очень бедная	< 42
бедная	43 – 85
средней обогащенности	86 – 170
богатая	171 – 340
очень богатая	> 341

Таким образом, определение биомассы микроорганизмов почвы является первым этапом составления микробиологической характеристики агроценоза и любой другой экосистемы, а также начальным оценочным критерием преобразования биогенного вещества в педосфере.

3.3. Определение относительной численности почвенных микроорганизмов

Вся микробная биомасса почвы состоит из огромного количества самых разнообразных по таксономическому уровню, морфологическому строению и физиолого-биохимической организации микроорганизмов. По современным подсчетам общая численность микробиоценоза почвы может колебаться от 200 млн. до 10 млрд. и более клеток на 1 г почвы, а суммарная длина гифов грибов – до нескольких сотен метров на 1 г почвы.

Несмотря на огромное количество микроорганизмов в почве и масштабность выполняемых ими функций, существуют методы, позволяющие достаточно точно учитывать численность почвенной микробиоты.

Принципиально количество микроорганизмов почвы может быть определено двумя способами:

1) **непосредственный учет**, основанный на методах микроскопирования почвенной суспензии по Виноградскому с помощью световых и электронных микроскопов. В ходе определения подсчитываются живые и мертвые клетки микроорганизмов, а также измеряется длина гифов грибов, которые затем пересчитываются на единицу массы почвы. Главным достоинством этого метода является определение максимально приближенной к реальным значениям численности микроорганизмов, однако этот метод не дает понятия о распределении всего микробного пула почвы по выполняемым функциям;

2) **косвенный учет**, основанный на постановке различных опытов с почвой, имеющих целью определение *микробиологического отклика* и его пересчета в численность микробного пула.

Методы косвенного учета численности микроорганизмов являются самыми многочисленными и распространенными в использовании. Из всего их многообразия выделяют основные:

а) **Метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии** по Осипову (метод ГХ-МС). Суть метода сводится к идентификации и количественно-

му определению специфических веществ (маркеров) в компонентах клеток микроорганизмов и в их метаболитах. В качестве маркеров обычно учитываются альдегиды, стероидные соединения и жирные кислоты, которые химическим путем извлекаются из микробиомассы почвы, отправляются на газо-жидкостный хроматограф, разделяются по веществам и анализируются масс-спектрометрическим способом. В итоге исследователь получает данные о концентрации определенных маркеров, на основе которых с помощью компьютерных программ восстанавливается структура и учитывается численность микробного сообщества почвы.

К достоинствам данного метода относится определение очень большого числа видов микроорганизмов и их количества в одной пробе почвы (до нескольких десятков видов), возможность идентификации многих групп микробиоценоза (бактерии, актиномицеты, грибы и др.), а также быстрота проведения анализа по сравнению с традиционным чашечным методом (вся процедура анализа занимает не более 3-х часов). Главным недостатком метода является возможность определения только тех видов (и, соответственно, количества) микроорганизмов, для которых известен идентифицирующий маркер. Также метод требует у исследователя глубоких знаний в области физиологии микроорганизмов и нуждается в использовании дорогостоящего оборудования.

б) Метод мультисубстратного тестирования по Горленко и Кожевину (метод МСТ). Суть метода сводится к преднамеренной инициации (активирования) микробного сообщества почвы определенным веществом (субстратом) с последующим учетом микробиологического отклика на субстрат при помощи индикаторов. В качестве вводимых веществ используются самые разнообразные органические соединения класса сахаров, спиртов, органических кислот и их солей, аминов, аминокислот, нуклеозидов и некоторых полимеров (всего около 150 веществ). При потреблении определенного субстрата микробиотой почвы цвет индикатора изменяется, а интенсивность изменения окраски, учитываемая фотометрическим способом, используется для пересчета в количество микроорганизмов. В итоге исследователь получает соотношение степени потребления того или иного субстрата микробиоценозом исследуемой почвы, на основе чего с помощью компьютерных программ рассчитывается численность и видовое разнообразие микробиоты.

Данный метод позволяет определить не только численность и видовой состав микробного сообщества почвы, но и определить доминирующий процесс в питании микроорганизмов и, соответственно, в состоянии их *сукцессии*. Недостатком метода является потребность в специфическом оборудовании и наличии специализированных компьютерных программ.

в) Метод посева

Метод посева (чашечный метод) почвенной суспензии на *питательную среду* в настоящее время является одним из самых распространенных способов определения численности микроорганизмов почвы. Несмотря на его глубокую историю (в биологию почв метод пришел из медицинской микробиологии во II-ой пол. XIX века) и сравнительную неточность определения численности микроорганизмов (табл. 7), относительная дешевизна применяемых средств и простота работы делают его одним из универсальнейших приемов количественного учета микробиоты почвы.

Таблица 7

Сравнение численности микроорганизмов дерново-подзолистой почвы, определенной различными методами (Мишустин Е.Н., 1972)

Метод определения численности микроорганизмов почвы	Численность клеток в 1 г почвы	Коэффициент отношения
посев на питательные среды	$1 \cdot 10^6 - 3 \cdot 10^6$	1
прямой подсчет под оптическим микроскопом	$5 \cdot 10^8 - 20 \cdot 10^8$	150-1500
прямой подсчет под электронным микроскопом	$20 \cdot 10^9 - 25 \cdot 10^9$	до 15000

Другим неоспоримым достоинством данного метода является возможность селективного определения функционально разнородных *популяций микробного пула* почвы. То есть, при определении численности микробиоты на различных питательных средах, исследователь получает данные по количеству микроорганизмов, выполняющих определенную функцию в почве, будь то аммонификация белков растительных остатков или ассоциативная азотфиксация. Поэтому данный метод имеет большое значение в изучении экологии микробиоценоза почв. Единственным недостатком метода является то, что даже самые универсальные питательные среды выявляют не более 10-15% всей почвенной микробиоты. Кроме того, техника посева достаточно продолжительна во времени и громоздка в количестве используемой химической посуды.

В зависимости от того, может ли развиваться изучаемая функциональная группа микроорганизмов на твердых или жидких питательных средах, применяют методы посева соответственно на твердые (метод Коха) или жидкие (метод предельных разведений) среды.

Метод посева на твердые питательные среды по Коху с разведением почвы по Пастеру

Принцип метода

В основе метода лежит принцип Коха, который заключается в том, что при посеве почвенной суспензии на твердую питательную среду одна вырастающая колония является потомством одной клетки какого-либо микроорганизма – бактерии или ее споры, актиномицета, споры или гифы гриба. При этом питательная среда и искусственно создаваемые оптимальные условия определяют рост какой-либо одной *ассоциации микроорганизмов почвы*, то есть определяют количественное развитие одной функции микробного пула.

В итоге полученное после инкубации число выросших колоний на чашке пересчитывают в число колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г почвы с учетом степени разведения почвы и аликвоты посеянной почвенной суспензии.

Определение числа микроорганизмов таким методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Оптимальное разведение почвенной суспензии, в которой все клетки прокариот и гифы грибов должны быть максимально изолированы друг от друга, подбирают таким образом, чтобы в последующем на чашке развивалось 50-200 колоний бактерий или актиномицетов и 30-50 колоний грибов. Цель разведения почвы водой одна – сделать число выросших на среде колоний доступным для подсчета. Поэтому разведение зависит, главным образом, от изучаемой группы микробиоценоза, типа почвы и степени ее окультуренности.

При посеве на среду приготовленного разведения высевается минимальное количество суспензии, так как численность микроорганизмов в ней продолжает быть достаточно высокой. При этом важно знать точный объем высеваемой аликвоты, так как он учитывается при последующем пересчете.

Подсчет выросших колоний микроорганизмов проводят по истечении определенного времени инкубации чашек в термостате, которую проводят при определенной температуре. Важно, что колонии могут быть самыми разнообразными, поэтому при подсчете следует обращать внимание не только на крупные видимые образования, выросшие на питательной среде, но и на саму поверхность среды, где колонии могут быть, например, почти неокрашенными или едва заметными по размеру.

Ход работы

1) После подготовки к посеву всей необходимой посуды и стерилизации лаборатории, прежде всего, на водяную баню ставят колбы со стерильными питательными средами для их расплавления.

2) На стерильной белой бумаге равномерным слоем распределяют объединенную пробу свежей почвы, отбирают видимые комочки, камни и другие посторонние включения. Затем методом квартования уменьшают массу примерно до 100 г: стерильной металлической линейкой перемешивают и распределяют почву по поверхности бумаги, делят по диагоналям на четыре треугольника, любые два противоположных отбрасывают, а оставшиеся две части снова смешивают и делят линейкой. И так поступают до зрительного уменьшения массы почвы до 100 г.

3) Затем из 5-10 разных мест слоя оставшейся почвы стерильным шпателем отбирают небольшие порции, смешивают их на стерильной кальке в одну испытуемую пробу и взвешивают 10 г (с точностью до 0,01 г). Пробу помещают в стерильную фарфоровую чашку 2 (рис. 1) и мягко растирают до однородной массы в течение 5 мин. с небольшим количеством стерильной воды (≈ 10 мл) стерильным резиновым пестиком, резиновым наконечником стеклянной палочки или пальцем в резиновой перчатке (стерилизацию проводят обработкой 70% этанолом). Полученную массу количественно переносят в стерильную коническую колбу 3 на 100 мл, при этом чашку 2 обмывают небольшими порциями воды и переливают содержимое в колбу. В итоге переноса почвенной суспензии и обмывания фарфоровой чашки соотношение «почва : вода» в колбе 3 должно равняться «10 г : 90 мл».

Если почва достаточно рыхлая, то разрешается не растирать ее с водой в чашке 2, а сразу поместить навеску в коническую колбу 3 и залить ее 90 мл

стерильной воды. Затем колбу закрывают резиновой пробкой, протертой 70% этанолом, и встряхивают на ротаторе в течение не менее 1 часа.

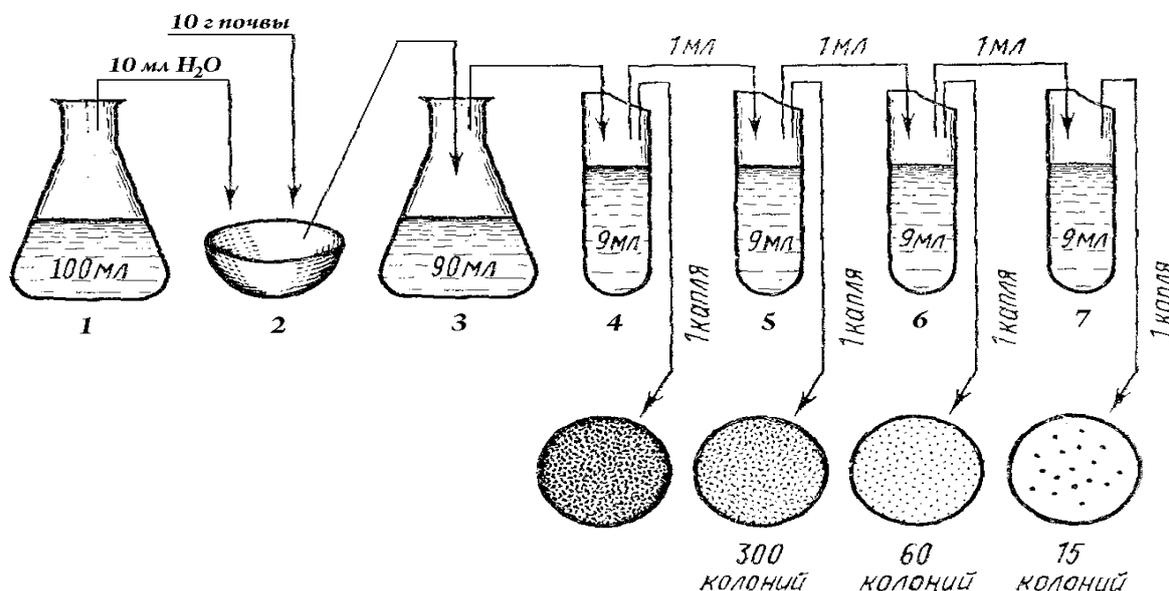


Рис. 1. Схема приготовления разведений почвенной суспензии

Аналогичную операцию проводят со всеми образцами почвы (рис. 2), поступившими на анализ. При этом, количество колб численно будет равно количеству изучаемых вариантов.

Таким образом, получают первичное разведение почвы 10^{-1} . Все операции по первичному разведению проводят в стерильных условиях при обязательном горении одной-двух спиртовок.

4) За время встряхивания суспензии на другой рабочий стол, протертый 70% этанолом, ставят горячие спиртовки, разворачивают из бумаги стерильные чашки Петри, раскладывают на столе и подписывают карандашом по стеклу или смываемым маркером, помечая аббревиатуру питательной среды (МПА, КАА, Чапека и т.п.), вариант, повторение и номер параллельной чашки. Суспензию каждого образца почвы высевают на 3-5 параллельных чашек.

5) Далее приступают к розливу сред по чашкам. Расплавленные к тому времени питательные среды переносят с водяной бани и, в условиях горения одной-двух спиртовок, разливают по подписанным чашкам Петри: одной рукой приоткрывают крышку чашки на максимальную высоту, при которой будет удобно другой рукой влить из колбы небольшую порцию среды, полностью покрывающей дно чашки слоем не более 0,5 см. После

чего чашку немедленно закрывают. Среду лучше разливать при ее температуре около $+50^{\circ}\text{C}$ (максимальная терпимость приложенной руки к колбе со средой), так как в таком случае количество конденсата на крышке чашки со средой будет минимальным.



Рис. 2. Приготовление первичного разведения почвы



Рис. 3. Приготовление последующих разведений почвы

б) После этого подготавливают серию пробирок для приготовления последующих разведений почвенной суспензии. Большой штатив заполняется пробирками с ватными пробками. При этом штатив удобнее разместить так, чтобы пробирки исследуемых вариантов (рис. 3) располагались лицом к исследователю, а пробирки с последующим разведением почвы располагались от себя с увеличением степени разведения.

Затем, в условиях горения одной-двух спиртовок, из большой конической колбы со стерильной водой стерильной автоматической поршневой пипеткой на 10 мл в каждую пробирку приливают по 9 мл воды. Время с момента открытия ватной пробки, вливания воды и закрытия пробирки, при этом, должно быть минимальным. Перед закрытием пробирки ее горлышко и ватную пробку слегка обжигают в пламени спиртовки.

Таким образом, заполняют водой все необходимое количество пробирок, которое находят по таблице 8. Если планируется посев почвенной суспензии на несколько питательных сред, то необходимое количество пробирок находят по максимальному разведению почвы, необходимому для посева на ту или иную среду. Предел разведения указан в соответствующем разделе учебного пособия по изучению функций микробиоценоза почвы.

7) Приступают к дальнейшему разведению почвенной суспензии. С ротатора снимают колбы с первичным разведением, и, в условиях горения одной-двух спиртовок, каждый вариант последовательно разводят в своей серии пробирок (рис. 3) до определенной степени. Для этого берут из штатива первую пробирку с водой (пробирка **4** на рис. 1) для приготовления разведения 10^{-2} , быстро открывают ватную пробку и стерильной поршневой пипеткой на 1-2 мл из конической колбы **3** (рис. 1) с первичным разведением переносят в пробирку 1 мл почвенной суспензии, предварительно взболтав его в колбе. Пробку и горлышко пробирки обжигают в пламени горелки и закрывают пробирку. Затем берут следующую пробирку (пробирка **5** на рис. 1) для разведения 10^{-3} , быстро открывают ватную пробку и новой стерильной поршневой пипеткой из пробирки **4** с разведением 10^{-2} , предварительно взболтав, переносят 1 мл почвенной суспензии в пробирку **5**. И так далее разбавляют суспензию в пробирках **6, 7, 8** до конечного разведения, при этом всегда пользуются новой стерильной пипеткой.

Таблица 8

Количество пробирок, необходимое для приготовления разведений почвы

Количество почвенных образцов	Предел разведения почвы								
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	2	4	6	8	10	12	14	16	18
3	3	6	9	12	15	18	21	24	27
4	4	8	12	16	20	24	28	32	36
5	5	10	15	20	25	30	35	40	45
6	6	12	18	24	30	36	42	48	54
7	7	14	21	28	35	42	49	56	63
8	8	16	24	32	40	48	56	64	72
9	9	18	27	36	45	54	63	72	81
10	10	20	30	40	50	60	70	80	90

8) Далее производят посев полученного разведения на чашки Петри. Штатив с пробирками перемещают на стол с подготовленными чашками Петри, и, в условиях горения одной-двух спиртовок, автоматической кнопочной пипеткой на фиксированный объем аликвоты, немного приоткрыв

крышку чашки, наносят на поверхность среды аликвоту суспензии (0,01-0,05 мл) из того разведения (а, следовательно, пробирки), которое требуется посеять.

Наконечник пипетки, при этом, должен быть заранее простерилизован в 70% этаноле и должен использоваться для засева чашек только одного разведения одного образца почвы.

Затем берут стеклянный шпатель Дригальского (рис. 4), смачивают его треугольную часть в стакане с 70% этанолом, поджигают, дают прогореть спирту, охлаждают на воздухе над горячей спиртовкой и, немного приоткрывая чашку Петри, равномерно распределяют шпателем ранее внесенную каплю почвенной суспензии по поверхности питательной среды, чашку закрывают. Каждый раз перед новой чашкой шпатель стерилизуют горящим спиртом.



Рис. 4. Микробиологический шпатель Дригальского

9) Затем все засеянные чашки осторожно, **не открывая**, собирают в стопки дном вверх и помещают в термостат на *инкубацию*.

Температура и продолжительность инкубации зависят от учитываемой группы микроорганизмов почвы. Ежедневно засеянные чашки Петри просматриваются на наличие и обилие растущих колоний как на поверхности среды, так и в проходящем свете (на просвет). При наступлении оптимального разрастания колоний по чашке, которое определяется исследователем визуально, а также с учетом ориентировочного времени инкубации, чашки вынимают из термостата и подсчитывают численность колоний.

Подсчет колоний и расчет результатов анализа

Чашку кладут на черное поле (для этого можно использовать лист черной бумаги или пластика), открывают и производят подсчет всех изолированных друг от друга колоний микроорганизмов методом повреждения (при подсчете каждую новую колонию царапают шпателем или бактериологической иглой). При этом обязательно всматриваются в поверхность среды на предмет обнаружения бесцветных или очень мелких коло-

ниальных единиц. Наличие мелких образований также учитывается просмотром в проходящем свете (осмотр на просвет), а бесцветных – при изменении угла осмотра поверхности среды на предмет характерного блеска колоний (осмотр под углом).

Подсчитанное число колоний (ед.) пересчитывают в число колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г абс.-сух. почвы по формуле:

$$\text{Число КОЕ} = Ч_{\text{К}} \cdot K_{\text{А}} \cdot P_{\text{ПС}} / m_{\text{W}} \quad (3)$$

где Число КОЕ – численность микроорганизмов, ед. КОЕ в 1 г абс.-сух. почвы;

$Ч_{\text{К}}$ – количество подсчитанных на одной чашке колоний, шт.;

$K_{\text{А}}$ – коэффициент посеянной аликвоты почвенной суспензии,

для 0,1 мл = 10, для 0,05 мл = 20, для 0,01 мл = 100;

$P_{\text{ПС}}$ – разведение засеянной почвенной суспензии, для $10^{-2} = 100$,

для $10^{-3} = 1000$, для $10^{-4} = 10000$, для $10^{-5} = 100000$,

для $10^{-6} = 1000000$;

m_{W} – масса абс.-сух. почвы в 1 г свежей почвы,

рассчитываемая по формуле:

$$m_{\text{W}} = 1 - (W/100) \quad (4)$$

где W – влажность почвы, %.

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец	Масса образца, г	Число колоний на чашке, шт	Коэфф-т аликвоты	Разведение суспензии	Численность, ед. КОЕ в 1 г абс.-сух. почвы	Оценка численности
№	m_{W}	$Ч_{\text{К}}$	$K_{\text{А}}$	$P_{\text{ПС}}$	Число КОЕ	табл. 13, 24

Метод посева на жидкие питательные среды способом предельных разведений почвы

Метод используют для определения численности микроорганизмов, которые плохо или совсем не растут на твердых питательных средах. Сюда входит определение числа нитрифицирующих, денитрифицирующих, целлюлозолитических и других групп микроорганизмов почвы.

Принцип метода

Метод основан на проявлении развития той или иной группы микроорганизмов при их *культивировании* в пробирках с питательной средой, с последующей идентификацией наличия микроорганизмов с помощью специфических изменений в среде (появление мутности, пленок, осадка, пузырьков газа, неприятного запаха, положительной реакции с реактивом-индикатором процесса).

В результате чего из числа всех зараженных почвенной суспензией пробирок отмечаются те, в которых наблюдается положительный рост данной группы микробиоты и рассчитывается наиболее вероятное количество клеток микроорганизмов в 1 г почвы. При этом метод усложняется тем, что один образец почвы должен высеваться в пробирки на среду одновременно из нескольких разведений, каждое из которых высевается еще и в нескольких повторениях (посев на параллельные пробирки).

Таким образом, определение количества микроорганизмов данным методом включает приготовление разведений почвы, посев на жидкую питательную среду в пробирки, регистрацию наличия или отсутствия микробиологического отклика после инкубации и расчет наиболее вероятного числа микроорганизмов с использованием таблицы Мак-Креди, разработанной на основании обработки многочисленных результатов методом вариационной статистики (смотри далее табл. 12).

Ход работы

1) Приготовление первичного разведения почвы, а также разведение почвенной суспензии до необходимой степени готовят в отдельном штативе аналогично приготовлению разведения для чашечного метода посева (см. выше).

2) Затем подготавливают серию пробирок для розлива жидкой питательной среды (рис. 5). Большие штативы заполняются пробирками, заткнутыми ватными или резиновыми пробками. Если пробки ватные, то пробирки заранее стерилизуются вместе с пробками, если же пробки резиновые, то пробирки стерилизуются без пробок, а пробки обрабатываются по одной ватным тампоном, смоченным в 70% этаноле непосредственно перед затыканием пробирок. Операция стерилизации пробок и заполнения штативов проводится в условиях горения одной-двух спиртовок.

Нужно понять, что сначала засеваются все параллельные (одинаковые) пробирки одной степени разведения одного варианта, начиная с малого разведения. Когда они заражены, приступают к засеву среды следующей (бóльшей) степени разведения того же варианта. Когда же все планируемые к посеву на среду разведения первого варианта засеяны, снова переходят к посеву малого разведения уже второго варианта и так далее. В зависимости от количества образцов почвы, количества параллельных пробирок и диапазона засеваемой степени разведения число пробирок для посева находят по таблице 9.

Таблица 9

Количество пробирок, необходимое для посева

N*	Диапазон засеваемой степени разведения почвы и число параллельных пробирок															
	$10^{-2} - 10^{-3}$				$10^{-2} - 10^{-4}$				$10^{-2} - 10^{-5}$				$10^{-2} - 10^{-6}$			
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5
1	4	6	8	10	6	9	12	15	8	12	16	20	10	15	20	25
2	8	12	16	20	12	18	24	30	16	24	32	40	20	30	40	50
3	12	18	24	30	18	27	36	45	24	36	48	60	30	45	60	75
4	16	24	32	40	24	36	48	60	32	48	64	80	40	60	80	100
5	20	30	40	50	30	45	60	75	40	60	80	100	50	75	100	125

N* - исходное количество образцов почвы

Далее пробирки подписывают. Для быстроты работы лучше использовать смываемый маркер. На пробирке ставится вариант, степень разведения и номер параллельной пробирки. Например, надпись на пробирке будет означать второй вариант в степени разведения 10^{-2} , **2^{-2} (1)** которая засеивается в первую параллельную пробирку.

3) Затем, в условиях горения одной-двух спиртовок, из большой конической колбы со стерильной питательной средой стерильной автоматической поршневой пипеткой на 5-10 мл вносят в каждую пробирку по 5-10 мл среды в зависимости от изучаемой культуры микроорганизмов; количество среды должно быть одинаковым во всех пробирках (рис. 6). Время с момента открытия резиновой пробки, вливания среды и закрытия пробирки, при этом, должно быть минимальным. Перед закрытием пробирки ее горлышко слегка обжигают в пламени спиртовки, а резиновую пробку протирают 70% спиртом.

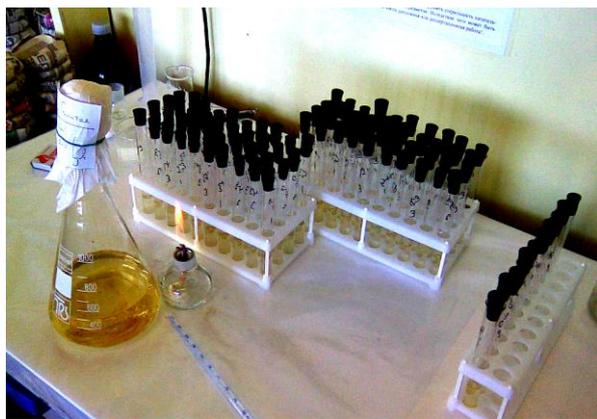


Рис. 5. Приготовление пробирок с питательной средой



Рис. 6. Техника микробиологического посева на жидкую среду

Затем приступают к заражению стерильной среды почвенной суспензией. Для этого берут еще один небольшой штатив (рис. 6), перемещают в него из общего штатива со средой все параллельные пробирки одной степени разведения одного варианта, берут автоматическую кнопочную пипетку и, в условиях горения одной-двух спиртовок, приоткрывая поочередно все параллельные пробирки, вносят в среду аликвоту почвенной суспензии из пробирки того разведения, которое соответствует надписи на пробирке со средой. Пробки снова протирают 70% этанолом, закрывают пробирки и помещают на прежнее место в большом штативе. Наконечник автоматической пипетки должен быть заранее простерилизован в 70% этаноле и должен использоваться только для одного разведения одного образца почвы.

После засева пробирок всех вариантов штативы помещают в термостат на инкубацию. Условия инкубации зависят от учитываемой группы микробиоценоза почвы. Ежедневно засеянные пробирки просматриваются в проходящем свете (на просвет) на предмет появления микробиологического отклика – признаков развития микроорганизмов в столбике питательной среды (появление пузырьков газа, мутности, пленок и т.д.). При очевидно оптимальном развитии микроорганизмов в пробирке, которое определяется исследователем визуально, а также с учетом ориентировочного времени инкубации, штативы вынимают из термостата и фиксируют наличие микробиоты.

Регистрация развития микроорганизмов и расчет результатов анализа

Пробирки вынимают из общего штатива партиями в числе параллельных пробирок первой посеянной степени разведения первого варианта и на темном фоне тщательно просматривают столбик среды на предмет микробиологического отклика. Фиксируют, в каком количестве параллельных пробирок первой степени разведения, начиная с малой, обнаруживается рост микроорганизмов. Затем берут партию параллельных пробирок следующей степени разведения этого же варианта, проводят те же наблюдения и учеты, затем – следующую и так далее.

В итоге для одного исследуемого образца почвы необходимо составить *числовую характеристику посева* в виде комбинации трех цифр. Первая цифра слева (сотни) показывает число пробирок в том последнем разведении, при высеве из которого во всех засеянных пробирках был отмечен рост микроорганизмов. Две следующие цифры (десятки и единицы) обозначают число пробирок, в которых отмечен рост микроорганизмов при высеве из двух последующих разведений (см. примеры в таблицах 10 и 11).

Таблица 10

Пример 1 подсчета числовой характеристики почвенной суспензии

Последовательность действий	Степень разведения почвы				
	0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Число засеянных пробирок каждого разведения	4	4	4	4	4
Число пробирок, в которых обнаружен рост	4	4	3	1	0
Числовая характеристика	431				
Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов	16,5				

Таблица 11

Пример 2 подсчета числовой характеристики почвенной суспензии

Последовательность действий	Степень разведения почвы				
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число засеянных пробирок каждого разведения	3	3	3	3	3
Число пробирок, в которых обнаружен рост	3	3	3	2	1
Числовая характеристика	321				
Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов	3,0				

После составления числовой характеристики почвенной суспензии находят наиболее вероятное число клеток микроорганизмов в объеме засеянной аликвоты. Для этого пользуются статистической таблицей 12.

Таблица 12

**Наиболее вероятное количество клеток микроорганизмов
в единице объема исходной суспензии почвы по Мак-Креди**

Число- вая харак- тери- стика	Количество клеток микроорга- низмов при засеве параллельных пробирок в числе ...				Число- вая характе- ристика	Количество клеток микроор- ганизмов при засеве парал- лельных пробирок в числе ...				Число- вая харак- тери- стика	Количество клеток мик- роорганизмов при засеве параллельных пробирок в числе ...			
	2-х	3-х	4-х	5-ти		2-х	3-х	4-х	5-ти		2-х	3-х	4-х	5-ти
000	0	0	0	0	222	110,0	3,5	2,0	1,4	432	–	–	20,0	4,0
001	0,5	0,3	0,2	0,2	223	–	4,0	–	–	433	–	–	30,0	–
002	–	–	0,5	0,4	230	–	3,0	1,7	1,2	434	–	–	35,0	–
003	–	–	0,7	–	231	–	3,5	2,0	1,4	440	–	–	25,0	3,5
010	0,5	0,3	0,2	0,2	232	–	4,0	–	–	441	–	–	40,0	4,0
011	0,9	0,9	0,5	0,4	240	–	–	2,0	1,4	442	–	–	70,0	–
012	–	–	0,7	0,6	241	–	–	3,0	–	443	–	–	140,0	–
013	–	–	0,9	–	300	–	2,5	1,1	0,8	444	–	–	160,0	–
020	0,9	0,6	0,5	0,5	301	–	4,0	1,6	1,1	450	–	–	–	4,0
021	–	–	0,7	0,6	302	–	6,5	2,0	1,4	451	–	–	–	5,0
022	–	–	0,9	–	303	–	–	2,5	–	500	–	–	–	2,5
030	–	–	0,7	0,6	310	–	4,5	1,6	1,1	501	–	–	–	0,3
031	–	–	0,9	–	311	–	7,5	2,0	1,4	502	–	–	–	4,0
040	–	–	0,9	–	312	–	11,5	3,0	1,7	503	–	–	–	6,0
041	–	–	1,2	–	313	–	16,5	3,5	2,0	504	–	–	–	7,5
100	0,6	0,4	0,3	0,2	320	–	9,5	2,0	1,4	510	–	–	–	3,5
101	1,2	0,7	0,5	0,4	321	–	15,0	3,0	1,7	511	–	–	–	4,5
102	–	1,1	0,8	0,6	322	–	20,0	3,5	2,0	512	–	–	–	6,0
103	–	–	1,0	0,8	323	–	30,0	–	–	520	–	–	–	5,0
110	1,3	0,7	0,5	0,4	330	–	25,0	3,0	1,7	521	–	–	–	7,0
111	2,0	1,1	0,8	0,8	331	–	45,0	3,5	2,0	522	–	–	–	9,5
112	–	–	1,1	0,8	332	–	110,0	4,0	–	523	–	–	–	12,0
113	–	–	1,3	–	333	–	140,0	5,0	–	524	–	–	–	15,0
120	2,0	1,1	0,8	0,6	340	–	–	3,5	2,0	525	–	–	–	17,5
121	3,0	1,5	1,1	0,8	341	–	–	4,5	2,5	530	–	–	–	8,0
122	–	–	1,3	1,0	350	–	–	–	2,5	531	–	–	–	11,0
123	–	–	1,6	–	400	–	–	2,5	1,3	532	–	–	–	14,0
130	–	1,6	1,1	1,8	401	–	–	3,5	1,7	533	–	–	–	17,5
131	–	–	1,4	1,0	402	–	–	5,0	2,0	534	–	–	–	20,0
132	–	–	1,6	–	403	–	–	7,0	2,5	535	–	–	–	25,0
140	–	–	1,4	1,1	410	–	–	3,5	1,7	540	–	–	–	13,0
141	–	–	1,7	–	411	–	–	5,5	2,0	541	–	–	–	17,0
200	2,5	0,9	0,6	0,5	412	–	–	8,2	2,5	542	–	–	–	25,0
201	5,0	1,4	0,9	0,7	413	–	–	8,0	–	543	–	–	–	30,0
202	–	2,0	1,2	0,9	414	–	–	14,0	–	544	–	–	–	35,0
203	–	–	1,6	1,2	420	–	–	6,0	2,0	545	–	–	–	45,0
210	6,0	1,5	0,9	0,7	421	–	–	6,5	2,5	550	–	–	–	25,0
211	13,0	2,0	1,3	0,9	422	–	–	17,0	–	551	–	–	–	35,0
212	2,0	3,0	1,6	1,2	423	–	–	13,0	3,0	552	–	–	–	60,0
213	–	–	2,0	–	424	–	–	20,0	–	553	–	–	–	90,0
220	25,0	2,0	1,3	0,9	430	–	–	11,5	1,5	554	–	–	–	100,0
221	70,0	3,0	1,6	1,2	431	–	–	16,5	3,0	555	–	–	–	180,0

Определенное по таблице 12 число клеток микроорганизмов (ед.) пересчитывают в численность микробиоты в 1 г абс.-сух. почвы по формуле:

$$\text{Численность} = \text{Ч}_K \cdot \text{K}_A \cdot \text{P}_{\text{ПС}} / m_W \quad (5)$$

где Численность – численность микроорганизмов, ед. в 1 г абс.-сух. почвы;
 Ч_K – определенное по таблице Мак-Креди число микробных клеток, ед.;
 K_A – коэффициент посеянной аликвоты почвенной суспензии,
 для 0,1 мл = 10, для 0,05 мл = 20, для 0,01 мл = 100;
 $\text{P}_{\text{ПС}}$ – последнее разведение почвенной суспензии, при высеве из которого во всех засеянных пробирках наблюдался микробный отклик:
 для $10^{-2} = 100$, для $10^{-3} = 1000$, для $10^{-4} = 10000$ и т.д.;
 m_W – масса абс.-сух. почвы в 1 г свежей почвы,
 рассчитываемая по формуле (4).

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец	Масса образца, г	Диапазон засеваемого разведения	Число параллельных пробирок, шт	Коэфф-т аликвоты	Численность, ед. в 1 г абс.-сух. почвы	Оценка численности
№	m_W	$10^{\dots} - 10^{\dots}$	2, 3, 4 или 5	K_A	Численность	табл. 13, 24

Трактовка полученных результатов

Полученные значения численности микроорганизмов той или иной группы микробного сообщества почвы, определенные методом посева или методом предельных разведений, оцениваются по шкале ориентировочной обогащенности почвы микробиотой в соответствии с таблицей 13.

Таблица 13

Шкала для оценки степени обогащенности почвы микроорганизмами (Звягинцев Д.Г., 1980)

Степень обогащенности почвы микробиотой	Количество микроорганизмов, млн. ед./1 г почвы	
	на МПА *, пептонной воде **	на КАА *, средах Чапека *, Эшби *, Муромцева *, Виноградского **
очень бедная	< 1	< 2
бедная	1 – 2	2 – 4
средней обогащенности	3 – 5	5 – 10
богатая	6 – 10	11 – 20
очень богатая	> 11	> 21

* – твердые питательные среды, ** – жидкие питательные среды

Определение численности определенной стороны (или функции) микробиоценоза почвы является таким же значимым этапом микробиологической характеристики почвы, как и определение биомассы микроорганизмов, поскольку позволяет судить о направленности преобразования вещества в почве и высвобождения в почвенный раствор того или иного биогенного вещества.

3.4. Определение биологической активности почвенных микроорганизмов

Не менее важным фактором формирования почвенного плодородия является биологическая активность микроорганизмов, которая, по сути, является совокупностью биохимических реакций трансформации почвенного вещества. В результате чего происходит повышение доступности биогенных элементов для растений, а также накопление в почве продуктов метаболизма микробиоты, которые также способны оказывать свое влияние на развитие сельскохозяйственных культур.

Для характеристики биологической активности почвы используют суммарные (интегральные) методы, позволяющие оценить интенсивность минерализационных процессов, осуществляемых микробиотой. Они делятся на две группы. Первая группа методов измеряет актуальную, а другая – потенциальную активность.

Актуальная активность почвы представляет собою нативную (естественную) готовность микробного пула к разложению вещества в настоящий момент времени. Такая активность измеряется при закладке полевых и мелкоделяночных опытов, а также в модельных экспериментах без внесения в почву какого-либо дополнительного энергоемкого материала (навоз, мелиорант, минеральное удобрение и т.п.).

Потенциальная активность почвы представляет собою наиболее полную способность микроорганизмов к минерализации вещества. Данная активность определяется в постановочных лабораторных экспериментах при контролируемых условиях (температура, влажность, аэрация и др.), при этом в исследуемую почву добавляются различные вещества, трансформацию которых предполагается изучить.

Биологическую активность почвы определяют с помощью различных химических, биохимических и аппликационных методов.

К химическим методам относятся методы измерения количества того или иного соединения в почве, которое образовалось за счет деятельности определенной группы микроорганизмов за определенный промежуток времени (определение азотфиксирующей, нитрифицирующей способности почвы и т.д.).

К биохимическим методам относятся методы по определению способности почвы катализировать процессы деструкции различных веществ (определение ферментативной активности почвы), а также методы определения результатов этой деструкции (определение дыхания почвы).

К аппликационным методам относятся методы по учету интенсивности разложения определенного субстрата микробиотой химически не активированной почвы (определение активности деструкции льняного полотна, активности разложения фотопленки и т.д.).

Из всех принципиальных способов учета биологической активности почвы наиболее чувствительными и точными являются методы определения биохимической активности почвенных ферментов.

Основы почвенной энзимологии

Почвенная энзимология – наука, изучающая свойства, источники образования, механизмы и пути превращения, а также функционирование ферментов в почвах.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы, ускоряющие в сотни и тысячи раз химические реакции в живых организмах.

Источниками ферментов в почве является большинство микроорганизмов (протеаза, целлюлаза, полифенолоксидаза и др.), корневая система высших растений (каталаза, фосфатаза и др.) и мезофауна (амилаза, липаза и др.), хотя нельзя сказать, что один фермент выделяется только одним видом жизни. Поступление экзо- и эндоферментов в почву может происходить как в результате жизнедеятельности и отмирания всевозможных живых источников, так и в результате их высвобождения из органоминеральных почвенных комплексов.

В настоящее время в почве обнаружено более 90 ферментов, из которых наиболее подробно изучены ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз различных высокомолекулярных органических веществ, и класса оксидоредуктаз, катализирующие окислительно-восстановительные процессы (редокс-процессы) преобразования вещества почвы.

Активность почвенных ферментов является чувствительным индикатором изменения плодородия почв. Установлено, что при повышении плодородия нарастает активность редокс-ферментов и снижается активность ферментов гидролиза, что свидетельствует о замедлении темпов разложения вещества и повышении его гумификации при окультуривании пашни.

Кроме того, биохимический режим почвы подвержен разностороннему изменению от применения органических и минеральных удобрений, известковых материалов, но в целом имеет тенденции усиления биологической активности от снижения излишней кислотности почвы и привнесения в почву органического вещества.

В почве ферменты участвуют в важнейших биохимических процессах синтеза и распада гумуса, гидролиза органических соединений растительных и микробных остатков, инактивации пестицидов, токсикантов и других загрязняющих веществ.

Существующие биохимические методы, которые позволяют количественно выделить ферменты из почвы, не нарушая их строения, а также определить их активность *in situ* (на месте действия), полностью исключая влияние самой микробиоты, имеют большие затруднения аналитического характера, что часто делает их непригодными для почвенно-экологического мониторинга. Поэтому, чаще всего, в почве определяют не количество, а активность ферментов, которая, в свою очередь, дает не меньше информации о состоянии пахотного слоя.

Определение активности ферментов сводится к установлению каталитического действия почвенной пробы на процессы превращения определенных органических и минеральных соединений (субстратов), специально вносимых в почву. В свою очередь, учет активности действия ферментов состоит в определении количества переработанного в процессе реакции субстрата или образующегося продукта реакции при постановке опыта в оптимальных условиях температуры, влажности, рН среды, концентрации субстрата, навески почвы и времени.

Практически все биохимические методы имеют определенную последовательность выполняемых операций, которая сводится к следующему:

- 1) навеска почвы насыщается антисептиком в целях инактивации живых микроорганизмов, мешающих проведению анализа. В качестве антисептика обычно применяется толуол;

2) в почву добавляется буферный раствор с известным значением рН, оптимальным для изучаемого фермента. Так как максимальная активность ферментов проявляется только в узком диапазоне значений рН (оптимум действия), поддержание постоянного рН в реакционной среде на протяжении всего опыта является одним из важнейших условий;

3) в систему «почва + антисептик + буферный раствор» добавляется определенное количество субстрата, превращение которого происходит исключительно под действием изучаемого фермента и не поддается действию других;

4) полученная смесь помещается в оптимальные температурные условия (в термостат), при которых за определенное время инкубации происходит преобразование субстрата;

5) по окончании инкубации производится количественный учет продуктов реакции посредством использования самых разнообразных химических, физических и физико-химических методов: титриметрия, гравиметрия, фотометрия, колориметрия, поляриметрия и т.п.;

6) так как в почве всегда присутствуют вещества, аналогичные продуктам распада большинства используемых субстратов, для корректировки результатов закладывают контрольные пробы:

- контроль на исходные вещества самой почвы, учитываемые вместе с продуктом ферментативной реакции (контроль без субстрата);
- контроль на чистоту реактивов и субстрата, а также на спонтанность распада субстрата (контроль без почвы).

7) после приборного анализа производится расчет активности фермента. Так как унифицированных (единых) единиц измерения ферментативной активности почвы пока не существует, пользуются выражением активности фермента в количестве переработанного субстрата или образующегося в течение определенного промежутка времени продукта реакции, который рассчитывается на единицу массы почвы.

Определенную ферментативную активность почвы оценивают по пятибалльной шкале, представленной в таблице 14.

Таблица 14

**Шкала сравнительной оценки биологической активности почвы
(Звягинцев Д.Г., 1980; Гапонюк Э.И., Малахов С.Г., 1985)**

Показатель	Активность фермента в почве				
	очень слабая	слабая	средняя	высокая	очень высокая
Выделение CO ₂ , мг CO ₂ / 10 г / 24 ч	0 – 5	5 – 10	10 – 15	15 – 25	>25
Каталаза, см ³ O ₂ / 1 г / 1 мин	<1	1 – 3	3 – 10	10 – 30	>30
Фосфатаза, мг P ₂ O ₅ / 1 г / 30 мин	<0,5	0,5 – 1,5	1,5 – 5,0	5,0 – 15,0	>15,0
Протеаза, мг альбумина / 10 г / 1 ч	<0,5	0,5 – 1,0	1,0 – 2,0	2,0 – 3,0	>3,0
Инвертаза, мг глюкозы / 1 г / 24 ч	<5	5 – 15	15 – 50	50 – 150	>150

Необходимо отметить, что при оценке биологической активности почвы очень сложно количественно выделить влияние последствий антропогенной деятельности на экологическое состояние почвы, так как данное воздействие на почвенный покров приводит к отклонению значения показателей биологической активности от естественного уровня, характерного для данного типа почвы. Причем, направление этих изменений может быть различным как в сторону понижения, так и повышения биологической активности.

Поэтому в практике экологических исследований используют дополнительный показатель, позволяющий оценить воздействие загрязняющих веществ на биологическую активность почвы в целом – *период восстановления* ее фактического значения до естественного для данного типа изучаемой почвы.

Сравнивая полученный показатель периода восстановления биологической активности почвы со среднестатистическими данными (табл. 15), делают окончательное заключение о характере влияния загрязнителей или другого фактора и степени экологического благополучия изучаемой территории.

Таблица 15

Оценка воздействия загрязняющих веществ на биологическую активность почвы (Гапонюк Э.И., Малахов С.Г., 1985)

Период восстановления контрольного параметра, дни		Оценка действий
лабораторные условия	полевые условия	
<15	<30	Не оказывает влияния
15 – 30	30 – 60	Оказывает незначительное влияние, но возможны и отрицательные последствия
>30	>60	Существенное влияние, возможны серьезные экологические последствия

Особенности пробоотбора почвы при изучении ферментативной активности

При изучении естественных почв следует учитывать, что максимальная ферментативная активность в них отмечается в слое 0-5 см, поэтому этот слой целесообразно анализировать отдельно. При изучении пахотных почв образцы отбирают на всю глубину пахотного слоя, предварительно удалив верхний загрязненный слой, если, однако, при этом, не ставится задача изучения влияния загрязнения на ферментативную активность почвы. Слишком глубокий пахотный горизонт можно расчленить на 2-3 небольших слоя с обязательной фиксацией их глубины. В летние месяцы слой почвы 0-5 см может сильно иссушаться и активность ферментов в нем снижается. В условиях нормального увлажнения и теплообеспеченности он характеризуется максимальной активностью.

При исследовании влияния удобрений и агротехнических приемов на биохимические процессы, протекающие в пашне, пробы отбирают несколько раз в течение вегетационного периода. Сроки отбора лучше приурочить к фазам развития отдельных культур.

При изучении распределения ферментов по почвенному профилю индивидуальные образцы отбираются из свежевырытого разреза по генетическим горизонтам из той части горизонта, в которой морфологические признаки, присущие данному слою почвы, выражены наиболее сильно. Отбор образцов производят последовательно, начиная с нижнего горизонта почвы к верхним, предварительно зачистив и освежив места взятия образца.

Для сравнительной характеристики различных типов почв по ферментативной активности можно ограничиться одноразовым определением в течение года, но, при этом, образцы должны быть отобраны в одни и те же сроки, желательно до начала вегетации (весной) или в конце вегетации (осенью) в целях исключения влияния на ферментативную активность почвы живых корней растений.

Глава 4. Структура микробного сообщества почвы

Микробное сообщество почвы является очень сложной системой взаимодействующих организмов, чрезвычайно многочисленной и разнообразной по количеству обитающих видов, выполняемым функциям и отношению к окружающей среде. Несмотря на это, предпосылкой формирования устойчивого микробного пула в почве любой широтной зональности послужила многовековая эволюция педосферы в весьма неблагоприятных условиях (значительные колебания температуры воздуха и количества свободной влаги в течение года, а также количества свежего органического вещества), что и побудило почвенный микробиоценоз существовать в бедных условиях и вести активную борьбу за факторы жизни.

В целом нельзя говорить о строгой организации микробного сообщества почвы и абсолютной дифференциации микроорганизмов по выполняемым функциям. В данном случае можно упомянуть только о том, что вся совокупность микроорганизмов по-разному реагирует на изменения окружающей среды и, в частности, на качество и количество поступающего вещества как энергоемкого и пищевого субстрата в почвенную систему. Суть данного вопроса раскрывается экологическим подходом к понятию микробиоценоза почвы.

С другой стороны, несмотря на то, что почвенные микроорганизмы – *космополиты* в большей или меньшей степени, за счет их микрозонального развития в почвенном теле, попадая на какой-то определенный субстрат, они начинают его преобразование. В таком случае говорят о выполнении определенной функции местной микробиотой, сформировавшейся в той или иной микроне. Вопрос о выполняемой функции раскрывается функциональным подходом к познанию микробной жизни почвы.

4.1. Экологическая классификация почвенной микробиоты

В первом приближении глобальная роль комплекса почвенных микроорганизмов сводится к соединению в педосфере двух главных круговоротов вещества планеты – большого геологического и малого биологического. Во втором приближении этой ролью является минерализация накопленного в почвенной толще органического вещества растений и животных до конечных продуктов (H_2O , CO_2 , NH_3 , N_2O , N_2 , CO , CH_4 , H_2 и

т.д.) с их возвратом в атмосферу в виде сырья для «запуска» последующего процесса автотрофного биосинтеза органического вещества – фотосинтеза. Не случайно около 90% всего углекислого газа планеты, образующегося из органических веществ – микробного происхождения и только 10% приходится на долю дыхания высших организмов и деятельности человека.

Общие теоретические положения о дифференциации микробиоценоза почвы и о группировках почвенных микроорганизмов были высказаны еще в учении С.Н. Виноградского, которое позднее развил и дополнил Е.Н. Мишустин. В итоге сформировалось единое представление об экологических нишах почвенной микробиоты, которое включает 4 условных структурных состояния микробиоты:

- автохтонная микробиота;
- олиготрофная микробиота;
- зимогенная микробиота;
- автотрофная микробиота.

Автохтонная микробиота (от греч. *autochthoes* – абориген, местный, коренной, исконный) представляет собою исходное сообщество микроорганизмов неудобренной почвы, характерное для конкретного ее типа, изначально в ней развивающееся и постоянно в ней присутствующее. По сути это потенциальный запас микроорганизмов любой почвы, называемый также *микробным пулом*. Данная группа включает в себя множество представителей различных таксономических классов микроорганизмов, которая в условиях естественных биоценозов последней завершает минерализацию труднодоступных органических соединений и активно участвует в процессах их гумификации, а в условиях агроценоза при повышенной аэрации почв имеет целью минерализацию гумусовых веществ за счет активации мощного ферментативного аппарата. Из автохтонных микроорганизмов наиболее подробно изучены бактерии р. *Nocardia* и *Pseudomonas*.

Олиготрофная микробиота (от греч. *oligos* – немного, *trophe* – питание) составляет бóльшую часть почвенного микронаселения, представители которого ассимилируют питательные вещества из растворов с низкой концентрацией как азотсодержащих (олигонитрофилы), так и органических углеродсодержащих (олигокарбофилы) соединений. По сути, данная «микробиота рассеяния» завершает минерализацию остатков свежего органического вещества, являясь преемницей минерализационного процесса, который начинает зимогенная микробиота. Сюда входят бактерии р. *Ну-*

phomicrobium, Ancalomicrobium, Prosthemicrobium, Stella, Seliberia, Caulobacter, Renobacter и др.

Зимогенная (сапротрофная) микробиота (от греч. *zyme* – закваска, *genes* – рождающий) – в обычном состоянии почвы (неудобренность или перерыв между опадами растительных остатков) небольшая по количеству группа микроорганизмов, но, при этом, дающая резкий подъем численности в момент поступления свежего органического субстрата, так как имеет целью разложение легкодоступных органических соединений растительного и животного происхождения. Из бактерий это р. *Bacillus, Pseudomonas, Arthrobacter*, из грибов – р. *Aspergillus, Penicillium, Fusarium*, из дрожжей – *Lypomyces, Cryptococcus, Candida*.

Автотрофная (от греч. *autos* – сам, *trophe* – питание) микробиота – организмы, окисляющие минеральные соединения почвы. В эту группу входят нитрифицирующие бактерии (р. *Nitrosomonas, Nitrovibrio*), разрушители минералов почвы (р. *Metallogenium*) и т.д.

Понимание роли микроорганизмов в развитии и формировании почвы связано со знанием многообразия их метаболизма. При этом нужно помнить, что по типу питания строгих сапротрофов (зимогенных микроорганизмов) или олиготрофов в почве не существует, так как за счет микрозонального состояния почвы условия, создающиеся вокруг единичных сообществ микроорганизмов, диктуют свой способ питания (рис. 7 и 8).



Рис. 7. Микрозональное развитие бактерий (Звягинцев Д.Г., 2005)

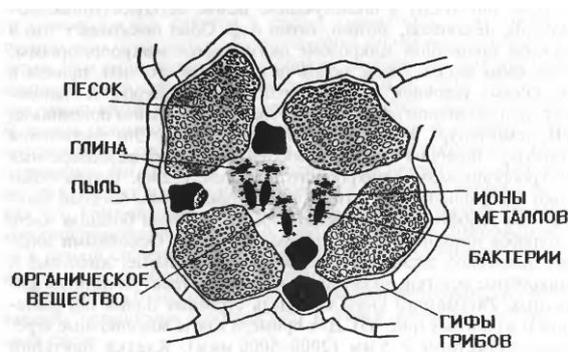


Рис. 8. Микрозональное развитие грибов (Звягинцев Д.Г., 2005)

Клетки микроорганизмов, собранные в микроколонии, зачастую изолированы друг от друга большими пространствами почвенных пор, прослоек воды, органического и минерального вещества. Поэтому микроколонии могут развиваться сравнительно индивидуально. Так, в условиях наличия пленки органического вещества на поверхности почвенной части-

цы в ней активно развиваются сапротрофы, а следом за ними и олиготрофы, в то время как внутри самой частицы, где практически нет запаса органической пищи, будут развиваться только олиготрофы и автотрофы.

Для более полного познания особенностей жизни микробиоценоза почвы были сформулированы принципы их взаимного существования.

Принцип микробного пула (запаса микроорганизмов) – в почве всегда имеется избыточный запас микроорганизмов, не обеспеченных органическим веществом и другими элементами питания. В таких условиях (наличие лимитирующих факторов) развитие и размножение микроорганизмов во времени осуществляется сравнительно медленно. По этой причине почву также называют типом местообитания с рассеянным пищевым достатком. Кроме того, микробный пул – это не только большая численность, но и великое разнообразие. По микробному генофонду почва является самым богатым субстратом на Земле, вследствие чего выживаемость всего комплекса микроорганизмов в неблагоприятных условиях окружающей среды максимальна именно в почве.

Принцип дублирования – все физиолого-биохимические процессы в почве строятся на функционировании нескольких дублирующих друг друга видах микроорганизмов.

Принцип обратимости микробиологических процессов – любой процесс превращения веществ микроорганизмы ведут в двух взаимно противоположных направлениях (разрушение белков, сахаров, целлюлозы, хитина растительных остатков и одновременное их образование в собственных клетках).

Принцип ненасыщенности комплекса почвенных микроорганизмов – при внедрении в почву чужеродных микроорганизмов (микробиота биопрепаратов, а также патогенные виды микроорганизмов, для которых основным местом обитания является живое растение или животное) риск их гибели исключительно мал, поэтому микробиота биопрепарата какое-то время активно развивается и действует. Но в то же время внесенный микроорганизм никогда не займет доминирующего положения среди автохтонной части микробиоценоза, именно поэтому биопрепараты имеют свой срок действия, а патогенные виды абсолютно неактивны в почве, но сохраняются в цистах или спорах до улучшения условий жизни.

Гетеротрофная (питающаяся органическим веществом) часть микробионаселения почвы является многогранным функциональным ядром

любого биогеоценоза, выполняющим единую фундаментальную функцию – поддержание круговорота вещества и энергии в экосистеме. Поэтому микроорганизмы в большей степени определяют такие биогеоценотические функции почв как функцию источника элементов питания растений, трансформационную и санитарную функции. В связи с этим, каждая сторона микробного преобразования вещества почвы заслуживает отдельного изучения и оценки.

Более подробно данные функции рассматриваются в функциональном подходе к изучению микробиоценоза почвы.

Несмотря на крайне сложную и до конца нераскрытую организацию микроскопической жизни в почве, всю совокупность микроорганизмов можно представить в виде следующей условной классификации:

1. Таксономическая:

а). доядерные формы – прокариоты (*Procaryotae*): архебактерии (*Mendosicutes*), цианобактерии (*Cyanobacteria*), истинные бактерии (в том числе группа актиномицетов рода *Streptomyces* и другие);

б). ядерные формы – эукариоты (*Eucaryotae*): грибы (*Mycota*), микроскопические водоросли (*Algae*), простейшие (*Protozoa*).

2. Функциональная:

а). синтетики (продуценты):

- водоросли (фотосинтез → O₂, глюкоза);
- азотфиксаторы (связывание молекулярного азота воздуха → NH₃);
- актиномицеты (пигментные вещества → гумус);

б). деструкторы (редуценты):

- органотрофы:

- аммонификаторы;
- амилолитики;
- целлюлозо-, лигнино-, пектинолитики и т.п.;

- литотрофы:

- нитрификаторы;
- денитрификаторы;
- сульфатредуцирующие;
- фосфатредуценты, силикатные, металлоокисляющие и т.п.

Экологическое разделение почвенного микробиоценоза было предложено академиком С.Н. Виноградским в виде теории о типах экологической стратегии выживания, которую позднее дополнили и развили выдающиеся ученые Д.Г. Звягинцев, Е.Н. Мишустин и В.Т. Емцев. Данный подход имел основой представление об экологических нишах почвенной микробиоты, куда входят 4 группы микроорганизмов: автохтонная и копиотрофная (местная, R-стратегии), аллохтонная (зимогенная, L-стратегии), олиготрофная (микробиота рассеяния, K-стратегии), и автотрофная.

Так, микроорганизмы-олиготрофы K-стратегии развития присутствуют в почве всегда, но в небольших количествах, и питаются в условиях малой концентрации питательных веществ, остающейся после биохимической деятельности гидролитиков и копиотрофов. Олиготрофы выполняют исключительно важную роль в завершении утилизации остаточного органического вещества в почвах и подготовки его к процессам гумификации.

Повышение численности и биологической активности аллохтонных представителей L-стратегии выживания имеет периодический характер и связан с поступлением свежего органического вещества, на разрушение которого они выделяют множество экзоферментов.

Практически вслед за ними развивается копиотрофная часть микробного пула (часть сообщества R-стратегии), которая практически не имеет гидролитической ферментной системы и питается исключительно готовым органическим веществом в виде моно- и олигомеров.

Другая (автохтонная) часть микроорганизмов R-стратегии жизни также всегда присутствует в почвах, развивается очень медленно и, благодаря наличию оксидоредуктазного ферментного комплекса, способна к трансформации гумусовых и иных сложных органических веществ при отсутствии более доступного питательного субстрата.

4.2. Особенности микробиоценоза в ризосфере растений

В процессе выращивания сельскохозяйственных культур, как в полевых условиях, так и в модельных опытах, микроорганизмы почвы непрерывно разлагают и потребляют корневые выделения вегетирующих растений, физиологически активными веществами действуют на обмен веществ культуры, участвуют в синтезе гумусовых веществ почвы и оптимизации ее оструктуренности.

При этом качественный и количественный состав микробиоценоза почвы существенно различается по мере удаления от дернины верхнего слоя. В прикорневой зоне почвы оборачиваемость микробиомассы имеет наивысшую активность, а, соответственно, и минерализация вещества здесь наиболее полная. Поэтому часть почвы, непосредственно прилегающую к корневой системе растения, называют *ризосферой* (от греч. *rhiza* - корень и *sphaira* - шар, область). Ризосфера представляет собою своего рода почвенную муфту вокруг корня, которую достаточно легко отличить от близлежащей почвы: она сильно оструктурена, имеет мелкокомковатую или зернистую структуру.

Питательный режим прилегающей к корням растений почвы имеет свои особенности. В местах контакта корней с почвенными частицами создаются очаги либо обедненные элементами питания при усиленном поглощении их растениями, либо, наоборот, обогащенные за счет корневых выделений. По химическому составу корневые выделения могут содержать сульфаты, фосфаты, кальций, калий, азот, аминокислоты, сахара и другие органические и минеральные вещества. Количественный и качественный состав выделений корней зависит от возраста растений. Период наибольшей интенсивности выделения корнями растений органических веществ отмечается во время цветения. В условиях севооборота сельскохозяйственные культуры выделяют, как правило, больше углеводов и органических кислот, чем минеральных веществ.

Помимо элементов питания, корни высших растений способны выделять большое количество ферментов. Так, фосфатазы корней принимают участие в разложении фосфорорганических соединений почвы, что приводит к обогащению ризосферы подвижным фосфором, в то время как каталазы производят редокс-преобразование вещества пахотного горизонта.

Почва ризосферы богаче микробиотой, чем неризосферная часть (табл. 16), причем различным растениям соответствует свой микробный пул и свои виды микроорганизмов. Поэтому для сравнения активности развития микробиоты в неризосферной и ризосферной почве производят вычисление **ризосферного эффекта (РЭ)**, равного отношению численности группы микроорганизмов, определенной в ризосфере, к численности микробиоты неризосферной части почвы. В ризосферной части почвы сосредоточены, главным образом, неспоровые бактерии. Актиномицеты, бациллы и грибы здесь обнаруживаются в меньшем количестве.

Таблица 16

Примерное количественное соотношение различных групп микроорганизмов в дерново-подзолистой почве (Мишустин Е.Н., 1972)

Группы микроорганизмов	Ризосфера	Неризосферная почва	РЭ
Бактерии	$1200 \cdot 10^6$	$53 \cdot 10^6$	23
Актиномицеты	$46 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^6$	7
Аммонификаторы	$500 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	125
Денитрификаторы	$126 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	1260
Целлюлозолитики	$7 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	7

В питании растений роль ризосферных микроорганизмов особенно велика, так как они снабжают растение не только легкодоступными соединениями азота, фосфора и калия, но и различными физиологическими веществами, стимулирующими рост растений: ферментами, антибиотиками, витаминами, регуляторами роста растений (ауксины, цитокинины, гиббереллины) и прочие.

Так, например, активное развитие актиномицетов в ризосфере культурных растений способствует оздоровлению пашни, поскольку они больше остальных микроорганизмов продуцируют антибиотики, оказывающие угнетающее действие на многие виды фитопатогенных форм бактерий и грибов.

По этим и многим другим причинам учет количества микроорганизмов в ризосфере, а также определение биологической активности ризосферной почвы позволяет судить как о состоянии благополучного развития культуры в настоящий момент времени, так и в целом о состоянии плодородия пахотных земель, об их способности к сопротивлению негативным факторам окружающей среды.

Численность ризосферной микробиоты

При учете численности микроорганизмов, обитающих в прикорневой зоне, очень значимым этапом является отделение ризосферной части почвы от ее общей массы. Принципиально при этом пользуются двумя способами: отделением ризосферы от корневой системы методом встряхивания по Красильникову и отделением ризосферной части отмытием почвы от корней по Теппер.

Метод отделения ризосферы от корневой системы встряхиванием по Красильникову

Данным способом пользуются в том случае, когда в исследуемой почве помимо определения численности микроорганизмов также планируется определение агрохимических показателей и показателей биологической активности.

Ход работы

На месте отбора почвенных образцов (в поле) лопату несколько раз втыкают в исследуемую почву, затем осторожно подкапывают вегетирующее растение, стерильным ножом отрезают часть корней и извлекают их стерильным пинцетом на поверхность. Затем стряхивают так, чтобы на корнях остался только небольшой слой прочноудерживающихся почвенных микроагрегатов. После чего эти корни помещают в подготовленную широкогорлую стерильную банку или пакет, прикладывают этикетку и отправляют в лабораторию на анализ. В лаборатории корни с ризосферой осторожно извлекают из банки на стерильный лист белой бумаги, в стерильных перчатках снимают слой почвы с корней, взвешивают его и далее проводят все манипуляции в соответствии с задачами исследования.

Метод отделения ризосферы от корневой системы отмыванием корней по Теппер

Таким способом пользуются в том случае, когда исследуемая почва необходима только на закладку анализа по определению микробной численности.

Ход работы

На месте отбора почвенных образцов лопату несколько раз втыкают в исследуемую почву, затем осторожно подкапывают вегетирующее растение, выкапывают небольшой монолит почвы с корневой системой, помещают в подготовленную широкогорлую стерильную банку или пакет, прикладывают этикетку и отправляют в лабораторию на анализ.

В лаборатории почвенный монолит с корнями осторожно извлекают из банки на стерильный лист белой бумаги, в стерильных перчатках пинцетом распределяют почвенную массу по поверхности листа, отбирают на стерильный лист кальки 10 г молодых корней примерно одинакового диа-

метра с приставшими к ним частицами почвы. Одновременно закладывают навеску почвы для определения влажности.

Навеску корней помещают в стерильную коническую колбу с 90 мл стерильной дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой, протертой 70% этанолом и встряхивают на ротаторе в течение 10 мин. Затем производят все манипуляции по приготовлению последующих разведений почвенной суспензии и посеву на чашки или в пробирки (глава 3, п. 3.3).

Для определения точной массы ризосферной почвы, пребывавшей на корнях, после встряхивания и приготовления разведений крючком или пинцетом из колбы отлавливают все корни, несколько раз промывают их в воде, подсушивают на фильтровальной бумаге и взвешивают с точностью до 0,01 г. Исходную массу разведенной почвы находят по разнице между массой почвы с корневой системой и массой отмытых и подсушенных корней.

Биохимическая активность ризосферной микробиоты

Считается, что среди прочих показателей биологической активности почвенных микроорганизмов микробиота ризосферы в совокупности с корнями растений обладает наивысшей активностью при продуцировании редокс-ферментов, в частности, фермента каталазы.

Метод определения каталазной активности почвы по Галстяну

Фермент каталаза (НКФ 1.11.1.6 H_2O_2 : H_2O_2 -оксидоредуктаза) относится к классу оксидоредуктаз и катализирует реакцию разложения перекиси водорода и других органических перекисных соединений почвы до воды и молекулярного кислорода по схеме:



Перекисные соединения образуются в процессе дыхания микроорганизмов и корневой системы растений, а также в результате микробиологического окисления органических веществ. Роль каталазы в клетках микроорганизмов и корней растений заключается в разрушении перекисных ядов.

Принцип метода

Метод определения каталазной активности почвы основан на измерении скорости разложения перекиси водорода при ее взаимодействии с почвой с последующим учетом образующегося молекулярного кислорода

газометрическим способом. По количеству вытесненного кислорода воздуха в замкнутом пространстве бюретки судят о каталазной активности почвы.

Ход работы

Навеску свежей почвы в 1 г (взвешенной с точностью до 0,01 г) вносят в коническую колбу **А** емкостью 250 мл (рис. 9) и добавляют 0,5 г СаСО₃. Затем, на дно колбы осторожно, с помощью пинцета, ставят маленький стаканчик **Е** с 5 мл 3% раствора Н₂О₂, рядом с ним кладут магнит (магнитный якорь). Колбу плотно закрывают пробкой со стеклянной трубкой, которая соединена с измерительной бюреткой **Б** при помощи толсто-стенного резинового шланга через тройник **Г** с уравнивающей бюреткой **Д** и грушевидной воронкой **В**.

Бюретки и воронку предварительно заполняют водой, после чего уравнивают уровень воды в бюретках, поднимая или опуская воронку. В дальнейшем воронку **В** фиксируют держателем на определенной высоте, а тройник **Г** закрывают зажимом. Опыт проводят при температуре окружающего воздуха + 18°...+ 20°С.

Начало опыта отмечают по секундомеру в тот момент, когда стаканчик с перекисью **Е** внутри колбы **А** резко опрокидывают, а саму колбу сразу ставят на включенную магнитную мешалку. Вращение магнита и перемешивание им в колбе раствора перекиси, навески почвы и карбоната кальция проводят непрерывно в течение всего времени опыта, не касаясь колбы руками.

Выделяющийся кислород по шлангу вытесняет из бюретки **Б** столбик воды, уровень вытеснения которой отмечают точно через 1 и 2 мин. после начала опыта. В качестве контроля определяют каталазную активность стерилизованной сухим жаром почвы (при +120°С в течение 2^х ч.).

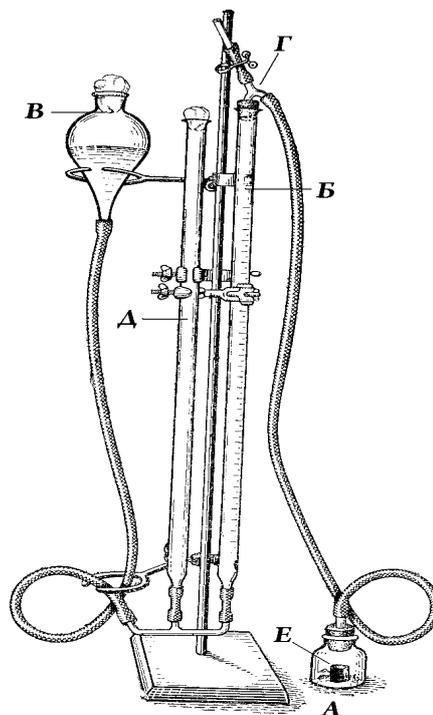


Рис. 9. Схема собранного катализатора (Звягинцев Д.Г., 1980)

Активность каталазы выражают в мл O_2 , выделившегося за 1 мин. из 1 г почвы. Параллельно закладывают навеску почвы для определения влажности.

Расчет результатов анализа

Значение каталазной активности почвы рассчитывается следующим образом. Определяется количество O_2 , выделившееся из каталазника в среднем за 1 минуту. Из полученного значения вычитается количество кислорода, выделившееся при проведении опыта с контрольным (стерильным) образцом почвы. Разница, умноженная на поправочный коэффициент влажности почвы K_w , и представляет собою искомое значение каталазной активности почвы, выраженное в $см^3 O_2 / 1 г$ за минуту.

ФОРМА ЗАПИСИ

№ образца почвы	Навеска почвы, г	K_w	Отсчет по бюретке, $см^3$			Активность каталазы, $см^3 O_2 / 1 г$ почвы / 1 мин	Оценка активности
			1 мин.	2 мин.	среднее за 1 мин.		
опыт							
контроль		—				табл. 14	

Реактивы

- 1) **$CaCO_3$** : сухой реактив;
- 2) **раствор перекиси водорода – 3%**: 0,6 мл 30% перекиси водорода растворяют в 20 мл дистиллированной воды;

Рабочий раствор перекиси готовят непосредственно перед проведением анализа, концентрацию раствора периодически проверяют титриметрическим способом. Для этого на аналитических весах в мерной колбе на 100 мл взвешивают точно 1 г конц. H_2O_2 , объем доводят до метки дистиллированной водой и взбалтывают. Затем берут по 2 мл полученного раствора в конические колбы на 250 мл (3 повторности анализа), добавляют 50 мл дистиллированной воды и 2 мл 20% раствора H_2SO_4 . Затем титруют раствор в колбе 0,1 н раствором $KMnO_4$ до устойчивой не исчезающей родовой окраски. 1 мл пошедшего на титрование перманганата калия соответствует 0,0017008 г H_2O_2 . После установления исходной концентрации перекиси ее 3% раствор готовят разбавлением дистиллированной водой как описано выше.

Глава 5. Функции почвенных микроорганизмов

Функциональный подход к количественному учету деятельности микробиоценоза почвы складывается из индивидуального изучения каждой микробной функции, значимой в комплексной оценке экосистем.

Известно, что средняя численность бактерий в почве составляет примерно 70% от всех почвенных микроорганизмов, актиномицетов – 30%, грибов – 1-3% от объема микробиоты. В зависимости от складывающихся условий каждая из этих групп выполняет в почве определенную роль, а конечный результат их деятельности будет определяться особенностями взаимоотношений между функциональными единицами микробиоценоза (*микробными консорциями*) и изменением вещественного состава почвы.

В целом же функциональный подход к учету деятельности микробиоты почвы складывается из индивидуального изучения количества и биологической активности каждой микробной группы, что имеет большое значение в комплексной оценке экосистем.

5.1. Разложение растительных остатков и органических удобрений

В условиях агроценоза основной массой ежегодно поступающего в почву органического вещества являются растительные остатки сельскохозяйственных культур, органические удобрения и сидераты, вещественный состав которых складывается, в основном, из азотсодержащих и безазотистых компонентов. Вместе с накопленной микробиомассой все количество мертвого органического вещества растений подвергается процессу минерализации.

Известно, что разложение органических соединений азота выполняется, главным образом, аммонифицирующими микроорганизмами. В дальнейшем соединения азота перерабатываются нитрифицирующей и денитрифицирующей группами почвенного микробиоценоза. Безазотистые органические вещества разлагаются по типу кислородного окисления и сбраживания амилолитиками, целлюлолитиками и прочими группами микроорганизмов зимогенной части микробиоценоза почвы. Все эти процессы приводят к пополнению почвы биогенными элементами, доступными для растений.

5.1.1. Разложение азотсодержащих компонентов

Аммонификация

Аммонификация (гниение) – процесс разложения микроорганизмами белковых соединений растительных остатков и органических удобрений, который протекает под действием протеолитических экзоферментов (протеаз) и сопровождается выделением аммиака.

При наличии в почве свежего органического вещества аммонифицирующая микробиота становится самой многочисленной и таксономически разнообразной. Численность аммонификаторов, представленных аэробными и анаэробными прокариотами, плесневыми грибами, актиномицетами и прочими видами микрожизни, может достигать 10^8 КОЕ и выше. Следствием их функционирования и будет аммонифицирующая функция микробного пула, вызванная активизацией зимогенной его части.

Образующийся в результате жизнедеятельности этой группы микроорганизмов аммиак, а также промежуточные продукты распада белков (аминокислоты и их производные), способны усваиваться культурными растениями в качестве источников главного элемента питания – азота. Поэтому учет численности и биохимической активности аммонифицирующей микробиоты почвы является важным этапом микробиологической оценки состояния плодородия пашни и почвенно-экологического мониторинга сельскохозяйственных земель.

Метод определения относительной численности аммонификаторов

Общую численность аммонифицирующей микробиоты учитывают чашечным методом посева на мясо-пептонный агар (МПА) или методом предельных разведений с посевом на пептонную воду.

Посев на чашки с МПА производят из одного разведения почвенной суспензии на выбор (от 10^{-5} до 10^{-8}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, подсчет выросших колоний проводят на второй-четвертый день после посева.

Приготовление мясо-пептонного агара проводят в соответствии с методикой, изложенной на упаковке готового сухого препарата МПА. Автоклавирование сваренной питательной среды производят при давлении 2,0 атм. в течение 20-30 мин.

Посев в пробирки на пептонную воду (по 5 мл на пробирку) производят из нескольких разведений почвенной суспензии (от 10^{-2} до 10^{-8}). Диапазон высеваемых разведений выбирают также в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем более широкий интервал ее разведения необходимо взять для посева). В качестве микробиологического отклика аммонификаторов ожидают и фиксируют помутнение среды в пробирках, появление пузырьков NH_3 и посинение лакмусовой бумаги. Инкубацию проводят в термостате при $+28^\circ\text{C}$, учет – на второй-четвертый день после посева.

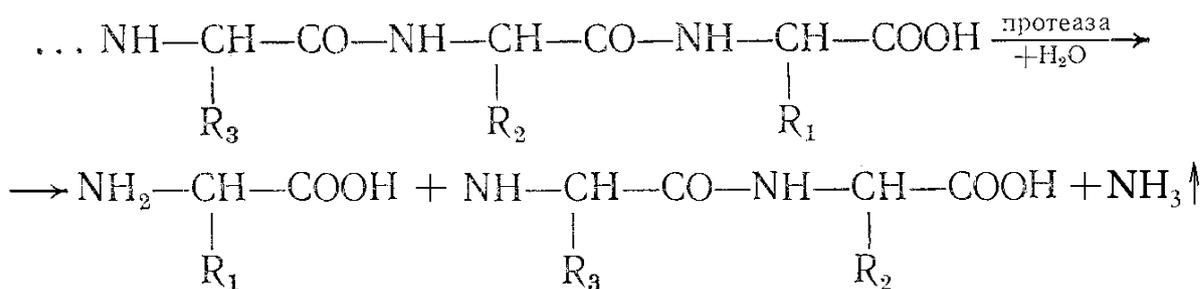
Приготовление пептонной воды ведут следующим образом: к 1 л дистиллированной воды прибавляют 5 г пептона, размешивают стеклянной палочкой, ставят на асбестовую сетку, доводят до кипения и, помешивая, кипятят 15 мин. Затем в горячий раствор вносят навески веществ: KH_2PO_4 – 1 г, K_2HPO_4 – 1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г и NaCl – 0,5 г. Соли полностью растворяют перемешиванием, затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,0 атм. в течение 25 мин.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3.), учитывают количество колоний (на МПА) или микробиологический отклик (на пептонной воде) и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3, 4 и 5).

Биохимическая активность аммонификаторов

Биохимическую активность аммонифицирующей микробиоты оценивают по определению протеолитической активности почвы, так как, наиболее тесно с повышением плодородия почвы связана активность ферментов именно азотного режима, в частности, фермента протеазы.

Протеазы (НКФ 3.4.4 пептидил-пептидгидролазы) – группа экзоферментов микробного и растительного происхождения, катализирующих гидролитическое расщепление белков растительных остатков и органических удобрений до пептидов и, далее, до аминокислот, действуя на пептидную связь по принципиальной схеме:



Аминокислоты и образующийся из них аммиак способны усваиваться культурными растениями и влиять на азотный режим их питания, что, несомненно, важно в оценке продуктивности пахотных земель.

Метод определения протеазной активности почвы по Галстяну и Арутюнян

Принцип метода

Метод основан на способности протеолитических ферментов почвы расщеплять белковый субстрат до аминокислот с последующим определением их количества с помощью нингидрина. В качестве субстрата используют желатин. По количеству образующихся аминокислот судят о протеазной активности.

Ход работы

Навеску 2 г свежей почвы, просеянной через сито с диаметром ячеек в 5 мм и взвешенной с точностью до 0,01 г, помещают в коническую колбу на 100 мл, приливают 0,5 мл толуола и 10 мл 1% раствора желатина, приготовленного на фосфатном буфере (pH = 7,4). Колбу закрывают корковой или резиновой (неплотно) пробкой, содержимое тщательно перемешивают круговыми движениями в течение 5 мин. и ставят на суточную инкубацию в термостат при +30°C.

Параллельно на инкубацию закладывают два контроля: первый (K₁) – в почву вместо субстрата (раствора желатина) добавляют 10 мл воды и остальные реактивы, второй (K₂) – в колбу помещают все исходные реактивы без почвы. Также параллельно ставят навеску почвы для определения влажности.

По окончании инкубации в колбу приливают 0,5 мл 0,1 Н раствора H₂SO₄ и 3 мл 20% раствора Na₂SO₄ для осаждения белков. Полученную

суспензию перемешивают в течение 5 мин. и центрифугируют при 6000 об./мин. в течение 10 мин. Затем в мерную колбу на 50 мл отбирают 5 мл центрифугата (V_2) и приливают в нему 1 мл 2% раствора нингидрина, приготовленного на ацетоне. Смесь встряхивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Посиневший раствор доводят до метки дистиллированной водой и колориметрируют при $\lambda = 540$ нм в кюветах на 5 мм относительно окрашенного первого контрольного образца (K_1), заложеного с почвой без субстрата.

Построение калибровочного графика

Навеску 0,1 г химически чистого глицина растворяют в 100 мл дистиллированной воды. В 1 мл полученного рабочего раствора будет содержаться 1 мг глицина. Затем берут 6 мерных колб на 50 мл, приливают в каждую определенный объем рабочего раствора в соответствии с таблицей 17, добавляют 1 мл раствора нингидрина, встряхивают, нагревают на кипящей водяной бане, доводят до метки и далее, аналогично определению аминокислот в исследуемых образцах, проводят колориметрирование калибровочных растворов относительно холостого раствора, приготовленного с дистиллированной водой.

Таблица 17

Исходные данные для построения калибровочного графика

№ колбы	Количество рабочего раствора глицина, мл	Содержание глицина, мг/50 мл	Отсчет по прибору
1	1	1,0	
2	2	2,0	
3	4	4,0	
4	6	6,0	
5	8	8,0	
6	10	10,0	

По полученным данным строят калибровочный график, где по оси ординат откладывают значения отсчета по прибору (оптические плотности калибровочных растворов), а по оси абсцисс – соответствующие им значения концентрации глицина (мг/50 мл).

Расчет результатов анализа

Полученное по графику содержание глицина (мг/50 мл) пересчитывают активность протеаз (мг глицина/1 г абс.-сух. почвы/24 ч) по следующей формуле:

$$ПА = (A_1 - A_K) \cdot V_1 \cdot K_W / V_2 \cdot m \quad (6)$$

где ПА – протеазная активность почвы, мг глицина/1 г абс.-сух. почвы/24 ч;

A_1 и A_K – соответственно количество глицина опытного и второго контрольного образца (K_2) почвы, найденные по калибровочному графику, мг/50 мл;

V_1 – общий раствор после инкубации почвы, из которого берется аликвота ($V_1 = 14$ мл);

V_2 – аликвота, взятая на анализ, мл ($V_2 = 5$ мл);

m – навеска почвы, г;

K_W – поправка на влажность почвы, рассчитываемая по формуле (2).

Реактивы

- 1) **раствор желатина – 1%:** 1 г желатина растворяют в 99 мл фосфатного буфера при нагревании на асбестовой сетке;
- 2) **фосфатный буфер (рН = 7,4):** готовят из раствора А (5,938 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки в колбе на 500 мл) и раствора Б (0,908 г KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки в колбе на 100 мл). Фосфатный буфер приготавливают смешиванием в химическом стакане 400 мл раствора А и 100 мл раствора Б;
- 3) **раствор H_2SO_4 – 0,1 Н:** 2,8 мл конц. H_2SO_4 (пл. 1,84) вливают в 500 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л, перемешивают и доводят водой до метки;
- 4) **раствор Na_2SO_4 – 20%:** 20 г сульфата натрия растворяют в 80 мл дистиллированной воды при нагревании на асбестовой сетке;
- 5) **раствор нингидрина – 2%:** 1 г нингидрина растворяют в стакане в 50 мл ацетона. Непосредственно перед анализом 47,5 мл ацетонового раствора нингидрина смешивают в химическом стакане с 0,5 мл конц. уксусной кислоты и 2 мл дистиллированной воды. Полученный раствор нестойкий и хранению не подлежит;
- 6) **глицин, х.ч.;**
- 7) **толуол, х.ч.**

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец почвы	Навеска почвы, г	K_w	Объем аликвоты, мл	Отсчет по прибору	Количество глицина, найденное по графику, мг/50 мл	Активность протеазы, мг глицина / 1 г почвы / 24 ч	Оценка активности
№	m		V_2	–	A	ПА	табл. 25
опытный					A_1		
контрольный	–	–			A_k		

Иммобилизация

Иммобилизация – процесс микробиологического связывания аммиачного азота, образующегося в результате аммонификации белковых веществ растительных остатков и органических удобрений. Иммобилизация проводится плесневыми грибами, актиномицетами, целлюлозолитиками и в основном неспоровыми бактериями.

Известно, что при разложении каждые 100 г органического вещества растительных остатков (или 50 г углерода) аммонификаторы на синтез белка своих клеток используют в среднем 2 г почвенного азота ($C : N = 25 : 1$). При содержании азота в органическом веществе разлагающейся растительной биомассы менее 2% ($C : N > 25 : 1$) он будет полностью иммобилизован (связан) в клетках микроорганизмов, а при более высоком его содержании ($C : N < 25 : 1$) в почву будет выделяться свободный аммиак, который затем преобразуется в нитрат-ион. Именно поэтому навоз и другие органические удобрения животного происхождения насыщают почву аммиачным азотом, так как соотношение $C : N$ в них очень узкое ($C : N \approx 5 : 1$). В то же время внесение в почву соломы в качестве органического удобрения может приводить к азотному голоданию сельскохозяйственных культур, так как за счет широкого соотношения в соломе углерода и азота ($C : N \approx 50 : 1$) аммонифицирующая микробиота для деструкции соломы начинает использовать почвенный азот.

Данное явление микробного распределения свободного азота в почве имеет важное значение для оценки его доступности в питании культурных растений, так как до 25% минерального азота может быть иммобилизовано в клетках микроорганизмов и какое-то время пребывать в недоступном для питания растений состоянии. Поэтому при всестороннем рассмот-

рении микробиологического преобразования азота почвы также учитывают численность микробиоты, способной усваивать минеральные формы азота почвы.

Метод определения относительной численности иммобилизаторов

Общую численность иммобилизирующей микробиоты учитывают чашечным методом посева на крахмало-аммиачный агар (КАА) из одного на выбор разведения почвенной суспензии (от 10^{-4} до 10^{-6}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, учет выросших колоний проводят на пятый-десятый день после посева.

Приготовление КАА производят путем последовательного растворения в 1 л дистиллированной воды следующих реактивов: крахмал – 10 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2 г, K_2HPO_4 – 1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 г, NaCl – 1 г, CaCO_3 – 3 г, агар-агар – 20 г. Соли и агар полностью растворяют нагреванием на асбестовой сетке и перемешиванием. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 2,0 атм. в течение 20-30 мин.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п 3.3), учитывают количество колоний и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3 и 4).

Коэффициент иммобилизации и минерализации

После определения численности КОЕ иммобилизаторов азота почвы дополнительно рассчитывают коэффициент минерализации и иммобилизации Мишустина. Он определяется отношением численности микроорганизмов, учтенных посевом на крахмало-аммиачном агаре (КАА) и характеризующих процесс преобразования аммиачного азота и крахмала, к численности микроорганизмов, учтенных посевом на мясо-пептонном агаре (МПА), характеризующих превращение белковых веществ почвы.

Данный коэффициент показывает степень развития амилолитической группы микробиоценоза и, соответственно, ее активность по закреплению в своих клетках свободного азота. Чем он выше (> 1), тем иммобилизации-

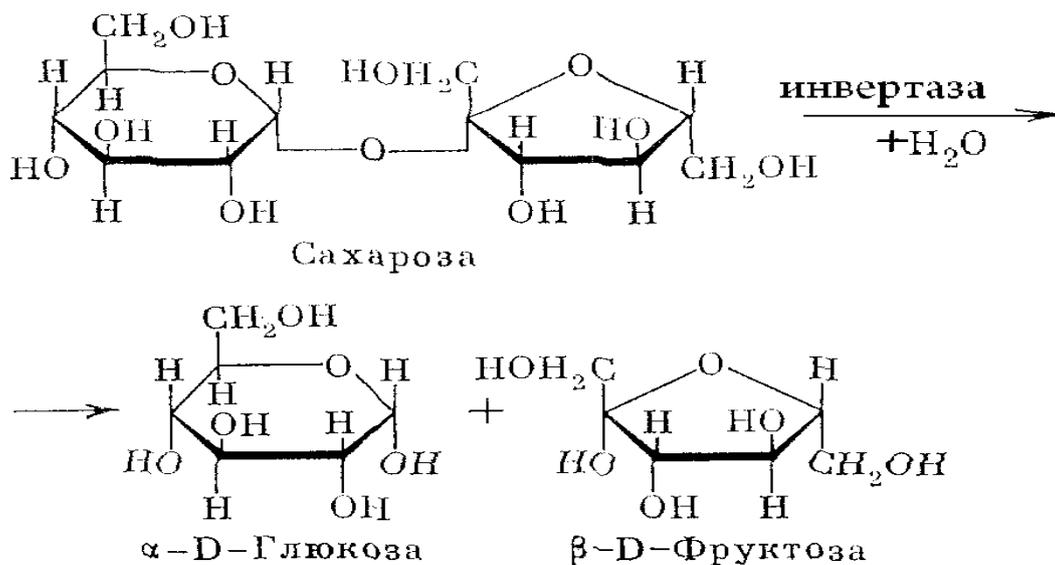
онные процессы протекают интенсивнее, что говорит либо об очень большой обеспеченности почвы аммиачным азотом (что может являться следствием высокого развития аммонификаторов), либо о появлении в почве слишком бедного органического вещества (солома, кора и т.п.). В условиях агроценоза слишком большое значение коэффициента Мишустина ($> 5-10$) может также свидетельствовать о чрезмерном повышении скорости разложения легкодоступного органического вещества.

Биохимическая активность иммобилизаторов

Определение биохимической активности иммобилизаторов азота косвенно основано на определении активности фермента инвертазы, так как известно, что помимо усвоения аммония (как из питательной среды, так и из почвы) данная микробиота способна производить деструкцию легкодоступного вещества – крахмала. В свою очередь, после разрушения крахмала до олиго- и дисахаров, микробиота начинает продуцировать ферменты ряда глюкозидгидролаз, способных расщеплять ди-, три- и полисахариды по гликозидным связям до мономеров по принципиальной схеме (см. ниже).

Так как углеводов и близких к ним веществ в почвенном органическом веществе, микробных клетках и растительных остатках достаточно много, а их гидролиз невозможен без наличия свободного аммиачного азота, определение активности глюкозидгидролазных ферментов (в частности, активности инвертазы) позволяет одновременно судить как о иммобилизирующей способности микробиоценоза почвы, так и о его способности к преобразованию углеводов растительных остатков.

Углеводсодержащих веществ в почве содержится достаточно много, так как до 60% массы поступающих растительных остатков представлены углеводами. В биохимическом превращении каждого углевода участвует специфический фермент или ферментная группа. Инвертаза катализирует реакцию гидролиза сахарозы, образующейся при многоступенчатой деструкции крахмала до глюкозы и фруктозы.



Инвертаза (НКФ 3.2.1.26 β-D-фруктофуранозид-фруктогидролаза) является одним из главных ферментов, характеризующих биологическую активность почвы. Уровень инвертазной активности отражает содержание в почве легкогидролизуемых углеводов, которые служат энергетическим материалом для многих почвенных гетеротрофов.

Метод определения инвертазной активности почвы по Купревичу и Щербаковой

Принцип метода

Метод основан на способности глюкозы и фруктозы, образующихся при гидролизе сахарозы, восстанавливать медь, содержащуюся в реактиве Феллинга. По количеству образовавшейся закиси меди (Cu_2O) определяют содержание моносахаров в растворе. Поскольку катализатором деструкции данных сахаров в почве является именно инвертаза, то по количеству образующихся гексоз и судят об инвертазной активности почвы.

Ход работы

Навеску 2 г почвы, взвешенной с точностью до 0,01 г, вносят в коническую колбу емкостью 100 мл, добавляют 5 мл ацетатного буфера (pH = 4,9), 15 мл 8% раствора сахарозы и 4 капли толуола. Содержимое колбы встряхивают круговыми движениями, закрывают корковой или резиновой (неплотно) пробкой и ставят на суточную инкубацию в термостат при +30°C.

После инкубации колбу нагревают на плитке до кипения для прекращения действия ферментов. Далее суспензию фильтруют. Затем 8 мл фильтрата переносят в стеклянный бюкс, предварительно взвешенный на аналитических весах с точностью до 0,001 г. К фильтрату прибавляют 6 мл свежеприготовленного реактива Феллинга, ставят на асбестовую сетку; смесь доводят до кипения и кипятят в течение 2 мин.

После этого бюкс с кроваво-красной смесью снимают с сетки и в течение 1 часа отстаивают для осаждения осадка закиси меди. Затем осторожно, не взбалтывая, надосадочную жидкость отсасывают пипеткой. Осадок Cu_2O дважды промывают горячей дистиллированной водой, удаляя промывную воду из бюкса пипеткой, после чего бюкс с осадком помещают в сушильный шкаф и сушат до постоянного веса при $+70^{\circ}C$.

Таблица 18

**Количество глюкозы (мг), эквивалентное количеству меди (мг)
(Петербургский А.В., 1963)**

Медь	Сахар	Медь	Сахар	Медь	Сахар	Медь	Сахар
20,4	10	64,6	33	105,8	56	144,5	79
22,4	11	66,5	34	107,6	57	146,1	80
24,3	12	68,3	35	109,3	58	147,7	81
26,3	13	70,1	36	111,1	59	149,3	82
28,3	14	72,0	37	112,8	60	150,9	83
30,2	15	73,8	38	114,5	61	152,5	84
32,2	16	75,7	39	116,2	62	154,0	85
34,2	17	77,5	40	117,9	63	155,6	86
36,2	18	79,3	41	119,6	64	157,2	87
38,2	19	81,1	42	121,3	65	158,8	88
40,1	20	82,9	43	123,0	66	160,4	89
42,1	21	84,7	44	124,7	67	162,0	90
43,9	22	86,4	45	126,4	68	163,6	91
45,8	23	88,2	46	128,1	69	165,2	92
47,7	24	90,0	47	129,8	70	166,7	93
49,6	25	91,8	48	131,4	71	168,3	94
51,5	26	93,6	49	133,1	72	169,9	95
53,4	27	95,4	50	134,7	73	171,5	96
55,3	28	97,1	51	136,3	74	173,1	97
57,2	29	98,9	52	137,9	75	174,6	98
59,1	30	100,6	53	139,6	76	176,2	99
60,9	31	102,3	54	141,2	77	177,8	100
62,8	32	104,1	55	142,8	78		

Далее находят вес осадка закиси меди в 8 мл раствора; умножив полученное значение на коэффициент 0,888 (пересчет массы закиси меди в

элементную медь), пересчитывают этот вес на весь объем раствора (20 мл) и по таблице 18 высчитывают количество глюкозы, соответствующее найденному количеству меди. В качестве контроля закладывают опыт со стерилизованной почвой (автоклавирование при 2,0 атм в течение 1 часа).

Расчет результатов анализа

Пример: в ходе опыта в бюксе образовалось 40 мг закиси меди. Пересчитаем это количество в массу чистой меди: $40 \times 0,888 = 35,52$ мг. Оно соответствует 8 мл реактива Феллинга, а 20 мл реактива будет соответствовать - 88,8 мг меди: $(35,52 \times 20) / 8$. По таблице 5.1.1.2 находим два числа, между которыми располагается эта величина: 88,2 мг меди эквивалентно 46 мг глюкозы, а 90,0 мг - 47 мг глюкозы. Находим разницу: $90,0 - 88,2 = 1,8$ мг меди. Следовательно, 1 мг глюкозы ($47 - 46 = 1$ мг) соответствует 1,8 мг меди, а 1,2 мг ($90,0 - 88,8 = 1,2$ мг) будет соответствовать 0,67 мг глюкозы: $(1,2 \times 1,0) / 1,8$.

Таким образом, искомая величина глюкозы, отвечающая 88,8 мг меди, составит из следующих слагаемых: $46 \text{ мг} + 0,67 \text{ мг} = 46,67 \text{ мг}$.

Полученный результат делим на 2 для пересчета на 1 г почвы и умножаем на поправку влажности почвы K_w . Из полученного при этом значения вычитаем результат определения глюкозы в контрольном простерилизованном образце. Конечная оценка значения инвертазной активности производится с использованием таблицы 3.4.1.

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец почвы	Навеска почвы, г	K_w	Объем аликвоты, мл	Вес осадка Cu_2O , мг	Количество глюкозы, найденное по таблице, мг	Активность инвертазы, мг глюкозы / 1 г почвы / 24 ч	Оценка активности
№	г		V	–	табл. 18	ИА	табл. 14, 25
контроль							

Реактивы

- 1) раствор сахарозы – 8%:** 8 г сахарозы растворяют в 92 мл дистиллированной воды;
- 2) ацетатный буфер (рН 4,9):** раствор А – 136,1 г ацетата натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 л. Раствор Б – 82

мл конц. HCl (пл. 1,19) растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 л. Ацетатный буфер приготавливают смешиванием 50 мл раствора А и 16 мл раствора Б, затем смесь доводят дистиллированной водой до метки в мерной колбе 250 мл;

3) **реактив Феллинга:** раствор **1** – 40 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 л. Раствор **2** – 200 г сегнетовой соли $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в дистиллированной воде, прибавляют 150 г NaOH или KOH и доводят до 1 л. Реактив Феллинга – непосредственно перед анализом растворы **1** и **2** смешивают в химическом стакане в соотношении 1:1;

4) толуол, х.ч.

Нитрификация

Практически весь азот почвы содержится в виде органических соединений: гумусовые вещества, микроорганизмы, растительные остатки и детрит. Доля минерального азота редко превышает 3% от общего его содержания в почве. В ходе биологических процессов происходит постепенный процесс перехода органического азота в его различные минеральные формы: аммиачный азот (как результат процесса аммонификации), нитратный азот (результат процесса нитрификации), а также газообразные азотистые соединения (как следствие денитрификации). Поскольку нитрификация является звеном в цепи реакций превращения азотсодержащих соединений, ее интенсивность может использоваться как интегральный показатель, характеризующий биологическую активность почв – напряженность микробиологических процессов почвенно-биотического комплекса.

Нитрификация – это микробиологический процесс, в котором принимают участие бактерии-нитрификаторы (р. *Nitrobacter*, *Nitrosomonas* и т.д.). Для потребления углерода почвенного воздуха (CO_2), необходимого им в формировании своих микробных тел, они используют энергию, высвобождающуюся при окислении аммиака в нитрит (I фаза нитрификации) и нитрита в нитрат (II фаза нитрификации).

Для развития нитрифицирующих бактерий очень важна аэрированность почвы, которая первой оказывает влияние на интенсивность процесса. В благоприятных условиях (оптимум влаги, теплообеспеченности и хорошая вспушенность почвы) процесс происходит достаточно быстро: в вы-

сокоокультуренных почвах аммоний удобрений на 30 день практически полностью переводится в нитратную форму. Кроме того, в отличие от аммонификаторов нитрифицирующие бактерии, как и азотфиксаторы, очень чувствительны к изменению рН почвы, для протекания процесса наиболее благоприятна слабощелочная среда.

Высокая активность нитрификации характерна для верхних, хорошо аэрированных горизонтов почв, обладающих значительным уровнем плодородия. Однако она может снижаться в результате ряда процессов, являющихся следствием антропогенной деятельности: уплотнения почв, ухудшения водного режима, разрушения почвенной структуры и т.д. Все это является следствием несоблюдения требуемых правил систем земледелия, потерь гумуса, закисления и засоления почв и ряда прочих факторов. Отрицательное влияние на процесс нитрификации оказывает загрязнение почв органическими поллютантами и тяжелыми металлами.

Следует учитывать, что при вовлечении в сельскохозяйственное использование новых, ранее не освоенных земель, находящихся под естественной растительностью, а также в условиях парования земель и множественности механических обработок почвы, минерализация гумуса резко ускоряется, что сопровождается и повышением скорости нитрификационного процесса. В таком случае этот показатель не может рассматриваться как индикатор благополучия почвенной экосистемы. Таким образом, показатель состояния нитрифицирующих микроорганизмов в почве пригоден для оценки более или менее стабильных природных или искусственных экосистем со сложившейся системой взаимодействия с внешними факторами.

Метод определения относительной численности нитрификаторов

Общую численность нитрифицирующей микробиоты учитывают методом предельных разведений с посевом на среду Виноградского.

Посев в пробирки на среду Виноградского (по 5 мл на пробирку) производят из нескольких разведений почвенной суспензии от 10^{-2} до 10^{-4} , в зависимости от удобренности почвы, содержания органического вещества и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем более широкий интервал ее разведения необходимо взять для посева). В качестве микробиологического отклика нитрификаторов ожидают и фиксируют помутнение, а также появление бледно-фиолетового окрашивания столбика среды от капли раствора дифениламина. Инкубацию проводят в

термостате при +28°C, учет проводят на десятый-двадцатый день после посева.

Приготовление среды Виноградского производят следующим образом: к 1 л дистиллированной воды поочередно прибавляют и растворяют при нагревании на асбестовой сетке следующие реактивы: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2 г, K_2HPO_4 – 1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, NaCl – 2 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г, CaCO_3 – 5 г. Соли полностью растворяют перемешиванием, затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 2,0 атм. в течение 25 мин.

Приготовление раствора дифениламина: 1 г дифениламина растворяют в 100 мл конц. H_2SO_4 (пл. 1,84), затем полученный раствор осторожно вливают в 20 мл дистиллированной воды.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3), учитывают микробиологический отклик в пробирках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 4 и 5).

Биологическая активность нитрификаторов

Об активности развития нитрифицирующих бактерий судят не только по их количеству, но также и по интенсивности проводимого ими химического процесса – образованию и накоплению в почве нитратного азота, который называют нитрифицирующей способностью почвы.

Метод определения нитрифицирующей способности почвы

Принцип метода

Для определения нитрифицирующей способности почву на определенный срок помещают в благоприятные для процесса нитрификации условия температуры (+28°C), влажности (60% от ПВ) и свободного доступа кислорода воздуха. Интенсивность нитрификации определяется по разнице в содержании нитратов в почве до и после инкубации и выражается в мг NO_3^- на кг почвы за 14 суток.

Для оценки потенциально возможного уровня нитрификации может вводиться следующая схема исследования:

- 1) почва, увлажненная водой;
- 2) почва, увлажненная водой + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- 3) почва, увлажненная водой + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + CaCO_3 .

Ход работы

Навеску 100 г почвы, взвешенной с точностью до 0,01 г, помещают в колбу емкостью 250-300 мл, параллельно закладывают определение влажности почвы.

Если планируется определение потенциальной нитрифицирующей активности, то кроме вышеописанного образца почвы, закладывают еще две колбы, в которые кроме навесок почвы также вносят 0,14 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (вторая колба) и 0,14 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,5 г CaCO_3 (третья колба). Реактивы в колбе тщательно перемешиваются с почвой.

Почву увлажняют дистиллированной безаммиачной водой до 60% от ПВ, после чего колбу с почвой взвешивают, прикрывают листом фильтровальной бумаги и выдерживают в термостате в течение 14 дней при +26 ...+28°C. В течение этого срока регулярно (через день) определяют общий вес колбы взвешиванием на тех же весах, с которыми работали изначально. При уменьшении веса в результате испарения воды в почву добавляют по каплям безаммиачную воду до восстановления первоначального веса.

После окончания срока инкубации определяется содержание в почве нитратного азота колориметрическим методом. Тот же анализ проводят и перед закладкой опыта на инкубацию с целью определения первоначального содержания нитратов в почве. Разница между значениями принимается за нитрифицирующую активность почвы.

Определение содержания нитратов в почве

В колбы с исследуемыми образцами добавляют пятикратное количество воды (≈ 500 мл). Затем колбы встряхивают на ротаторе 5 мин. и фильтруют через плотный складчатый фильтр. Первые мутные порции фильтра снова переносят на фильтр. После чего, в зависимости от предполагаемой концентрации нитрат-ионов в почве, 10-20 мл прозрачного фильтра переносят в большую фарфоровую чашку и выпаривают на кипящей водяной бане досуха.

К сухому остатку прибавляют 1 мл дисульфифеноловой кислоты и тщательно растирают стеклянной палочкой сухой осадок. Через 10 мин. в чашку добавляют 10 мл воды и при помешивании палочкой приливают 15% раствор NaOH до установления щелочной реакции (яркое пожелтение окраски раствора). Полученный раствор количественно переносят в мер-

ную колбу на 100 мл и доводят до метки безаммиачной дистиллированной водой.

Интенсивность окраски определяют колориметрически с синим светофильтром в кюветах на 10 мм относительно раствора сравнения, аналогично приготовленного с безаммиачной водой.

Для этого 10-20 мл безаммиачной дистиллированной воды выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане, приливают к сухому остатку 1 мл дисульфифеноловой кислоты и тщательно растирают стеклянной палочкой сухой осадок. Через 10 мин. в чашку добавляют 10 мл воды и при помешивании палочкой приливают 15% раствор NaOH до установления щелочной реакции (яркое пожелтение окраски раствора).

Полученный раствор сравнения количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки безаммиачной дистиллированной водой.

Построение калибровочного графика

Навеску 0,1445 г перекристаллизованного и высушенного KNO_3 растворяют в 1 л дистиллированной воды. Затем 100 мл полученного стандартного раствора переносят в литровую колбу и снова доводят до метки водой. В 1 мл полученного рабочего раствора будет содержаться 0,009 мг NO_3^- .

Для построения калибровочного графика берут определенные объемы рабочего раствора в соответствии с таблицей 19, приливают их в фарфоровые чашки, выпаривают досуха на водяной бане и далее по методике определения концентрации нитрат-иона в исследуемом растворе производят колориметрирование относительно холостого раствора, приготовленного с безаммиачной дистиллированной водой (см. выше).

Таблица 19

Исходные данные для построения калибровочного графика

№ колбы	Количество рабочего раствора KNO_3 , мл	Содержание NO_3^- , мг/100 мл	Отсчет по прибору
1	5	0,045	
2	10	0,090	
3	15	0,135	
4	20	0,180	
5	25	0,225	
6	30	0,270	

По полученным данным строят калибровочный график, где по оси ординат откладывают значения отсчета по прибору (оптические плотности калибровочных растворов), по оси абсцисс – значения концентрации NO_3^- (мг/100 мл).

Расчет результатов анализа

Полученное по графику содержание NO_3^- (мг/100 мл) пересчитывают в NO_3^- в мг/кг абс.-сух. почвы по следующей формуле:

$$C = A \cdot V_1 \cdot K_w \cdot 1000 / V_2 \cdot m \quad (7)$$

где C – концентрация нитрат-иона, мг/кг абс.-сух. почвы;

A – содержание NO_3^- в пробе, найденное по графику, мг/100 мл;

V_1 – исходный объем вытяжки, мл;

V_2 – объем вытяжки, взятый на определение, мл;

m – навеска почвы, г;

1000 – коэффициент пересчета на 1 кг почвы;

K_w – поправка на влажность почвы, рассчитываемая по формуле (2).

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец почвы	Навеска почвы, г	K_w	Исходный объем вытяжки, мл	Объем аликвоты, мл	Количество NO_3^- , найденное по графику, мг/100 мл	Содержание нитратов, мг/кг	Нитрифицирующая активность почвы, мг/кг/14 суток
№	m		V_1	V_2	A	C	–
Почва до инкубации (I)							
Почв после инкубации (II)							
Почва (II) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$							
Почва (II) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + CaCO_3							

Нитрифицирующую активность почвы определяют, вычитая исходное содержание нитратов неинкубируемой почвы из содержания нитратов в почве после инкубации.

Реактивы

- 1) **дисульфифеноловая кислота:** 3 г чистого фенола смешивают в небольшой колбе с 20,1 мл конц. H_2SO_4 (пл.1,84) и нагревают в течение 6 ч на кипящей водяной бане, закрыв колбу пробкой с вертикальной длинной трубкой (обратным холодильником). Приготовленную дисульфифеноловую кислоту переливают в темную склянку с притертой пробкой и хранят в темном прохладном месте;
- 2) **KNO_3 , х.ч.;**
- 3) **$CaCO_3$, х.ч.;**
- 4) **$(NH_4)_2SO_4$, х.ч..**

5.1.2. Разложение безазотистых компонентов

Из всего разнообразия безазотистых органических соединений, попадающих в почву естественным или агрохимическим путем, большое значение в питании сельскохозяйственных культур имеют компоненты, содержащие целлюлозу и ее производные.

Целлюлоза (клетчатка) – наиболее распространенное углеродное соединение, синтез которого по масштабам занимает первое место (более 50% от всего синтезируемого органического вещества биосферы). Производители целлюлозы – в основном, высшие растения, а также некоторые грибы (класса *Oomycetes*) и редкие виды бактерий (уксуснокислые рода *Acetobacter*).

Разложение целлюлозы, являющейся доминирующим компонентом промежуточного органического вещества почв, растительных остатков и удобрений, является одним из основных звеньев в цепочке превращений органических соединений в теле почвы. Кроме того, микробная минерализация безазотистых органических веществ в пахотном слое, как весьма длительный и энергоемкий естественный деструкционный процесс, является одним из самых масштабных в педосфере, играет очень важную роль в круговороте углерода и, в первую очередь, в процессе его возврата в атмосферу в виде CO_2 как сырья для фотосинтеза. Разложение клетчатки, как сложный комплексный процесс, совершается при участии как минимум двух групп микроорганизмов: во-первых, истинных бактерий, миксобактерий и актиномицетов, ферменты которых действуют на субстрат при контакте клеточной поверхностью; во-вторых, грибной микробиоты, более

продолжительное воздействие которой сопровождается выделением целлюлаз в виде экзоферментов во внешнюю среду.

В целом развитие целлюлозоразрушающих микроорганизмов резко повышается при попадании в почву растительных остатков, соломы и других грубых органических веществ, что приводит к микробной иммобилизации от 40 до 80% минерального азота, в том числе и азота удобрений, с последующим сохранением его от вымывания. Кроме того, с процессом деструкции целлюлозных компонентов напрямую связано образование гумусовых веществ почвы и формирование почвенной структуры.

Агротехническая нагрузка ускоряет полную минерализацию клетчатки в пашне, вследствие чего активизируется почвенное дыхание, и приземный слой воздуха насыщается углекислым газом, что способствует оптимизации углеродного питания культурных растений. Поэтому изучение жизнедеятельности целлюлозолитиков имеет не менее важное значение, как и изучение микроорганизмов, трансформирующих соединения азота в почве.

Метод определения относительной численности целлюлозолитиков

Численность целлюлозолитической микробиоты учитывают чашечным методом или методом предельных разведений с посевом на среду Гетчинсона-Клейтона.

Посев на чашки с агаром Гетчинсона-Клейтона (АГК) производят из одного разведения почвенной суспензии на выбор (от 10^{-4} до 10^{-6}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+30^{\circ}\text{C}$, подсчет выросших колоний проводят на восьмой-десятый день после посева.

Приготовление среды Гетчинсона-Клейтона производят следующим образом: к 900 мл дистиллированной воды поочередно прибавляют и растворяют при нагревании на асбестовой сетке следующие реактивы: NaNO_3 – 2,5 г, K_2HPO_4 – 1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г, NaCl – 0,1 г, $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 г, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г, агар-агар – 15 г. Соли и агар полностью растворяют перемешиванием. Затем к среде добавляют 10 г фильтровальной бумаги, предварительно замоченной в 100 мл дистиллированной воды и мацерированной стеклянной палочкой до состояния однородной массы.

Вместо бумаги можно использовать натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ-Na) из расчета 5 г на 1 л среды. После полного растворения и равномерного распределения волокон бумаги по среде с помощью индикаторной бумаги и 10% раствора NaOH уравнивают pH среды до 7,0, доводят ее до кипения, разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 2,0 атм. в течение 30 мин.

Посев в пробирки на жидкую среду Гетчинсона-Клейтона (по 5 мл на пробирку) производят из нескольких разведений почвенной суспензии (от 10^{-2} до 10^{-6}), также в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем более широкий интервал ее разведения необходимо взять для посева). Литровый состав среды аналогичен среде чашечного метода **за исключением из состава мацерированной фильтровальной бумаги и агара.**

Учет микробиологического отклика целлюлозолитиков, выращиваемых на жидкой среде Гетчинсона-Клейтона, имеет свои, особенности. После розлива питательной среды в пробирки и ее заражения почвенной суспензией в каждую пробирку опускается узкая полоска стерильной фильтровальной бумаги длиной 5-7 см, половина которой должна находиться над поверхностью среды. Стерилизацию бумаги проводят в сушильном шкафу при $+105^{\circ}\text{C}$ в течение $2^{\text{х}}$ ч.; нарезанные полоски предварительно заворачивают в лист крафт-бумаги. В качестве микробиологического отклика целлюлозолитиков ожидают и фиксируют помутнение среды в пробирках, появление желтых и оранжевых пятен, разрушение бумаги на границе жидкости. Инкубацию проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, учет – на десятый-четырнадцатый день после посева.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3), учитывают число выросших колоний на чашках или микробиологический отклик в пробирках, и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3, 4 и 5).

Биологическая активность целлюлозолитиков

Учет биологической активности целлюлозоразрушающих микроорганизмов проводят как биохимическими методами (определение активности ферментов целлюлаз и определение дыхания почвы), так и аппликаци-

онными методами (определение актуальной и потенциальной целлюлолитической активности).

Целлюлазы – обширная группа гидролазных и трансферазных целлюлозолитических ферментов, куда среди прочих входит целлобиаза, целлобиозо-фосфорилаза, целлюлозополисульфотаза, а также собственно целлюлаза. Целлюлаза (НКФ 3.2.1.4 1,4-β-D-глюкан-4-глюканогидролаза) непосредственно участвует в гидролизе полимеров клетчатки и ее производных по принципу разрушения *о*-гликозидной связи до дисахаридов, глюкозы и целлобиозы.

Метод определения целлюлазной активности почвы по Багнюку и Щетинской

Принцип метода

Метод основан на способности целлюлозолитических ферментов почвы расщеплять углеводные полимеры до глюкозы с последующим определением их количества с помощью антрона. В качестве субстрата используют карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ-Na). По количеству образующейся глюкозы судят о целлюлазной активности почвы.

Ход работы

Навеску 10 г свежей почвы, взвешенной с точностью до 0,01 г и просеянной через сито с диаметром ячеек в 5 мм, помещают в коническую колбу на 100 мл, приливают 1,5 мл толуола, 5 мл ацетатного буфера (рН = 5,5) и 5 мл 1% раствора карбоксиметилцеллюлозы (натриевая соль). Колбу закрывают корковой или резиновой (неплотно) пробкой, содержимое тщательно перемешивают круговыми движениями в течение 5 мин. и ставят на инкубацию в термостат при +35°C на двое суток. Параллельно на инкубацию закладывают два контроля: первый (К₁) – в почву вместо субстрата (раствора КМЦ-Na) добавляют 5 мл воды и остальные реактивы, второй (К₂) – в колбу помещают все исходные реактивы без почвы. Также параллельно ставят навеску почвы для определения влажности.

После инкубации содержимое колб доводят до кипения на асбестовой сетке, затем в колбу приливают 3 мл насыщенного раствора алюмокалиевых квасцов для осаждения КМЦ-Na и встряхивают в течение 1 мин. После чего взвесь фильтруют в мерную колбу на 50 мл, фильтрат доводят дистиллированной водой до метки. Затем 2 мл полученного раствора по-

мещают в пробирку и осторожно приливают к нему 4 мл антронового реактива. Через 20 мин. полученный изумрудно-зеленый раствор колориметрируют при $\lambda = 551$ нм в кюветах на 10 мм относительно окрашенного первого контрольного образца (K_1), заложенного с почвой без субстрата.

Построение калибровочного графика

Навеску 0,02 г химически чистой глюкозы растворяют в 100 мл дистиллированной воды. В 1 мл полученного стандартного раствора будет содержаться 0,2 мг (200 мкг) глюкозы. Затем в 6 конических колб приливают по 10 мл стандартного раствора, разбавляют его определенным объемом дистиллированной воды (табл. 20) и перемешивают.

После чего берут 6 пробирок, в каждую из своей колбы приливают по 2 мл полученного рабочего раствора, добавляют 5 мл антронового реактива и через 20 мин. проводят колориметрирование калибровочных растворов относительно холостого раствора, приготовленного с дистиллированной водой.

По полученным данным строят калибровочный график, где по оси ординат откладывают значения отсчета по прибору (оптические плотности калибровочных растворов), а по оси абсцисс – соответствующие им значения концентрации глюкозы (мкг/2 мл).

Таблица 20

Исходные данные для построения калибровочного графика

№ колбы	Исходный объем стандартного раствора глюкозы, мл	Объем воды, мл	Содержание глюкозы в рабочем растворе, мкг/2 мл	Отсчет по прибору
1	10	390	10	
2	10	190	20	
3	10	90	40	
4	10	56	61	
5	10	40	80	
6	10	30	100	

Расчет результатов анализа

Полученное по графику содержание глюкозы (мкг/2 мл) пересчитывают активность целлюлаз (мг глюкозы/10 г абс.-сух. почвы/48 ч) по следующей формуле:

$$ЦА = (A_1 - A_K) \cdot V_1 \cdot K_w / V_2 \cdot 1000 \cdot m \quad (8)$$

где ЦА – целлюлазная активность почвы, мг глюкозы/1 г абс.-сух. почвы/48 ч;

A_1 и A_K – соответственно количество глюкозы опытного и второго контрольного образца (K_2) почвы, найденные по калибровочному графику, мкг/2 мл;

V_1 – общий раствор после инкубации почвы, мл ($V_1 = 50$ мл);

V_2 – аликвота, взятая на анализ, мл ($V_2 = 2$ мл);

m – навеска почвы, г;

1000 – коэффициент пересчета мкг в мг;

K_w – поправка на влажность почвы, рассчитываемая по формуле (2).

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец почвы	Навеска почвы, г	K_w	Объем аликвоты, мл	Отсчет по прибору	Количество глюкозы, найденное по графику, мкг/2 мл	Активность целлюлазы, мг глюкозы / 10 г почвы / 48 ч.	Оценка активности
№	m		V_2	–	A	ЦА	
опытный					A_1		
контрольный	–	–			A_K		табл. 25

Реактивы

- 1) **раствор карбоксиметилцеллюлозы (натриевая соль) – 1%:** 1 г порошка КМЦ-На растворяют в 99 мл дистиллированной воды при нагревании и непрерывном помешивании на асбестовой сетке.
- 2) **ацетатный буфер (рН = 5,5):** раствор А – 1,15 мл конц. уксусной кислоты растворить в колбе на 100 мл и довести до метки водой. Раствор Б – 2,72 г трехводного ацетата натрия растворить в колбе на 100 л и довести до метки водой. Ацетатный буфер приготавливают смешиванием 8,9 мл раствора А и 41,9 мл раствора Б в колбе на 1 л и доведением до метки дистиллированной водой.
- 3) **насыщенный раствор алюмокалиевых квасцов:** реактив порционно (примерно по 10 г) всыпают в кипящую дистиллированную воду и растворяют помешиванием стеклянной палочкой. Затем раствор квасцов продолжают кипятить и растворять до тех пор, пока на стенках внутри химического стакана не будет видна явная кристаллиза-

ция вещества. Необходимо помнить, что раствор после остужения быстро кристаллизуется, поэтому его нужно использовать горячим.

4) **антроновый реактив:** к 2,5 мл дистиллированной воды осторожно приливают 50 мл конц. H_2SO_4 (пл. 1,84) и дают остыть в холодильнике. После охлаждения в раствор вносят 0,1 г антрона, растворяют и оставляют на 4 ч на льду в морозильной камере.

5) **толуол, х.ч.**

Биохимическое продуцирование почвой углекислого газа

Дыхание почвы – процесс выделения поверхностью почвы углекислого газа за определенный промежуток времени с определенной площади поверхности или из определенной массы почвы.

Продуцирование почвой CO_2 является одним из общепризнанных интегральных показателей оценки биологической активности, показателем скорости трансформации (разложения) органического вещества и уровня развития микроорганизмов. Дыхание почвы определяет уровень углеродного питания растений, необходимого для создания их органической массы.

Из всего количества микробного углекислого газа, образующегося в почве в аэробных условиях, $2/3$ приходится на продуцирование грибами и $1/3$ – бактериями.

Дыхание почвы достаточно широко используется в качестве индикаторного показателя негативного действия пестицидов, тяжелых металлов, нефтепродуктов и других веществ, способных токсически влиять на почвенную систему (особенно ее живую фазу) и сопредельные среды.

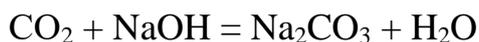
Основные источники дыхания почвы: дыхание корневых систем растений (ДК) и дыхание почвенных микроорганизмов (ДМ). Дыхание почвенной фауны и чисто химическое образование углекислого газа имеет сравнительно меньшее значение, чем ДК и ДМ. Дыхание микроорганизмов разделяют на дыхание ризосферных (и ризоплановых) микроорганизмов (ДРМ), разлагающих корневые выделения (экссудаты, секреты, лизаты, отмирающие клетки и пр.) и дыхание собственно почвенных, неризосферных микроорганизмов (ДПМ), разлагающих гумусовые вещества, растительные остатки и минеральные соединения почвы. Соотношение корневого и микробного дыхания может меняться в зависимости от содержания органического вещества в почве.

Метод определения потенциального дыхания почвы по Галстяну

Принцип метода

Метод определения интенсивности дыхания почвы основан на учете количественных изменений содержания углекислого газа в определенном замкнутом пространстве (коническая колба).

Углекислый газ, выделяющийся из навески почвы за определенное время, улавливается избытком щелочи в колбе по схеме:



Остаток непрореагировавшей щелочи оттитровывается кислотой. Получившееся значение позволяет судить о количестве вступившего в реакцию со щелочью диоксида углерода.

Установка состоит из конической колбы на 250 мл, марлевого мешочка с навеской почвы, определенного объема щелочи и пробки. При инкубации пробы почвы в закрытой колбе в результате биологических процессов происходит снижение концентрации кислорода и нарушается газообмен. Поэтому для устранения данного недостатка колба может соединяться с наружным воздухом при помощи трубки с натронной известью.

Ход работы

Навеску 10 г свежей почвы, просеянной через сито с диаметром ячеек в 5 мм и взвешенной с точностью до 0,01 г, подвешивают в марлевом мешочке в колбе к основанию горла над слоем 25 мл предварительно налитого 0,1 Н раствора NaOH. Колбу закрывают пробкой, которая будет держать мешочек, и ставят на суточную инкубацию в термостат при +28°C. Одновременно с опытной колбой на инкубацию ставят контрольную с таким же объемом раствора щелочи, но без почвы, для учета CO₂ воздуха в колбе. Все колбы периодически встряхивают. После инкубации в колбу добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,1 Н раствором HCl до исчезновения розовой окраски.

Расчет результатов анализа

Количество углекислого газа, выделившееся из навески почвы за 24 часа, рассчитывается по следующей формуле:

$$D = [(25 \cdot K_{\text{NaOH}} - V_{\text{оп.}} \cdot K_{\text{HCl}}) - (25 \cdot K_{\text{NaOH}} - V_{\text{контр.}} \cdot K_{\text{HCl}})] \cdot 0,1 \cdot 7 \cdot K_w \quad (9)$$

где D – интенсивность дыхания почвы, мг CO₂/10 г абс.-сух. почвы/24 ч;

- $V_{\text{оп.}}$ – объем HCl, пошедший на титрование опытного образца, мл;
 $V_{\text{контр.}}$ – объем HCl, пошедший на титрование контрольного образца, мл;
 K_{NaOH} – поправка к титру щелочи;
 K_{HCl} – поправка к титру кислоты;
25 – объем щелочи, взятый для анализа, мл;
7 – количество CO₂, нейтрализующее 1 мл 1 n раствора NaOH, мг;
0,1 – нормальность растворов кислоты и щелочи;
 K_w – поправка на влажность почвы, рассчитываемая по формуле (2).

ФОРМА ЗАПИСИ

№ образца почвы	Навеска почвы, г	K_w	Объем 0,1 n NaOH, мл	Объем 0,1 n HCl, мл	CO ₂ , мг/10 г почвы /24 ч	Оценка интенсивности дыхания
контроль	–	–				табл. 14

Реактивы

- 1) раствор NaOH – 0,1 N:** 4 г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде при нагревании на асбестовой сетке, полученный раствор в колбе на 1 л доводят до метки водой.
- 2) раствор HCl – 0,1 N:** 8,2 мл конц. HCl (пл. 1,19) растворяют в дистиллированной воде, налитой в мерную колбу на 1 л. Затем перемешивают и доводят раствор до метки.
- 3) фенолфталеин – 1% (спиртовой):** 1 г фенолфталеина растворяют в 99 мл 96%-ного этилового спирта.

Оценка интенсивности дыхания почвы проводится с помощью данных таблицы 14.

Метод определения актуального дыхания почвы по Карпачевскому

Этот метод позволяет определить количество углекислого газа, выделяющегося из нативной (естественной) почвы, непосредственно в поле. Он имеет некоторое преимущество перед методом Галстяна, так как позволяет исследовать ненарушенную почву естественных условий. Однако полученное при этом значение может охарактеризовать дыхание не столько почвы, сколько целого комплекса компонентов экосистемы, взаимодействующих на границе почва-атмосфера.

Таким образом, при выборе метода анализа необходимо исходить из целей и задач исследования. Первый метод может использоваться при работе с небольшими объектами (отдельный почвенный образец), второй применим при изучении агроценоза в целом.

Принцип метода

Метод основан на химическом улавливании выделяющегося поверхностью почвы углекислого газа раствором щелочи, помещенным в стеклянный стаканчик на уровне почвы. По истечении определенного срока титриметрическим методом определяется количество оставшейся щелочи, непрореагировавшей с CO_2 приземного слоя воздуха, а затем и количество CO_2 , вступившее в реакцию со щелочным раствором. Полученная величина будет характеризовать интенсивность актуального дыхания почвы.

Ход анализа

В 2 небольших стеклянных стаканчика объемом 50 мл и диаметром 4-6 см (диаметр необходимо измерить для расчета) прилить по 2 мл 0,1 Н раствора NaOH . Затем один стаканчик ставится на поверхность почвы опытного участка, второй – в место, удаленное от поверхности почвы. Секундомером фиксируется начало опыта. Через 20 мин. в опытный стаканчик к раствору добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют из микробюретки 0,1 Н раствором HCl . Титрование проводят непосредственно на месте закладки опыта.

Параллельно проводят титрование контрольного образца щелочи, не выставившегося на поверхность почвы.

Расчет результатов анализа

Расчет массы углекислого газа (кг/га в час) производят по формуле:

$$D = [(V_{\text{оп.}} - V_{\text{контр.}}) \cdot 0,1 \cdot 0,000022 \cdot 10^8 \cdot 60] / (S \cdot 20) \quad (10)$$

где D – интенсивность дыхания почвы, мг $\text{CO}_2/10$ г абс.-сух. почвы/24 ч;

$V_{\text{оп.}}$ – объем HCl , пошедший на титрование опытного образца, мл;

$V_{\text{контр.}}$ – объем HCl , пошедший на титрование контрольного образца, мл;

0,1 – нормальность кислоты;

0,000022 – количество CO_2 , эквивалентное 1 мл 1 Н кислоты, кг;

10^8 – коэффициент перевода cm^2 в га;

60 – количество минут в 1 часе;

S – площадь поверхности поглотителя ($S = \pi \cdot r^2 = 3,14 \cdot r^2$);

20 – время опыта, мин.

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец почвы	Площадь поглотителя, см ²	Объем 0,1 n HCl, пошедший на титрование опытного образца, мл	Объем 0,1 n HCl, пошедший на титрование контрольного образца, мл	CO ₂ , кг/га в час

Реактивы

- 1) **раствор NaOH – 0,1 N:** 4 г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде при нагревании на асбестовой сетке, полученный раствор в колбе на 1 л доводят до метки водой.
- 2) **раствор HCl – 0,1 N:** 8,2 мл конц. HCl (пл. 1,19) растворяют в дистиллированной воде, налитой в мерную колбу на 1 л. Затем перемешивают и доводят раствор до метки.
- 3) **фенолфталеин – 1% (спиртовой):** 1 г фенолфталеина растворяют в 99 мл 96%-ного этилового спирта.

Апликационные методы определения активности разложения целлюлозы по Мишустину, Петровой и Востровóму

Целлюлозолитическая активность – апликационная активность разложения целлюлозы почвенными микроорганизмами в течение определенного промежутка времени, которая выражается степенью потребляемости субстрата.

Любое нарушение деятельности микробиоценоза почвы, которое может быть обусловлено антропогенной нагрузкой большей или меньшей интенсивности, может вызвать подавление функции деструкции отмершей биомассы. Результатом этого может быть накопление в почве грубого органического вещества, связывающего в недоступном для растений состоянии значительное количество биогенных элементов.

В свою очередь, интенсивность его разложения, являющаяся следствием микробиологической активности и свидетельствующая о возвращении аккумулированных в ней элементов питания в активную часть биологического круговорота, может служить показателем благополучия изучаемой территории.

Метод определения актуальной целлюлозолитической способности почвы

Принцип метода

Метод основан на определении интенсивности разложения куска ткани (лен), помещенного в почву на определенный срок. Количество ткани, разложившееся за время экспозиции, используется как показатель целлюлозолитической способности (активности) почвы.

Ход работы

Для анализа вырезается кусок льняной неотбеленной ткани размером 30×50 мм, высушивается при +105°С, выдерживается 2 часа при комнатной температуре и взвешивается с точностью до 0,001 г. Ткань помещается в пакет из инертного материала (нейлон) с отверстиями в 1 мм. При изучении почвенной подстилки пакет помещается на ее поверхности и покрывается слоем той же подстилки. При изучении почвы пакет с тканью укладывается в слой 0-5 см под углом 15° с помощью штыковой лопаты.

После завершения опыта пакет с тканью извлекается из почвы, осторожно очищается от проросших корешков и остатков почвы. Ткань высушивается при +105°С, выдерживается 2 часа при комнатной температуре и взвешивается. Потеря в весе (в %) служит показателем микробиологической активности почвы.

Срок проведения эксперимента зависит от цели исследования. При изучении естественных экосистем образец ткани закладывается осенью (сентябрь-октябрь) и извлекается через год или несколько лет. В агроэкосистемах несколько образцов одновременно закладываются сразу после весенних обработок почвы и последовательно извлекаются с интервалом в один, два или три месяца. Повторность опыта 3-5-кратная.

Метод определения потенциальной целлюлозолитической способности почвы

Принцип метода

В лабораторных условиях скорость разложения целлюлозы в почве определяют модифицированным методом Кристенсена. Метод основан на учете интенсивности разложения целлюлозы (фильтровальной бумаги), помещенной вместе с почвой в чашку Петри при оптимальных условиях развития микроорганизмов. По разнице в весе (в %) фильтровальной бума-

ги до и после инкубации образца судят об интенсивности целлюлозолитической активности почвы.

Ход работы

На дно стерильной чашки Петри помещают предварительно взвешенный с точностью до 0,001 г стерильный диск фильтровальной бумаги диаметром как внутренний диаметр чашки (стерилизацию бумаги проводят в сушильном шкафу при +105°C в течение 2^х ч.). Фильтр прикрывают сеткой из капроновой ткани, на которой равномерным слоем распределяют 30 г почвы, увлажненной до 60% от ПВ. Закрытые чашки помещают на 30 дневную инкубацию в термостат при +27°C с периодическим контролем состояния влажности почвы и увлажнением поверхности дистиллированной водой из промывалки.

По окончании инкубации из чашки почву осторожно высыпают, отделяют капроновую ткань, остатки фильтра счищают со дна чашки, высушивают при температуре +105°C и взвешивают.

Расчет результатов анализа

Актуальную и потенциальную способность (активность) разложения целлюлозы вычисляют по следующей формуле:

$$\text{АЦА (\%)} = (M_0 - M_K) \cdot 100 / M_0 \quad (11)$$

где АЦА – аппликационная целлюлозолитическая активность почвы, %;

M_0 – исходная масса куска льняной ткани или фильтровальной бумаги, г;

M_K – масса куска льняной ткани или фильтровальной бумаги, определенная после проведения опыта, г;

100 – коэффициент перевода в %.

5.2. Деструкция минералов почвы, удобрений и мелиорантов

Среди всех химических элементов почвы, встречающихся в ее неорганических соединениях, наиболее значимыми в агроэкологической микробиологии являются фосфор, калий и кремний. Поскольку, во-первых, вынос культурными растениями данных макроэлементов имеет большие значения, во-вторых, в почве практически нет специфических

микроорганизмов, выполняющих роль минерализации именно фосфорных или калийных соединений. Этот процесс протекает под действием ферментов очень большого количества микробных ассоциаций почвы и имеет характер, сопутствующий сапротрофному питанию прокариот. Поэтому в подобных случаях говорят о функции всей почвенной микробиоты трансформировать минеральную часть почвы.

5.2.1. Фосфатмобилизующая функция

В отличие от почвенного азота, состоящего в основном из органических соединений, фосфор почвы представлен примерно на 2/3 минеральными соединениями (соли металлов различных фосфорных кислот) и на 1/3 органическими веществами (фитин, фосфолипиды, фосфопротеиды, фитаты, нуклеопротеиды и др.), но в большей своей массе имеет слабую доступность в питании сельскохозяйственных культур.

Поступление фосфора в почву происходит за счет выделения экзогенных секретов корневой системой растений, при отмирании растительных и животных тканей, а также за счет внесения органических и минеральных удобрений.

Важная роль в минерализации и мобилизации фосфора почвы принадлежит почвенной микробиоте. Исключительной активностью к растворению труднодоступных фосфатов обладают плесневые грибы р. *Aspergillus* и *Penicillium*, бациллы видов *Bac. mesentericus*, *Bac. subtilis*. Кроме них такой активностью также обладают роды бактерий *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Sarcina*, *Actinomyces* и прочие. Поэтому изучение динамики численности и биохимической активности микробных фосфатредуцентов почвы в определенной степени может показать состояние доступности фосфора в питании культурных растений.

Метод определения относительной численности фосфатредуцентов

Вследствие того, что фосфорные соединения почвы могут иметь органическую и минеральную природу, численность фосформобилизующей микробиоты также разделена на численность фосфорных органотрофных и фосфорных литотрофных микроорганизмов.

Численность фосфорных органотрофов учитывают чашечным методом посева на среду Менкиной из одного разведения почвенной суспензии на выбор (от 10^{-4} до 10^{-6}) в зависимости от содержания органического ве-

щества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при +30°C, учет выросших колоний проводят на пятый-десятый день после посева.

Приготовление среды Менкиной производят путем последовательного растворения в 1 л дистиллированной воды следующих реактивов: лецитин – 2,5 г, глюкоза – 10 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г, NaCl – 0,3 г, KCl – 0,3 г, CaCO_3 – 5 г, агар-агар – 20 г. Лецитин предварительно растворяют в 5 мл 96% этанола. Соли и агар полностью растворяют перемешиванием и нагреванием на асбестовой сетке, приливают спиртовой раствор лецитина, затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 2,0 атм. в течение 20-30 мин.

Численность фосфорных литотрофов учитывают чашечным методом посева на среду Муромцева из одного разведения почвенной суспензии на выбор (от 10^{-4} до 10^{-8}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при +30°C, учет выросших колоний проводят на пятый-десятый день после посева.

Приготовление среды Муромцева производят путем последовательного растворения в 1 л дистиллированной воды следующих реактивов: глюкоза – 10 г, аспарагин – 1 г, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – 5 г, K_2SO_4 – 0,2 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г, агар-агар – 20 г. Фосфат кальция предварительно размалывают в ступке в тонкий порошок. Соли и агар полностью растворяют перемешиванием и нагреванием на асбестовой сетке, и доводят до кипения. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,5 атм. в течение 25 мин.

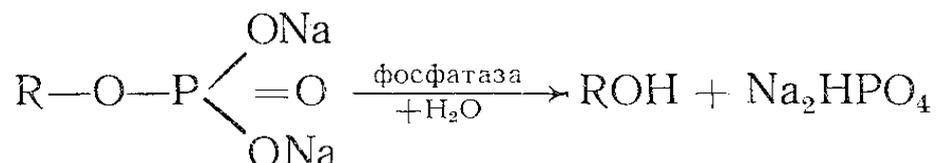
После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3), учитывают число выросших колоний на чашках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3 и 4).

Биохимическая активность фосфорредуцирующих микроорганизмов

Учет активности фосфорредуцентов почвы проводят биохимическим способом в виде определения активности гидролитических ферментов

микроорганизмов и корней растений – фосфатаз, способных трансформировать почвенный фосфор.

Фосфатазы (НКФ 3.1.3.17 фосфорилазы, фосфогидролазы) – это большая группа почвенных ферментов, катализирующих гидролиз фосфорорганических соединений по фосфоэфирным связям:



Активность данной ферментной системы характеризует степень мобилизации фосфора в клетках микроорганизмов и последующую трансформацию органических фосфатов в минеральные после отмирания микробной биомассы почвы. Именно последний факт определяет доступность микробного фосфора в питании культурных растений.

Метод определения фосфатазной активности почвы по Галстяну

Принцип метода

Метод основан на способности фосфатаз почвы расщеплять органический фосфорсодержащий субстрат до солей фосфорной кислоты с последующим определением их количества с помощью щелочи. В качестве субстрата используют p-нитрофенилфосфат (Na-соль). По количеству образующегося фосфора (P_2O_5) судят о фосфатазной активности почвы.

Фосфатазы почвы очень чувствительны к изменению pH почвы, поэтому при измерении фосфатазной активности используют буферный раствор с pH = 8,0 для нейтральных и слабощелочных почв и буферный раствор с pH = 5,4 для кислых почв. Общую активность почвенных фосфатаз определяют при естественной pH почвы.

Ход работы

Навеску 1 г свежей почвы, просеянной через сито с диаметром ячеек в 5 мм и взвешенной с точностью до 0,01 г, вносят в коническую колбу емкостью 100 мл, добавляют 0,25 мл толуола и 3 мл 0,5% водного раствора натриевой соли p-нитрофенилфосфата. Если определяют активность кислотной или щелочной фосфатазы почвы, то 0,5 % раствор субстрата приготавливают на этаноламин-ацетатном буфере (см. ниже).

Содержимое колбы встряхивают круговыми движениями, закрывают корковой или резиновой (неплотно) пробкой и ставят на 30^{мин.} инкубацию в термостат при +30°C. За время инкубации колбы осторожно встряхивают 2 раза. Параллельно закладывают два контроля: первый (K₁) – в почву вместо субстрата (нитрофенилфосфата) добавляют 3 мл воды и остальные реактивы, второй (K₂) – в колбу помещают все исходные реактивы без почвы. Также параллельно ставят навеску почвы для определения влажности.

После инкубации в колбу приливают 22 мл дистиллированной воды, почву взмучивают и фильтруют в мерную колбу на 50 мл. К полученному фильтрату приливают 5 мл 1 Н раствора NaOH, перемешивают и доводят раствор до метки. Полученный ярко-желтый раствор колориметрируют при $\lambda = 440$ нм в кюветах на 10 мм относительно окрашенного первого контрольного образца (K₁), заложенного с почвой без субстрата.

Построение калибровочного графика

Навеску 0,01 г химически чистого п-нитрофенола растворяют в 100 мл дистиллированной воды. В 1 мл полученного рабочего раствора будет содержаться 0,1 мг п-нитрофенола (что соответствует 0,223 мг P₂O₅). Затем берут 6 мерных колб на 50 мл, в соответствии с таблицей 21 в каждую приливают определенный объем рабочего раствора, добавляют 5 мл 1 Н раствора NaOH, перемешивают и доводят раствор до метки.

Затем проводят колориметрирование калибровочных растворов. В качестве раствора сравнения при колориметрировании используют холостой образец, заложенный с дистиллированной водой.

По полученным данным строят калибровочный график, где по оси ординат откладывают значения отсчета по прибору (оптические плотности калибровочных растворов), а по оси абсцисс – соответствующие им значения концентрации п-нитрофенола или P₂O₅ (мг P₂O₅/50 мл).

Таблица 21

Исходные данные для построения калибровочного графика

№ колбы	Количество рабочего раствора п-нитрофенола, мл	Содержание п-нитрофенола, мг/50 мл	Содержание P ₂ O ₅ , мг/50 мл	Отсчет по прибору
1	0,1	0,01	0,022	
2	1,0	0,1	0,223	
3	5,0	0,5	1,115	
4	10,0	1,0	2,230	
5	15,0	1,5	3,345	
6	20,0	2,0	4,460	

Расчет результатов анализа

Полученное по графику содержание P_2O_5 (мг/50 мл) пересчитывают активность фосфатаз (мг P_2O_5 /1 г абс.-сух. почвы/30 мин.) по следующей формуле:

$$\text{ФА} = (A_1 - A_k) \cdot V_1 \cdot K_w / V_2 \cdot m \quad (12)$$

где ФА – фосфатазная активность почвы, мг P_2O_5 /1 г абс.-сух. почвы/30 мин.;

A_1 и A_k – соответственно количество P_2O_5 опытного и второго контрольного (K_2) образца почвы, найденные по калибровочному графику, мг/50 мл;

V_1 – общий раствор после инкубации почвы, мл ($V_1 = 25$ мл);

V_2 – аликвота, взятая на анализ, мл ($V_2 = 25$ мл);

m – навеска почвы, г;

K_w – поправка на влажность почвы, рассчитываемая по формуле (2).

Реактивы

- 1) **раствор п-нитрофенилфосфата натрия – 0,5%:** 0,5 г порошка натриевой соли п-нитрофенилфосфата растворяют в 99,5 мл дистиллированной воды. Для определения кислой или щелочной фосфатазы навеску растворяют в 99,5 мл этаноламин-ацетатного буфера с известным значением рН.
- 2) **этанолламин-ацетатный буфер:** раствор А – 12,2 мл моноэтаноламина растворяют в колбе на 1 л и доводят дистиллированной водой до метки. Раствор Б – 6 мл конц. уксусной кислоты (пл. 1,05) растворяют в колбе на 1 л и доводят дистиллированной водой до метки.
Буфер с рН = 5,4: 25 мл раствора А и 70 мл раствора Б смешивают в мерной колбе на 100 мл и доводят до метки.
Буфер с рН = 8,0: 25 мл раствора А и 50 мл раствора Б смешивают в мерной колбе на 100 мл и доводят до метки.
- 3) **раствор КОН – 1 Н:** 56 г гидроксида калия растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды в колбе на 1 л, после чего доводят раствор до метки.
- 4) **п-нитрофенол, х.ч.**
- 5) **толуол, х.ч.**

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец почвы	Навеска почвы, г	K_w	Объем аликвоты, мл	Отсчет по прибору	Количество P_2O_5 , найденное по графику, мг/50 мл	Активность фосфатазы, мг P_2O_5 / 1 г почвы / 30 мин.	Оценка активности
№	m		V_2	–	A	ФА	табл. 14
опытный					A_1		
контрольный	–	–			A_k		

5.2.2. Калий- и кремниймобилизующая функция

Большинство микроорганизмов, способных к трансформации почвенных силикатов, являются гетеротрофами. Поэтому в процессе преобразования минеральной части почвы они участвуют косвенно, за счет образующихся кислотных продуктов своего метаболизма, которые оказывают гидролитическое действие на минералы почвы и удобрений. Такой способностью обладают многие почвенные прокариоты, поэтому облигатных силикатных бактерий в почве практически нет, а микробный процесс разрушения минералов почвы называют общей микробной функцией.

Однако, в почве выделены некоторые специфические силикатные прокариоты из рода бацилл (*Bac. mucilaginosus*, *Bac. siliceus*), а также некоторые актиномицеты, которые, за счет выделения кетоглутаровой и подобных кислот, способны более активно растворять алюмосиликаты почвы с высвобождением водорастворимых соединений калия и кремния. Поэтому определение численности микроорганизмов, способных расти на средах с источниками минерального калия и кремния, может показать потенциальную активность к гидролизу внесенных в почву минеральных удобрений и мелиорантов.

В целом нужно отметить, что к пулу силикатредуцирующих микроорганизмов почвы относят многие гетеротрофные и некоторые автотрофные микроорганизмы (например, бактерии р. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, грибы р. *Penicillium*), ведущие себя как аллохтоны (L-стратеги) и олиготрофы (K-стратеги), которые способны к усиленному продуцированию слизевых метаболитов кислотного характера (летучие – муравьиная и уксусная кислоты, монокарбоновые – молочная и пировиноградная кислоты, дикарбоновые – щавелевая и янтарная кислоты, трикарбоновые – лимонная и винная кислоты), а также различных экзополисахаридов.

ридов с большим числом карбоксильных групп. Было выявлено, что данные вещества активно воздействуют на алюмосиликатные и иные минералы почв, способствуя их разрушению и извлечению соединений кремния в почвенный раствор.

Также отдельно необходимо сказать про вид *Bacillus mucilaginosus*, в свое время подробно изученный Е.Я. Виноградовым и коллегами. Данный вид бактерий является хемоорганогетеротрофным микроорганизмом, который может проявлять себя и как типичный сапротроф и как олигонитрофил, то есть он способен расти на бедных средах и в то же время активно усваивать неорганические соединения.

Бацилла обитает в верхних слоях почв и в ризосфере корней, ее различные штаммы распространены практически повсеместно. Представляет собой неподвижную ровную палочку с бациллярным типом спороношения и субтерминальным расположением споры; грам-вариабельна в зависимости от возраста культуры и питательной среды, в культуре встречаются моно-, дипло- и недлинные стрепто-формы. Особенностью *Bac. mucilaginosus* является образование большой слизистой капсулы, состоящей на 95% из полисахаридов, на 3% из белков и иных веществ (антибиотики, ферменты, антигены и др.). Недостаток азота и избыток углеводов в окружающей среде способствует более активному образованию капсулы и проявлению азотфиксирующей функции. Отличительной особенностью химического состава клеток бактерии является очень большое содержание кремния, что показывает его активное усвоение из окружающей среды, в том числе при деструкции различных кремнистых пород.

Индивидуальным веществом слизи данной бациллы является линейные кислые гетерогликаны с α -1,4-гликозидными связями, в которые входят, в том числе уроновые кислоты и N-ацетилглюкозамин. Сопутствующими компонентами являются низкомолекулярные органические кислоты (лимонная, щавелевая, салициловая, пирокатехиновая, галловая, валидиновая и кофейная), которые данные бактерии выделяют в большом количестве при трансформации минералов. Образующиеся при этом органоминеральные соединения подвижны и, в свою очередь, обладают высокой биологической активностью в почвах.

Среди ферментного набора, продуцируемого данными бациллами, высоки концентрации нуклеаз, протеаз, целлюлаз, целлобиаз, амилаз, фос-

фатаз и эстераз, что определяет их широкое участие в деструкции различных растительных остатков и иных веществ в почвах.

Также биохимическая работа *Bac. mucilaginosus* активно способствует разложению фосфорорганических веществ и труднорастворимых минералов в почвах (силикаты, глинистые минералы, апатиты, фосфориты), что приводит к высвобождению в почвенный раствор ионов калия, водорастворимых форм кремния, алюминия и подвижных фосфатов. Данные аспекты приводят к оптимизации питания естественных и агрофитоценозов. Рядом авторов указывается на различное ростостимулирующее действие микробных метаболитов (гетероауксины, витамин В₁ и др.) на посевы сельскохозяйственных культур, а также на стабилизирующий эффект в отношении микробного пула экологически неустойчивых территорий (микробный токсикоз нарушенных земель вследствие загрязнения тяжелыми металлами, избыточным количеством пестицидов и радионуклидов). В чистом виде бацилла используется в биогеотехнологических процессах микробной деградации пород (бокситов, каолинов, сынныритов, различных полевых шпатов и др.) с целью промышленного выщелачивания и обогащения редкоземельных металлов, алюминия, особо чистого кремнезема и других веществ.

Метод определения относительной численности калий- и кремниймобилизующих микроорганизмов

Численность силикатных прокариот почвы учитывают чашечным методом посева на алюмосиликатный агар (АСА) из одного разведения почвенной суспензии на выбор (от 10^{-3} до 10^{-5}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, учет выросших колоний проводят на второй-четвертый день после посева.

Приготовление алюмосиликатного агара (АСА) производят путем последовательного растворения в 1 л дистиллированной воды следующих реактивов: крахмал – 20 г, NaCl – 0,15 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,15 г, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ – 1 г, Na_2SiO_3 – 1 г, CaCO_3 – 2 г, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – 1,5 г, агар-агар – 15 г. Соли и агар полностью растворяют перемешиванием и нагреванием на асбестовой сетке, доводят до

кипения, затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,0 атм. в течение 20 мин.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3), учитывают число выросших колоний на чашках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3 и 4).

5.3. Трансформация промежуточных органических веществ почвы

В процессе разложения органической части почвы как естественного происхождения в виде растительного опада и остатков животных, так и привнесенного в нее извне в виде органических удобрений, количество простых соединений достаточно быстро уменьшается за счет активного развития аммонифицирующей, амилолитической и других функциональных видов микроорганизмов, входящих в общую группу зимогенной микробиоты.

По мере снижения концентрации в почве простых сахаров, белков и низкомолекулярных жирных кислот рост и развитие первичных гидролитиков замедляется и на смену им приходит микробиота *олиготрофной* группы. Сюда входят, как правило, неспоровые микроорганизмы, зачастую с необычной морфологией, которые в отличие от зимогенных гидролитиков длительное время живут в почве и, по сути, составляют группу основных утилизаторов органического вещества на конечной стадии его превращения. Причиной тому является способность олиготрофов жить и питаться в условиях с низкой концентрацией доступных компонентов пищи.

С другой стороны, существует условное разделение олиготрофной микробиоты почвы на *олигонитрофилов*, ассимилирующих из почвенного раствора малые количества азотистых соединений, и *олигокарбофилов*, способных усваивать углеродсодержащие вещества. Данная градация олиготрофной части почвенного микробиоценоза позволяет дифференцированно оценить переработку промежуточного вещества почвы по элементам, значимым с точки зрения агроэкологических исследований – углероду и азоту.

Такой подход в исследованиях дает возможность проследить степень деструкции органического вещества, оценить направление микробиологической и сукцессионной стадии развития почвы и в целом охарактеризо-

вать общую напряженность микробной переработки и подготовки вещества для процесса гумификации.

Метод определения относительной численности олиготрофов

Общую численность всей олиготрофной микробиоты почвы учитывают чашечным методом посева на *почвенный агар (ПА)*, приготовленный из той почвы, на которой проводят соответствующие агрохимические и иные исследования.

Посев на чашки с почвенным агаром производят из одного на выбор разведения почвенной суспензии (от 10^{-2} до 10^{-4}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, учет выросших колоний проводят на пятый-десятый день после посева.

Если в программе исследований заложено изучение нескольких почвенных разностей, то почвенный агар приготавливают из каждого типа почвы, который требуется изучить. Но при этом, сравнивая полученные результаты в качестве эталонной численности всех олиготрофов данной почвенно-климатической зоны, выбирают численность на ПА, полученную из наиболее плодородной почвы этой зоны.

Приготовление ПА производят смешиванием 1 кг исследуемой почвы с 1 л 0,1%-ного раствора Na_2CO_3 . Полученную суспензию доводят до кипения на асбестовой сетке, охлаждают и фильтруют через фильтр «белая лента» и кусок ваты. Затем к фильтрату добавляют 0,5 г CaCO_3 , 0,2 г K_2HPO_4 и 20 г агар-агара, растворяют при нагревании на асбестовой сетке и перемешивании стеклянной палочкой, затем приливают дистиллированной воды до 1 л и снова доводят до кипения. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 2 атм. в течение 30 мин.

После подготовки питательной среды производят посев почвенной суспензии на чашки Петри в соответствии с методикой посева, учитывают количество колоний и пересчитывают в численность КОЕ/1 г почвы.

Метод определения относительной численности олигонитрофилов

Олигонитрофилы – часть олиготрофных микроорганизмов, способных расти в условиях незначительного количества доступного азота в поч-

венном растворе. Именно поэтому, а также за счет наличия в геномном аппарате особых генов, обуславливающих способность к фиксации азота воздуха, многие из них являются несимбиотическими азотфиксаторами (*дiazотрофами*) и способны фиксировать атмосферный азот, который в последующем используют в своем питании.

Поскольку процесс фиксации азота олигонитрофилами сложен и достаточно энергозатратен, он запускается только в том случае, когда концентрация аммиака в почвенном растворе крайне низкая. В подобной ситуации diaзотрофы, поскольку имеют мощную ферментную систему, помимо азотфиксации начинают разлагать гумусовые соединения почвы, в частности азотистые компоненты гуминовых и фульвокислот гумуса.

Поэтому учет численности олигонитрофилов позволяет не только определить способность почвенного микронаселения к несимбиотической фиксации азота воздуха, что используется в снабжении растений доступными формами азота, но и проследить за активностью разложения гумусовых соединений.

Общую численность олигонитрофилов почвы учитывают чашечным методом посева на *агар Эшби (АЭ)*.

Посев на чашки с агаром Эшби производят из одного на выбор разведения почвенной суспензии (от 10^{-2} до 10^{-4}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, учет выросших колоний проводят на пятый-десятый день после посева.

Приготовление агара Эшби производят следующим образом: к 1 л дистиллированной воды поочередно прибавляют и растворяют при нагревании на асбестовой сетке следующие реактивы: сахароза – 20 г, K_2SO_4 – 0,1 г, K_2HPO_4 – 0,2 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г, NaCl – 0,2 г, CaCO_3 – 5 г и агар-агар – 20 г. Соли и агар полностью растворяют перемешиванием стеклянной палочкой, затем приливают 1 мл **раствора микроэлементов по Федорову** и доводят до кипения.

Приготовление раствора микроэлементов по Федорову производят следующим образом: к 1 л дистиллированной воды поочередно прибавляют и растворяют при медленном нагревании на асбестовой сетке и перемешивании стеклянной палочкой следующие реактивы: H_3BO_3 – 5,0 г,

$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 5,0 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г, KCl – 0,5 г, NaBr – 0,5 г и $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г.

Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,5-2,0 атм. в течение 30 мин.

После подготовки питательной среды производят посев почвенной суспензии на чашки Петри в соответствии с методикой посева, учитывают количество колоний и пересчитывают в численность КОЕ/1 г почвы.

Метод определения относительной численности олигокарбофилов

Олигокарбофилы – другая часть олиготрофных микроорганизмов, способных развиваться в условиях незначительного содержания доступных углеродсодержащих соединений в почвенном растворе.

Данная подгруппа олиготрофов обладает высокой ферментативной активностью окислительно-восстановительного характера воздействия на разлагаемый субстрат и поэтому по биохимической принадлежности наиболее приближена к автохтонной части микробиоценоза почвы. В условиях минимального количества или полного отсутствия доступного углерода в почвенном растворе олигокарбофилы начинают трансформировать свободные и новообразованные фракции гумуса и, тем самым, участвовать в преобразовании специфического органического вещества почвы и изменять ее гумусовой режим.

Общую численность олигокарбофилов почвы учитывают чашечным методом посева на водный агар по Эрскову (голодный агар – ГА).

Посев на чашки с голодным агаром производят из одного на выбор разведения почвенной суспензии (от 10^{-2} до 10^{-4}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^\circ\text{C}$, учет выросших колоний проводят на пятый-десятый день после посева.

Приготовление голодного агара (ГА) производят растворением в 1 л дистиллированной воды 20 г агар-агара при нагревании на асбестовой сетке и перемешивании стеклянной палочкой. Раствор доводят до кипения, разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,5-2,0 атм. в течение 30 мин.

После подготовки питательной среды производят посев почвенной суспензии на чашки Петри в соответствии с методикой посева, учитывают количество колоний и пересчитывают в численность КОЕ/1 г почвы.

Таким образом, проведение исследований по учету численности олигонитрофильных микроорганизмов позволяет проследить за степенью и направленностью разложения промежуточного органического вещества почвы и, в целом, за состоянием почвенной среды как резервуара первичных компонентов гумификации.

5.4. Трансформация гумусовых веществ почвы

Гумус является одним из специфических органических веществ почвы, во многом определяющий почвенное плодородие, а его содержание находится в тесной зависимости от биохимического состояния почвы.

Известно, что с большей или меньшей скоростью, зависящей от химического состава растительного материала и условий почвенной среды, до 70-80% поступающих в почву растительных остатков в конечном итоге минерализуется нацело и лишь 20-30% гумифицируется до гумусовых веществ.

Гумификация является длительным и сложным физико-биохимическим процессом формирования особой группы высокомолекулярных органических кислот, образующихся из продуктов разложения, главным образом, растительных остатков. Процесс гумификации частично протекает под действием микроорганизмов почвы, при этом в образовании гумуса из разлагающейся растительной массы ведущую роль играют микроскопические грибы и в их отсутствие одни бактерии гумусовых веществ образовать не могут.

Вместе с тем, специфических микроорганизмов почвы, выполняющих только одно преобразование растительных остатков в гумус, не выявлено. Показано, что данная функция микробного пула почвы присуща многим микроорганизмам, имеющим мощный ферментативный аппарат. Здесь имеется в виду часть автохтонной группировки микробиоты, участвующей в неполной деградации сложных высокомолекулярных соединений (клетчатка, хитин, лигнин, смолы, полифенолы и др.), к которой относятся некоторые прокариоты р. *Nocardia*, *Arthrobacter* и *Pseudomonas* и некоторые грибы р. *Aspergillus* и *Penicillium*.

Автохтонная группа микроорганизмов характеризуется как коренная или собственно почвенная микробиота, которая стоит последней в ряду деструкторов поступающего в почву органического вещества и во многом определяет синтез и распад гумусовых соединений.

Гумус является одним из специфических органических соединений почвы, слагающим ее плодородие, а его содержание находится в тесной зависимости от биохимического состояния почвы.

К автохтонной группе почвенного микробиоценоза относят те микроорганизмы, которые способны в качестве единственного источника питания или наряду с другими источниками использовать гумусовые вещества. Данная группа микробиоты при нормальном питательном режиме (целина, почвы естественных лесов и лугов) не доминирует в почве, так как в ней всегда имеется определенный запас легкоразлагаемого органического вещества, который способствует активному развитию другой группы микробиоценоза (сапротрофной). Кроме того, за счет химической сложности большинству развивающихся в таких условиях сапротрофных микроорганизмов агрономически ценный гумус недоступен.

За счет уменьшения количества привносимых растительных остатков в пахотные почвы по сравнению с целиной изменяется степень их гумификации. Поначалу это может приводить к относительному увеличению содержания фракций гумуса, более устойчивых к микробному разложению, поскольку менее устойчивые начинают разлагаться активизированной автохтонной микробиотой. Дальнейшее освоение сельскохозяйственных земель ведет к возрастанию доли автохтонных микроорганизмов, что, в итоге, влечет за собой еще более интенсивную минерализацию гумуса.

Наиболее активное развитие автохтонов и, как следствие, усиление разложения гумусовых компонентов наблюдается в условиях высокого дефицита поступающего в почву легкоразлагаемого органического вещества (неудобряемая пашня, техногенно нарушенные земли).

В целом, к внешним условиям, усиливающим процесс деструкции гумуса почвы, относят:

- 1) смену сезонов года: весной и осенью происходит всплеск численности микроорганизмов, использующих легкогидролизуемое органическое вещество (сапротрофная часть), а в летнее время активнее развивается микробиота, использующая собственно гумусовые компоненты (автохтонная часть);

- 2) структуру севооборота: в почве под пропашными культурами гумусовые компоненты разлагаются более интенсивно, по сравнению с почвами, занятыми культурами, растущими сплошным покровом;
- 3) усиление аэрации почвы при частой культивации и перепашке;
- 4) паровой режим содержания полей;
- 5) одностороннее внесение минеральных, особенно азотных, удобрений;
- 6) полное отсутствие каких-либо удобрений при выращивании культур.

В результате многолетних исследований было установлено, что к автотонной группе микробиоценоза почвы относятся многие представители бактерий р. *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Bactoderma*, *Micromonospora* и *Arthrobacter*. Поскольку у таких видов микроорганизмов, в отличие от зимогенной микробиоты, слабо выражена протеолитическая активность, данная микробиота не способна усваивать элементы питания из легкодоступного органического вещества. Эти микроорганизмы способны использовать только специфические органические компоненты почвы различной степени гумификации как источник энергии, углеродного и азотного питания.

Функцию активного участия в разложении гумуса также приписывают многим другим представителям почвенного микробиоценоза. Это некоторые виды родов *Actinomyces*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Mycococcus*, *Rhodotorchia*, *Rhodotorula* и другие виды.

Одним из главных участников деструкции гумуса почвы является грамположительный актиномицет рода *Nocardia*, представленный палочковидными и кокковидными формами и дающий на твердых средах характерные колонии с мицелиальным налетом (воздушными гифами). Именно этому микроорганизму приписывается основная роль в разложении гуминовых и фульвокислот гумуса, поскольку у многих видов нокардий отсутствуют простые гидролитические ферменты (протеазы, липазы, амилазы и инвертазы), что и ограничивает их участие в ассимиляции свежих органических остатков. В таблице 22 представлена схема развития некоторых видов рода *Nocardia* и возможные пути изменения гумусового режима почвы.

Таблица 22

**Возможное изменение гумусового режима почвы
в зависимости от видового состава нокардий в почве**

Доминантный вид рода <i>Nocardia</i>	Возможные условия активизации развития	Гумус как источник...	Изменения гумусового режима почвы
<i>N. rubra</i> <i>N. corallina</i>	- бессменный пар; - отсутствие органических удобрений; - чрезмерная агротехническая нагрузка на почву	углерода и азота	чрезмерная активизация разложения гумуса почвы
<i>N. mucosum</i>	- удобрение культур азотными туками; - отсутствие известкования почвы	углерода	разложение гумуса превосходит его медленный синтез
<i>N. symbiotica</i>	- выращивание культур сплошного сева с мощной корневой системой (озимые зерновые, травы); - целинные земли, территории естественных биогеоценозов	азота	синтез гумуса превосходит его медленное разложение

С другой стороны, за счет продуцирования более активной системы редокс-ферментов (пероксидазы и полифенолоксидазы) на долю нокардий выпадает использование наиболее устойчивых продуктов распада органического вещества – восков, смол, углеводов, ароматических (лигнин) и гетероциклических соединений и их производных.

Современные представления о роли нокардий в трансформации гумуса почвы позволяют определять не только их общую численность по количеству выросших колоний на чашке, но также по видовому разнообразию и доминированию видов определять состояние специфического органического вещества и направленность процесса его синтеза-распада в почве.

Таким образом, учет численности автохтонной микробиоты почвы может сопровождаться не только констатацией количества микроорганизмов, способных разлагать гумусовые соединения, но и по распределению различных их видов дает возможность проследить за степенью деструкции специфического органического вещества почвы и, как следствие, предположить возможные пути преобразования гумуса.

Метод определения относительной численности автохтонной микробиоты

Косвенный учет количества микроорганизмов, участвующих в трансформации гумусовых веществ почвы, проводят чашечным методом посева на почвенный агар (ПА), нитритный агар по Теппер (НАТ) или голодный агар по Эрскову (ГА). При этом, на НА учитывают численность микробиоты, способной трансформировать азот гумусовых кислот, на ПА – численность микробиоты, способной трансформировать свободные и новообразованные фракции гумуса, а на ГА – потенциальную численность автохтонной микробиоты, в целом участвующей в преобразовании гумусовых соединений почвы.

Численность автохтонов на всех средах учитывают из одного разведения почвенной суспензии на выбор (от 10^{-2} до 10^{-4}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, учет выросших колоний проводят на пятый-десятый день после посева.

Приготовление сред производят путем последовательного растворения в 1 л дистиллированной воды следующих реактивов:

- 1) **нитритный агар по Теппер (НАТ):** NaNO_2 – 1 г, K_2HPO_4 – 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, NaCl – 0,5 г, Na_2CO_3 – 1 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4 г, гумат К или Na – 5 мл, агар-агар – 20 г.
- 2) **голодный (водный) агар по Эрскову (ГА):** агар-агар – 20 г.

Соли и агар полностью растворяют перемешиванием и нагреванием на асбестовой сетке, затем доводят до кипения. После чего среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 2 атм. в течение 30 мин.

3) **Почвенный агар (ПА)** приготавливают смешиванием 1 кг высокоплодородной почвы с 1 л 0,1% раствора Na_2CO_3 . Полученную суспензию доводят до кипения на асбестовой сетке, затем после охлаждения фильтруют через фильтр и кусок ваты. К фильтрату добавляют 0,5 г CaCO_3 , 0,2 г K_2HPO_4 и 20 г агар-агара, растворяют перемешиванием, доводят до 1 л дистиллированной водой, затем снова доводят до кипения. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 2 атм. в течение 30 мин.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3.), учитывают

число выросших колоний на чашках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3 и 4).

По окончании инкубации чашки достают из термостата, определяют общее число колоний и пересчитывают его в численность КОЕ автохтонной микробиоты почвы. Если требуется, то дополнительно определяют видовой состав микроорганизмов.

По культуральным признакам вырастающих на нитритном агаре колоний дифференцируют следующие роды и виды микроорганизмов, наиболее типичные формы колоний которых представлены на рисунке 9.

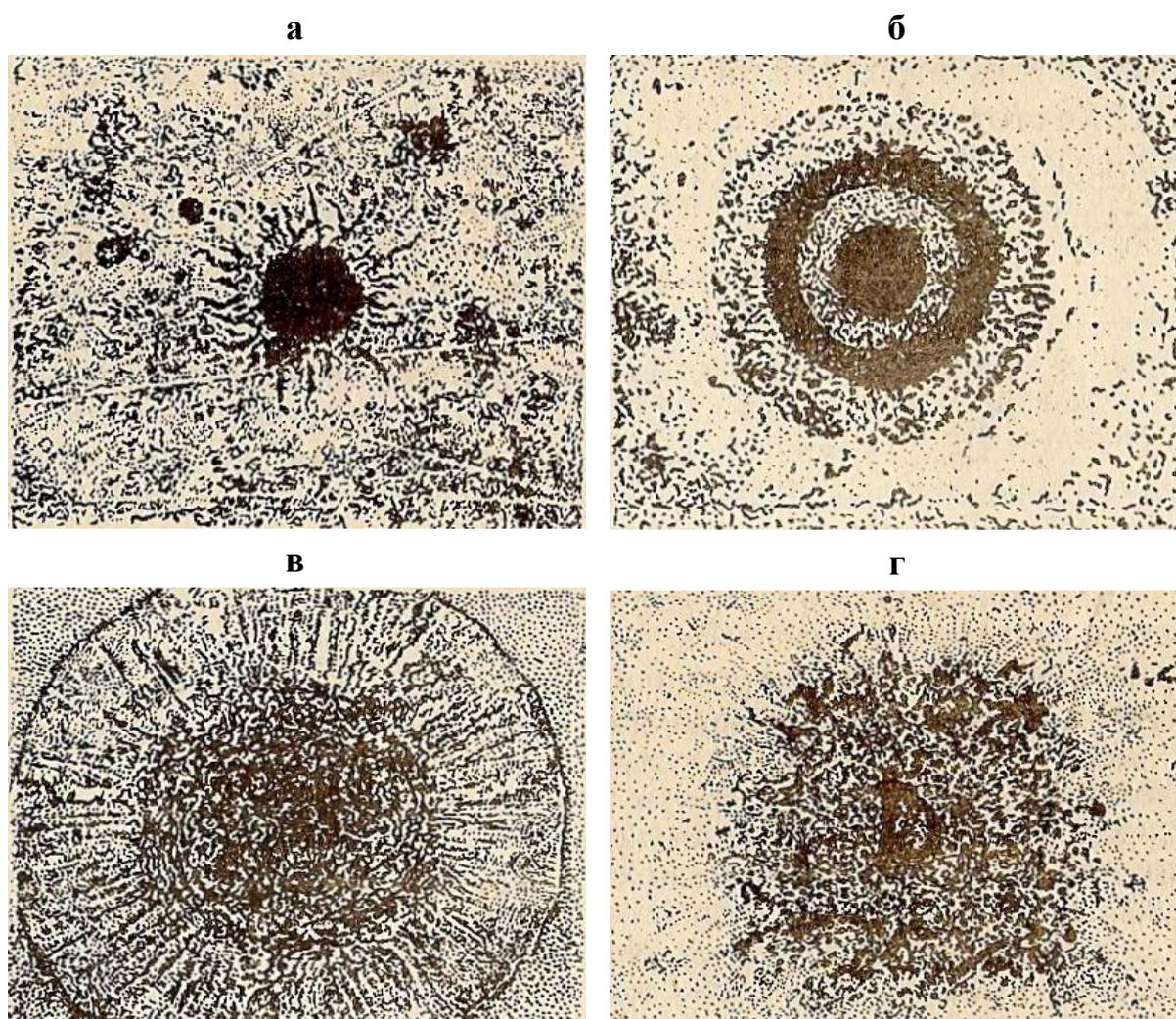


Рис. 9. Характерный рост колоний автохтонной микробиоты на нитритном агаре (Теппер Е.З., 1993): а – *Nocardia*, б – *Arthrobacter*, в – *Micromonospora*, г – *Bactoderma*

p. Nocardia – колонии пастообразные, слизистые или сухие и складчатые, по периферии которых образуется ватообразная зона в виде мицелиального ободка. В центре колонии чаще преобладают фрагментирован-

ные гифы, поэтому сама колония имеет бархатистую поверхность. Колонии могут быть бесцветными, белыми, серыми, лимонно-желтыми, желтыми, оранжевыми, рыжими, розовыми, красными, пурпурными или коричневыми.

p. Arthrobacter – колонии мелкие, 2-3 мм в диаметре, плоские или слегка приподнятые, чаще бесцветные, иногда могут иметь зеленовато-желтый оттенок. По периферии колонии образуется кружевной или складчатый ободок, у отдельных представителей рода края колоний могут быть зазубренные.

p. Micromonospora – колонии мелкие и, как правило, полностью погружены в питательную среду. На поверхности агара кольцеобразно или радиально располагаются бесцветные или темноокрашенные комочки слизи.

p. Bactoderma – колонии мелкие, 2-3 мм в диаметре, имеют вид белой или розовой бархатистой пленки. В центре колония складчатая, а по периферии – стекловидная; край колонии, как правило, волнистый или лопастной.

Среди рода **нокардий** (р. *Nocardia*), участвующих в трансформации гумуса почвы, по культуральным признакам вырастающих на среде колоний можно различить основные виды:

Noc. rubra – колонии мелкие, округлые, 1,5-3,0 мм в диаметре, одиночные, как правило сухие, плоские, с неправильным, лопастным или фестончатым краем. Мицелиальный ободок для вида *rubra* характерен, но развит слабо. Для данного рода отличительным признаком является немого переливающаяся бархатистая кроваво-красная окраска колоний.

Noc. corallina – колонии очень мелкие, округлые, 1-2 мм в диаметре, с куполообразной поверхностью, при росте на среде собраны в грозди и напоминают скопления мелких шариков. Мицелиальный ободок для вида *corallina* не типичен. Окраска колоний, как правило, молочно-белая, ярко-желтая или красная.

Noc. mucosum – колонии мелкие, 2-3 мм в диаметре, неправильной формы. Цвет колоний бледный, серый, белый и другие оттенки бледного цвета. Мицелиальный ободок у данного рода, как правило, присутствует. Отличительным признаком вида *mucosum* является наличие слизистой капсулы вокруг колонии.

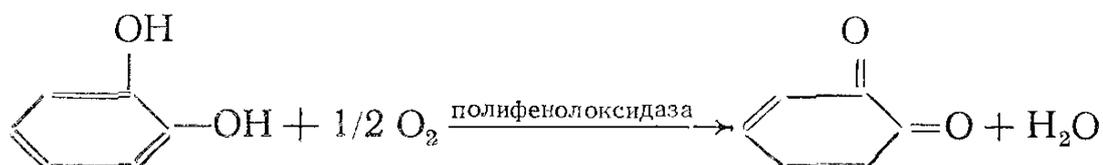
Noc. symbiotica – колонии мелкие, 2-3 мм в диаметре, различных светлых цветов, складчатые и сухие, по периферии которых образуется заметный мицелиальный ободок.

Биохимическая активность микроорганизмов, трансформирующих гумус

В микробиологической части процесса синтеза гумусовых веществ принимают участие микробные редокс-ферменты полифенолоксидазы, а в процессах минерализации гумуса – пероксидазы. Все они относятся к классу оксидоредуктаз. Как правило, активность полифенолоксидазы с увеличением содержания гумуса постепенно повышается, а активность пероксидазы – резко снижается.

Метод определения полифенолоксидазной активности почвы по Козлову

Полифенолоксидаза (НКФ 1.10.3.1 *o*-дифенол: O₂-оксидоредуктаза) участвует в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса. Она катализирует окисление фенолов до хинонов в присутствии кислорода воздуха, которые в последствии при конденсации с аминокислотами и пептидами образуют первичные молекулы гуминовых кислот гумуса:



Принцип метода

Метод основан на способности полифенолоксидазных ферментов почвы окислять фенольный субстрат до хинонов с последующим определением их количества при помощи титрования раствором йода. Действующим окислительным началом является кислород воздуха. В качестве субстрата используют пирокатехин. По количеству образующегося пурпурогаллина, титруемого раствором йода, судят о полифенолоксидазной активности.

Ход работы

Навеску 5 г свежей почвы, просеянной через сито с диаметром ячеек в 5 мм и взвешенной с точностью до 0,01 г, помещают в коническую колбу на 50 мл, приливают 3 мл дист. воды, затем 2 мл 0,1% раствора аскорбиновой кислоты и 1 мл 0,02 М раствора пирокатехина.

Содержимое колбы тщательно встряхивают, после чего ставят на инкубацию на водяную баню точно на 2 мин при +30°C.

Затем колбу снимают, добавляют 1 мл 10% раствора ортофосфорной кислоты для инактивирования ферментов и перемешивают. Затем содержимое колбы фильтруют.

Параллельно закладывают один контроль (K_1) – в почвенный фильтрат вместо субстрата (пирокатехина) добавляют 1 мл воды и остальные реактивы. Также одновременно ставят навеску почвы для определения влажности.

Затем 1 мл фильтрата переносят в колбу для титрования и добавляют 1 мл 1% раствора крахмала. Содержимое колбы перемешивают и титруют 0,01 Н раствором йода до появления синей окраски, устойчивой в течение 30 с.

Расчет результатов анализа

Активность полифенолоксидазы (мл 0,01 Н р-ра I_2 /1 г абс.-сух. почвы/2 мин.) рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{ПФА} = (7 / m) \cdot (A_1 - A_k) \cdot T \cdot K_w \quad (13)$$

где ПФА – полифенолоксидазная активность почвы,
мл 0,01 Н р-ра I_2 /1 г абс.-сух. почвы/2 мин.;

A_1 и A_k – соответственно количество 0,01 Н раствора I_2 , израсходованного на титрование опытного и контрольного образца (K_1) почвы, мл;

7 – общий объем реакционной смеси, мл;

m – навеска почвы, г;

T – поправка к титру 0,01 Н раствора I_2 ;

K_w – поправка на влажность почвы, рассчитываемая по формуле (2).

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец почвы	Навеска почвы, г	K_w	Объем аликвоты, мл	Количество 0,01 Н р-ра I_2 , израсходованного на титрование, мл	Активность полифенолоксидазы, мл 0,01 Н р-ра I_2 / 1 г абс.-сух. почвы / 2 мин.	Оценка активности
№	m		V		ПФА	табл. 25
опытный			7	A_1		
контрольный	—	—	7	A_k		

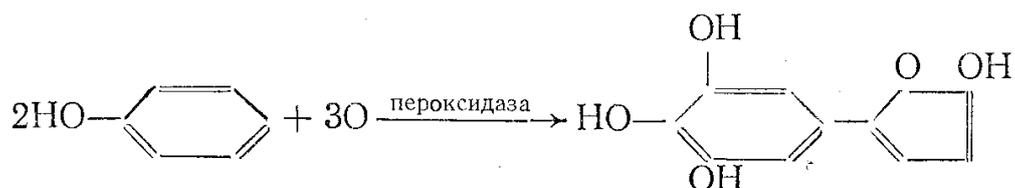
Реактивы

- 1) **раствор пирокатехина – 0,02 М:** 2,20 г порошка пирокатехина ($C_6H_6O_2$) растворяют в 0,5 л дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л, затем доводят водой до метки. Раствор нестойкий и хранению не подлежит.
- 2) **раствор аскорбиновой кислоты – 0,1%:** 0,1 г аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды.
- 3) **раствор H_3PO_4 – 10%:** 5,9 мл чистой H_3PO_4 (пл. 1,70) растворяют в 94,1 мл дистиллированной воды.
- 4) **раствор I_2 – 0,01 Н:** готовят из фиксанала (стандарт-титра) стандартного раствора йода в йодистом калии.

Метод определения пероксидазной активности почвы по Козлову

Пероксидаза (НКФ 1.11.1.7 донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза), наряду с полифенолоксидазой, участвует в синтезе и распаде гумусовых соединений ароматического ряда. Она катализирует окислительное действие всевозможных органических перекисей, выделяющихся в почву в результате жизнедеятельности микроорганизмов и корней высших растений.

Тем самым происходит окислительное преобразование фенолов, аминов и гетероциклов до хинонов и их производных в присутствии свободного кислорода перекисных соединений:



Принцип метода

Метод основан на способности пероксидазных ферментов почвы окислять фенольный субстрат до хинонов и их производных с последующим определением их количества при помощи титрования раствором йода. Действующим окислительным началом является свободный (атомарный) кислород перекиси водорода. В качестве субстрата также используют пирокатехин. По количеству образующегося пурпурогаллина, титруемого раствором йода, судят о пероксидазной активности.

Ход работы

Навеску 5 г свежей почвы, просеянной через сито с диаметром ячеек в 5 мм и взвешенной с точностью до 0,01 г, помещают в коническую колбу на 50 мл, приливают 26 мл ацетатного буферного раствора (рН = 4,9), затем смесь тщательно перемешивают и оставляют на 2 часа, после чего фильтруют.

Затем 1 мл фильтрата переносят в пробирку, добавляют 1 мл 0,4% раствора перекиси водорода, 2 мл 0,1% раствора аскорбиновой кислоты и 1 мл 0,02 М раствора пирокатехина. Содержимое пробирки тщательно встряхивают, после чего ставят на инкубацию на водяную баню точно на 2 мин при +30°C.

Затем пробирку снимают, добавляют 1 мл 10% раствора ортофосфорной кислоты для инактивирования ферментов и перемешивают. Затем содержимое пробирки переносят в колбу для титрования, добавляют 1 мл 1% раствора крахмала. Содержимое колбы перемешивают и титруют 0,01 Н раствором йода до появления синей окраски, устойчивой в течение 30 с.

Параллельно закладывают один контроль (K_1) – вместо почвенного фильтрата используют 1 мл воды и остальные реактивы. Также одновременно ставят навеску почвы для определения влажности.

Расчет результатов анализа

Активность пероксидазы (мл 0,01 Н р-ра I_2 /1 г абс.-сух. почвы/2 мин.) рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{ПРА} = (A_1 - A_k) \cdot T \cdot K_w \cdot m \quad (14)$$

где ПРА – пероксидазная активность почвы,

мл 0,01 Н р-ра I_2 /1 г абс.-сух. почвы/2 мин.;

A_1 и A_k – соответственно количество 0,01 Н раствора I_2 , израсходованного на титрование опытного и контрольного образца (K_1) почвы, мл;

m – навеска почвы, г;

T – поправка к титру 0,01 Н раствора I_2 ;

K_w – поправка на влажность почвы, рассчитываемая по формуле (2).

ФОРМА ЗАПИСИ

Образец почвы	Навеска почвы, г	K_w	Объем аликвоты, мл	Количество 0,01 Н р-ра I_2 , израсходованного на титрование, мл	Активность пероксидазы, мл 0,01 Н р-ра I_2 / 1 г абс.-сух. почвы 2 мин.	Оценка активности
№	m		V		ПРА	
опытный			7	A_1		табл. 25
контрольный	—	—	7	A_k		

Реактивы

1) ацетатный буфер (рН 4,9): раствор А – 136,1 г ацетата натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 л. Раствор Б – 82 мл конц. HCl (пл. 1,19) растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 л. Ацетатный буфер приготавливают смешиванием 50 мл раствора А и 16 мл раствора Б, затем смесь доводят дистиллированной водой до метки в мерной колбе 250 мл

2) раствор пирокатехина – 0,02 М: 2,20 г порошка пирокатехина ($C_6H_6O_2$) растворяют в 0,5 л дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л, затем доводят водой до метки. Раствор нестойкий и хранению не подлежит.

3) раствор аскорбиновой кислоты – 0,1%: 0,1 г аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

4) раствор H_3PO_4 – 10%: 5,9 мл чистой H_3PO_4 (пл. 1,70) растворяют в 94,1 мл дистиллированной воды.

5) раствор I_2 – 0,01 Н: готовят из фиксанала (стандарт-титра) стандартного раствора йода в йодистом калии;

6) раствор перекиси водорода – 0,4%: 0,08 мл 30% перекиси водорода растворяют в 20 мл дистиллированной воды.

5.5. Полифункциональные группы микроорганизмов почвы и их роль в почвообразовательных процессах

Среди всех представителей почвенной микроскопической жизни, более или менее разграниченной по функциональным особенностям развития и требованиям к условиям обитания, существуют формы, деятельность которых невозможно охарактеризовать в виде одной-двух выполняемых функций. Это **микроскопические грибы** (микромикеты) и **лучистые грибки** (актиномицеты). Изначально сапротрофные по своей природе обе группы способны к усвоению самых разнообразных органических и минеральных соединений, недоступных или труднодоступных к усвоению обычными сапротрофами. Кроме того, они могут выполнять такие специфические микробные функции как нитрификация, автотрофная ассимиляция CO_2 воздуха и другие. Изучение динамики их численности позволяет судить не столько о ходе какого-то определенного сапротрофного процесса почвы, сколько об общем состоянии протекающей деструкции почвенного вещества и о состоянии экосистемы в целом.

Гумификация является длительным и сложным физико-биохимическим процессом формирования особой группы высокомолекулярных органических кислот, образующихся из продуктов разложения, главным образом, растительных остатков.

Известно, что с большей или меньшей скоростью, зависящей от химического состава растительного материала и условий окружающей среды, до 70-80% поступающего в почву опада растений в конечном итоге минерализуется до простых веществ и лишь 20-30% преобразуется до гумусовых соединений.

С другой стороны, известно, что в микробной массе среднее соотношение $\text{C} : \text{N}$ составляет примерно 6.6 : 1.0, то есть имеет относительно высокую долю азота. Вследствие этого большая часть органического вещества микробиомассы (3/4) легко минерализуется, высвобождая усвояемые растениями формы азота, и только 1/4 преобразуется в гумус.

Функция преобразования растительных остатков в гумус присуща многим микроорганизмам микробного пула, имеющим не гидролитический, а окислительно-восстановительный ферментативный аппарат. В частности, к таковым относится часть автохтонной группы микробиоценоза, участвующая в неполной деструкции сложных высокомолекулярных соединений (клетчатка, хитин, лигнин, смолы, полифенолы и другие веще-

ства). Сюда относят некоторые прокариоты р. *Nocardia*, *Arthrobacter* и *Pseudomonas*, плесневые грибы р. *Aspergillus*, *Penicillium* и другие.

Среди представителей всей почвенной микроскопической жизни занимаемая грибами и актиномицетами эколого-трофическая ниша вызывает особый интерес, поскольку их деятельность в почве невозможно охарактеризовать в виде нескольких выполняемых функций. Изначально являясь сапротрофными, обе группы микробиоты способны к усвоению самых разнообразных органических и минеральных соединений, порой труднодоступных к усвоению обычными гнилостными бактериями. В частности, они могут выполнять такие специфические для микроорганизмов реакции, как гетеротрофная нитрификация, образование пигментных веществ и другие.

Поэтому изучение динамики их численности позволяет судить не столько о ходе какого-то определенного минерализационного процесса на пути к процессу синтеза гумусовых веществ, сколько об общем течении деструкции почвенного вещества и о состоянии экосистемы в целом.

5.5.1. Грибы

Особенности мицелиального (нитчатого) строения тела грибных микроорганизмов, высокая скорость его роста, а также наличие активной полиферментной системы обуславливают распределение грибницы в огромных почвенных массах и распространение ее на больших площадях. Вследствие этого происходит очень активное и более менее равномерное действие грибных ферментов на растительные остатки и почвенные частицы, что приводит к достаточно быстрой трансформации вещества и повышению доступности биогенных элементов для растений.

В целом, грибы считаются жесткими всесторонними деструкторами вещества почвы, но при этом различным классам микроскопических грибов (микромицетов) присуща своя предрасположенность к химическому составу пищевого субстрата. Путем регуляции почвообразовательных процессов, состава органического вещества почвы, ее оструктуренности, кислотности и подвижности элементов питания в почвенном растворе микромицеты осуществляют значимую работу в формировании плодородия целинных и окультуренных земель.

В вопросе о роли микромицетов в синтезе гумусовых веществ особое внимание привлекают виды, способные продуцировать темноокрашенные

пигменты типа **меланинов** – полимеров фенольной природы. Меланины являются сложными химическими образованиями, которые формируются в клетках многих микроорганизмов, но больше всего меланинов продуцируется гифами и репродуктивными органами (спорами) грибов.

Меланины представляют собой высокополимерные соединения черного и коричневого цвета с молекулярной массой в несколько тысяч или десятков тысяч а.е.м., образующиеся при ферментативном окислении фенолов и индолов (пирокатехина, тирозина, диоксииндола и т.п.) с последующей полимеризацией продуктов окисления.

Наибольшее количество меланинов и других видов пигментов образуют грибы р. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cenococcum*, *Cladosporium*, *Dicoccium*, *Diplococcium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Mucor*, *Mycogone*, *Nadsoniella*, *Penicillium*, *Stahybotris*, *Stemphylium* и других родов, содержание пигментов в которых может достигать 2-3% на сухую биомассу мицелия.

С другой стороны, в 10 см слое почвы на площади 1 м², сформировавшемся под травянистой растительностью, накапливается около 60 г грибного мицелия, а в почве под лесом эта масса может достигать 100-120 г/м². С учетом того, что общая доля грибов в микробном пуле почвы составляет в среднем 5% от объема всей микробиоты, количество меланинов, поступающих с мицелием в почву, может достигать значительных размеров. Это дает основания считать грибной меланиногенез одним из основных источников гумусообразования почвы.

Одной из главных природных функций грибов в почве является средообразование. За счет особенностей нитчатого строения грибного тела (мицелий), высокой скорости его роста, а также наличия мощной полиферментной системы, грибница пронизывает огромные почвенные массы и существует по принципу «одновременно везде». Вследствие чего происходит равноценное и очень активное действие экзоферментов грибов на растительные остатки и почвенные частицы, что приводит к быстрой трансформации почвенного вещества, повышению доступности биогенных элементов для растений.

Грибы считаются жесткими всесторонними деструкторами почвенного вещества. Путем регуляции почвообразовательных процессов, состава органического вещества почвы, ее оструктуренности, кислотности, регуляции подвижности элементов питания, микромицеты осуществляют

значимую работу в формировании плодородия целинных и окультуренных почв.

В почве грибы представлены самыми разнообразными по пищевым потребностям формами, поэтому универсальной питательной среды для их учета не существует. Кроме того, при учете численности грибов создается ряд трудностей, в частности, появляется проблема дробления грибного мицелия на произвольное количество отдельных частей, вследствие чего не удастся дифференцированно учесть споры грибов и мицелий в отдельности. Поэтому при количественном учете грибов говорят не об их численности в целом, а о числе КОЕ грибных зачатков.

Метод определения относительной численности грибов

Численность КОЕ грибных зачатков почвы, способных усваивать легкодоступные органические соединения, учитывают чашечным методом посева на среду Чапека-Докса из одного разведения почвенной суспензии на выбор (от 10^{-4} до 10^{-6}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, учет выросших колоний проводят на пятый-десятый день после посева.

Приготовление среды Чапека-Докса производят путем последовательного растворения в 1 л дистиллированной воды следующих реактивов: сахара – 30 г, NaNO_3 – 3,0 г, K_2HPO_4 – 1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г, KCl – 0,5 г, CaCO_3 – 3 г, агар-агар – 15 г. Соли и агар полностью растворяют перемешиванием и нагреванием на асбестовой сетке, доводят до кипения. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,5 атм. в течение 30 мин.

Непосредственно перед розливом среды по чашкам Петри к 1 л расплавленной стерильной среды Чапека-Докса приливают 4 мл стерильной концентрированной молочной кислоты. Стерилизацию молочной кислоты проводят также автоклавированием.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3), учитывают число выросших колоний на чашках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3 и 4).

5.5.2. Актиномицеты

Актиномицеты представляют собой группу прокариотных микроорганизмов, состоящую из множества самых разнообразных таксономических групп: собственно актиномицеты, проактиномицеты (нокардии), микобактерии, микококки, псевдобактерии, некоторые представители пропионовокислых и молочнокислых бактерий, микромонопоры и прочие. Всех их объединяет особое морфологическое строение: наличие мицелия, подобного мицелию грибов. Масса 1 мг мицелиальной колонии актиномицета может иметь общую протяженность мицелия более 1000 м.

Около 70-80% актиномицетам присуща особенность активного продуцирования пигментов, из них до 50% культур лучистых грибков способны выделять пигменты бурого и черно-бурого цвета меланоидного типа. Меланоиды представляют собой новообразованные гумусовые вещества, близкие к почвенным гуминовым и фульвокислотам. Кроме того, аминокислотный состав гуминоподобных веществ, продуцируемых актиномицетами (до 17 аминокислот), схож с таковым гумуса почвы.

За счет наличия у лучистых грибков широкого спектра ферментов они считаются полисапротрофными микроорганизмами. При этом всех ярче у актиномицетов выражена протеолитическая, амилолитическая и инвертазная активность. Поэтому изучение численности данной группы микроорганизмов в почве, подобно учету численности грибов, позволяет судить об общем состоянии агроэкосистемы в целом.

Метод определения относительной численности актиномицетов

Численность лучистых грибков почвы, способных усваивать легкодоступные органические соединения, учитывают чашечным методом посева на среду Гаузе № 1 из одного разведения почвенной суспензии на выбор (от 10^{-4} до 10^{-6}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, учет выросших колоний проводят на восьмой-десятый день после посева.

Приготовление среды Гаузе № 1 производят путем последовательного растворения в 1 л дистиллированной воды следующих реактивов: крахмал – 20 г, KNO_3 – 1,0 г, K_2HPO_4 – 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г, NaCl – 0,5 г, агар-агар – 20 г. Соли и агар полностью

растворяют перемешиванием и нагреванием на асбестовой сетке, доводят до кипения. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,5 атм. в течение 30 мин.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3), учитывают число выросших колоний на чашках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3 и 4).

5.6. Специфические функции микроорганизмов почвы и их роль в почвообразовательных процессах

Основной микробиологический процесс преобразования органических и минеральных соединений почвы, растительных остатков и вносимых удобрений, сопровождается развитием особых групп почвенного микробиоценоза, которые участвуют в первичном усвоении недоступного азота воздуха и его перевода в доступную минеральную форму после отмирания микробиомассы. Азотфиксация является главенствующей в экологическом смысле функцией почвенных микроорганизмов, поскольку именно она запускает биологическую сторону круговорота азота в биосфере. Изучение состояния азотфиксации в пахотных почвах является важным этапом в понимании потенциальной продуктивности пашни.

С другой стороны, процесс микробиологического высвобождения молекулярного азота из почвенной толщи за счет активизации развития денитрифицирующих микроорганизмов, также характеризует состояние почвенного плодородия, а именно его физико-механическую сторону: степень оструктуренности и увлажнения почвы. Изучение микробиологической стороны данного явления также актуально, поскольку в результате процесса денитрификации минерального азота удобрений из переувлажненной или обесструктуренной почвы потери азота могут достигать 25-40%.

5.6.1. Азотфиксация

Несмотря на достаточный запас азота в большинстве более или менее окультуренных почв, а также, несмотря на потенциальное выполнение почвенным микробиоценозом аммонифицирующей функции, в реальных условиях данный процесс протекает сравнительно медленно, что отрицательно сказывается на количестве доступных форм азота в пахотном горизонте.

Именно поэтому роль азотфиксации микроорганизмов в почве трудно переоценить, поскольку получаемый даром в результате их жизнедеятельности минеральный азот при оптимальных условиях развития может практически полностью обеспечить будущий урожай сельскохозяйственных культур доступной формой одного из главных микроэлементов питания.

Количество биологического азота пахотных почв мира, образуемого азотфиксирующими бактериями, составляет более 100 млн. т в год. А так как, ежегодный мировой вынос азота с сельскохозяйственной продукцией составляет примерно 110 млн. т., азот микробиологического происхождения потенциально окупает урожай культурных растений.

Азотфиксирующая функция присуща истинным прокариотам и архебактериям, имеющим в генотипе специфическую комбинацию генов – *nif*-гены. Именно такой генотип микробной клетки способен программировать синтез нитрогеназы – особого фермента, участвующего в фиксации молекулярного азота воздуха. Среди подобных микроорганизмов выделяют свободноживущих азотфиксаторов р. *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinchia*, *Derxia* и др.; ассоциативных – р. *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и др.; симбиотических – р. *Rhizobium* и др.

Однако способность к азотфиксации может лимитироваться неблагоприятными условиями окружающей среды: переувлажнение почвы, низкое содержание доступного органического вещества в почве, ее высокая кислотность и загрязненность органическими поллютантами, пестицидами и тяжелыми металлами.

Поэтому учет численности почвенных diaзотрофов проводят не только с целью определения потенциальной азотфиксирующей способности почвы, но и с целью установления благополучия почвы как среды обитания жизни и роста сельскохозяйственных культур.

Метод определения относительной численности азотфиксаторов

1) Учет численности свободноживущих diaзотрофов почвы проводят чашечным методом посева на среду Эшби из одного разведения почвенной суспензии на выбор (от 10^{-4} до 10^{-6}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^{\circ}\text{C}$, учет выросших колоний проводят на четвертый-шестой день после посева.

Приготовление среды Эшби производят путем последовательного растворения в 1 л дистиллированной воды следующих реактивов: сахароза – 20 г, K_2HPO_4 – 0,2 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 г, $NaCl$ – 0,2 г, K_2SO_4 – 0,1 г, $CaCO_3$ – 5 г, агар-агар – 20 г. Соли и агар полностью растворяют перемешиванием и нагреванием на асбестовой сетке, приливают 1 мл раствора микроэлементов по Федорову, доводят до кипения. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,5 атм. в течение 30 мин.

Раствор микроэлементов по Федорову (г/л дист. воды): H_3BO_3 – 5 г, $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 5 г, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 г, KCl – 0,5 г, $NaBr$ – 0,5 г, $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ – 0,3 г.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. раздел 3, глава 3.3.), учитывают число выросших колоний на чашках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3 и 4).

2) Учет численности ассоциативных diaзотрофов, живущих в комплексе в другими микроорганизмами в корневой массе почвы, проводят чашечным методом посева на агар Федорова-Калининской (АФК) из одного разведения почвенной суспензии от на выбор (10^{-4} до 10^{-6}) в зависимости от содержания органического вещества в почве и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем ее большее разведение необходимо взять для посева). Инкубацию чашек проводят в термостате при $+28^\circ C$, учет выросших колоний проводят на десятый-пятнадцатый день после посева.

Приготовление агара Федорова-Калининской производят путем последовательного растворения в 1 л дистиллированной воды следующих реактивов: глюкоза – 10 г, K_2HPO_4 – 1,74 г, KH_2PO_4 – 0,91 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3 г, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,1 г, $NaCl$ – 0,5 г, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 0,01 г агар-агар – 20 г. Соли и агар полностью растворяют перемешиванием и нагреванием на асбестовой сетке, приливают 1 мл раствора микроэлементов по Федорову и 0,02 мл дрожжевого автолизата, доводят до кипения. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,5 атм. в течение 30 мин.

Дрожжевой автолизат: 10 г сухих дрожжей растворяют в небольшой конической колбе со 100 мл дистиллированной воды, добавляют 2-3 кристаллика тимола, прикрывают корковой пробкой и ставят в термостат на $3^{сут.}$ инкубацию при $+50^\circ C$. По мере разжижения дрожжей смесь 1-2 раза в сутки встряхивают. Готовый автолизат должен иметь коричневый оттенок и прият-

ный кондитерский сладковатый запах. Затем содержимое колбы тщательно перемешивают, доводят до кипения на асбестовой сетке, кипятят 20 мин. на слабом огне, фильтруют через бумажный фильтр и автоклавируют при 1,5 атм. в течение 15 мин. Готовый автолизат хранят в холодильнике.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3), учитывают число выросших колоний на чашках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3 и 4).

3) Учет численности симбиотических diaзотрофов, живущих в симбиозе с корнями высших бобовых и небобовых растений, проводят чашечным методом посева суспензии, получаемой из клубеньков азотфиксаторов, на бобовый агар (БА).

Метод отбора клубеньков бобовых растений

В период бутонизации-цветения бобовой культуры осторожно с помощью пинцета или скальпеля отбирают крупные клубеньки с отмытых корней каждого исследуемого растения. Клубеньки промывают 5 раз в дистиллированной воде и 2 раза в 70% этаноле, затем подсушивают на фильтровальной бумаге и с каждого растения отвешивают навески клубеньков по 1 г с точностью до 0,01 г.

После чего в стерильную чашку Петри или на большое часовое стекло выкладывается навеска клубеньков и стерильным ножом или скальпелем разрезается на мелкие кусочки, затем разминается стерильной стеклянной палочкой до однородной массы. Затем вся клубеньковая масса количественно переносится в пробирку с 9 мл стерильной дистиллированной воды, перемешивается и дополнительно размешивается в ней стерильной стеклянной палочкой. Полученное первичное разведение массы клубеньков (10^{-1}) разводят далее до 10^{-8} – 10^{-10} степени. Затем из одного на выбор клубенькового разведения автоматической кнопочной пипеткой высевается аликвота в 0,05 мл на поверхность подготовленного БА. Инкубацию чашек проводят в термостате при $+25^{\circ}\text{C}$, учет выросших колоний проводят на пятый-десятый день после посева.

Приготовление бобового агара производят путем последовательного растворения в 1 л сваренного бобового бульона следующих реактивов: сахара – 2 г, KH_2PO_4 – 1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г, агар-агар – 15 г. Соли и агар полностью растворяют перемешиванием и нагреванием на асбестовой сетке,

доводят до кипения. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 1,5 атм. в течение 20-30 мин.

Бобовый бульон: 50 г бобов белой фасоли или гороха заливают 1 л водопроводной воды и варят на асбестовой сетке до набухания бобов и растрескивания кожуры, но не до полного разваривания бобов. Горячий отвар фильтруют через несколько слоев марли и доводят до 1 л водой.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3), учитывают число выросших колоний на чашках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 3 и 4).

5.6.2. Денитрификация

Как отмечалось выше микробиологическое восстановление минерального азота почвы до N_2 за счет деятельности денитрифицирующих микроорганизмов возможно при ухудшении водно-воздушного режима пахотных почв, а также при очень высокой кислотности почвы или в результате внесения чрезмерных доз нитратного азота в виде минеральных удобрений.

Существенные потери элемента питания культурных растений наносят серьезный ущерб как сельхозтоваропроизводителю, так и экосистеме в целом, поскольку активизация данного явления на пашне свидетельствует об ухудшении микробного равновесия в сапротрофной функции.

Метод определения относительной численности денитрификаторов

Общую численность денитрифицирующей микробиоты учитывают методом предельных разведений с посевом на среду Гильтая.

Посев в пробирки на среду (по 10 мл на пробирку) производят из нескольких разведений почвенной суспензии (от 10^{-2} до 10^{-8}), в зависимости от удобренности почвы, содержания в ней органического вещества и ее общей окультуренности (чем выше окультуренность почвы, тем более широкий интервал ее разведения необходимо взять для посева). В качестве микробиологического отклика денитрификаторов ожидают и фиксируют помутнение столбика среды, появление белых пленок и пузырьков выделяющегося молекулярного азота и его закисей N_2 , N_2O , NO . Инкубацию проводят в термостате при $+30^\circ C$, учет проводят на пятый-десятый день после посева.

Приготовление среды Гильтая производят следующим образом:

1) Раствор А – в 250 мл дистиллированной воды поочередно растворяют 1 г аспарагина и 2 г KNO_3 .

2) Раствор Б – в 500 мл дистиллированной воды поочередно растворяют 5 г цитрата натрия, 2 г KH_2PO_4 , 2 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 г $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,01 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$.

Соли полностью растворяют перемешиванием, затем оба раствора сливают в одну мерную колбу и доводят объем до 1 л дистиллированной водой. Затем среду разливают по колбам, закрывают ватными пробками и автоклавируют при давлении 2,0 атм. в течение 25 мин.

После подготовки питательных сред производят посев почвенной суспензии в соответствии с методикой посева (см. главу 3, п. 3.3.), учитывают микробиологический отклик в пробирках и пересчитывают в численность КОЕ (формулы 4 и 5).

5.7. Оценка степени обогащенности почвы микроорганизмами и расчет эколого-трофических индексов микробного пула

Определение численности и биологической активности различных групп микроорганизмов, участвующих в трансформации органического вещества почвы, является важным этапом в комплексной оценке как небольшой территории земель, будь то земли растениеводческого или животноводческого хозяйства, так и почв целых биогеоценозов, в том числе затронутых негативной деятельностью человека.

На этапе построения программы исследований по проведению оценки состояния плодородия почвы относительно ее микробиологических свойств прежде всего определяются с выбором параметров численности и биологической активности той или иной группы микробиоценоза почвы (табл. 23), изыскание которых позволит исследователю выявить наиболее полную микробиологическую характеристику почвы и состояние ее органического вещества. Последний аспект имеет большое значение в принятии грамотного решения в вопросе урегулирования плодородия почв агро- и естественных экосистем.

Таблица 23

**Краткая информация к описательной характеристике
микробионаселения почвы**

Экологическая группа микробиоценоза почвы и контролируемый ею процесс превращения органического вещества	Питательная среда для учета численности	Биохимическая активность, единицы измерения	
<i>зимогенная экологическая ниша</i>			
аммонифицирующая микробиота: разложение азотсодержащего органического вещества почвы	мясопептонный агар МПА пептонная вода ПВ	протеазная активность, мг глицина / 1 г почвы / 24 ч.	
амилолитическая микробиота: разложение безазотистого органического вещества почвы из группы олигосахаридов и крахмала	крахмало-аммиачный агар КАА	инвертазная активность, мг глюкозы / 1 г почвы / 24 ч.	
целлюлолитическая микробиота: разложение безазотистого органического вещества почвы из группы полисахаридов и целлюлозы	агар (среда) Гетчинсона-Клейтона АГК (СГК)	целлюлазная активность, мкг глюкозы / 10 г почвы / 48 ч.	
<i>олиготрофная экологическая ниша</i>			
олиготрофная микробиота: общая деструкция органического вещества почвы промежуточной степени разложения и его подготовка к процессу гумификации	почвенный агар ПА	—	
олигонитрофильная микробиота: деструкция азотистых компонентов гуминовых и фульвокислот гумуса и проведение в почве несимбиотической азотфиксации	агар Эшби АЭ	—	
олигокарбофильная микробиота: глубокая минерализация органического вещества почвы и начало его гумификации	голодный агар ГА	—	
<i>автохтонная экологическая ниша</i>			
автохтонная микробиота: разложение, трансформация и продуцирование гумусовых веществ почвы	нитритный агар НА	полифенолоксидазная и пероксидазная активность, мг 0,01 Н р-ра I ₂ / 1 г почвы / 2 мин.	
<i>миксотрофно-синтетическая экологическая ниша</i>			
грибы:	трансформация всевозможных компонентов органического вещества почвы и продуцирование пигментов гуминоподобного типа	агар Чапека-Докса АЧД	—
актиномицеты:		агар Гаузе-№ 1 АГ-1	—

Полученные значения численности микроорганизмов той или иной группы микробного сообщества почвы, определенные методом посева или методом предельных разведений, оцениваются в соответствии со шкалой ориентировочной обогащенности, приведенной в таблице 24, в соответствии с которой выделяется пять степеней насыщенности почвы микроорганизмами, участвующими в переработке различного органического вещества почвы.

Таблица 24

Шкала оценки степени обогащенности почвы микроорганизмами

Степень обогащенности почвы микробиотой		Количество микроорганизмов почвы, определенных культивированием на различных питательных средах, млн. КОЕ / 1 г абсолютно-сухой почвы		
		МПА, ПВ	КАА, АГК, СГК, АЭ, АЧД, АГ-1	ПА, ГА, НА
I	очень бедная	< 1	< 2	< 5
II	бедная	1 – 2	2 – 4	5 – 6
III	средняя обогащенность	3 – 5	5 – 10	7 – 12
IV	богатая	6 – 10	11 – 20	13 – 30
V	очень богатая	> 11	> 21	> 30

В таблице 25 приведена шкала сравнительной оценки биохимической активности почвы, основанной, в том числе и на деятельности микроорганизмов-органотрофов, которые продуцируют ферменты для процесса трансформации почвенного органического вещества.

Таблица 25

Шкала сравнительной оценки биохимической активности почвы

Показатель	Степень активности				
	I	II	III	IV	V
	очень слабая	слабая	средняя	высокая	очень высокая
Протеазная активность, мг глицина / 1 г / 24 ч.	<1,0	1,0-3,0	3,1-5,0	5,1-8,0	>8,0
Инвертазная активность, мг глюкозы / 1 г / 24 ч.	<5,0	5,0-15,0	15,1-50,0	50,1-150,0	>150,0
Целлюлазная активность, мкг глюкозы / 10 г / 48 ч.	<10,0	10,0-20,0	20,1-50,0	50,1-100,0	>100,0
Полифенолоксидазная активность, мг 0,01 Н р-ра I ₂ / 1 г почвы / 2 мин.	<10,0	10,0-20,0	20,1-30,0	30,1-40,0	>40,0
Пероксидазная активность, мг 0,01 Н р-ра I ₂ / 1 г почвы / 2 мин.	<5,0	5,0-10,0	10,1-20,0	20,1-30,0	>30,0

Сравнение полученных значений ферментативной активности почвы с данной шкалой и сопоставление их с численностью микробиоты, перерабатывающей органическую часть почвы, позволяет комплексно оценить темпы и общую напряженность микробиологической деятельности почвенно-биотического комплекса.

В экологических исследованиях почвенной микробиоты, помимо определения общей численности различных групп микробиоценоза и учета биохимической активности почвы, также производят расчет эколого-физиологических индексов и коэффициентов, которые позволяют проследить за особенностями взаимоотношений отдельных групп микроорганизмов, участвующих в общем процессе разложения органического вещества почвы.

Коэффициент минерализации и иммобилизации Мишустина

При определении численности КОЕ аммонификаторов (на МПА) и иммобилизаторов азота (на КАА) дополнительно рассчитывают коэффициент минерализации и иммобилизации Мишустина. Он определяется отношением численности микроорганизмов, учтенных посевом на крахмало-аммиачном агаре (КАА) и характеризующих процесс преобразования аммиачного азота, к численности микроорганизмов, учтенных посевом на мясопептонном агаре (МПА), характеризующих превращение белковых веществ почвы.

Данный коэффициент показывает степень развития амилолитической части почвенного микробиоценоза и, соответственно, ее активность в трансформации углеводов почвы и связывании свободного азота. Чем он выше (> 1), тем иммобилизационные процессы протекают интенсивнее, что говорит либо об очень большой обеспеченности почвы аммиачным азотом (это может являться следствием сильного развития аммонификаторов), либо о появлении в почве бедного азотом органического вещества (солома, кора и т.п.). Последнее явление, в свою очередь, может активизировать развитие олиготрофной и автохтонной групп микробиоценоза, что в итоге влечет за собой повышение численности амилолитиков, так как в результате работы олиготрофов в почвенный раствор высвобождается какое-то количество аммиака. В условиях агроценоза слишком большое значение коэффициента Мишустина ($> 3-5$) может косвенно свидетельствовать о по-

вышении скорости разложения специфического органического вещества почвы – гумуса.

Индекс педотрофности Никитина

Индекс педотрофности по Никитину – отношение числа микроорганизмов, растущих на почвенном агаре (ПА), к числу микроорганизмов, растущих на богатых органических средах (например, на МПА). Показывает степень развития микроорганизмов, как относящихся к коренному микронаселению почвы (автохтонная часть), так и участвующих в новообразовании гумусовых соединений. Повышение индекса педотрофности также показывает степень сродства неспецифической органической части почвы к исконному почвенному веществу – гумусу. Считается, что чем выше данный индекс, тем более биогеоценоз приближен к естественным ценозам изучаемой почвенно-климатической зоны и обладает большей устойчивостью к негативным воздействиям со стороны различных антропогенных вмешательств.

Индекс олиготрофности Аристовской

Индекс олиготрофности по Аристовской – отношение численности микроорганизмов, учтенных на разбавленных средах (НА и ГА), к численности на полноценных средах (МПА и КАА). Показывает активность олиготрофной части микробиоценоза почвы. Повышение данного индекса в целом может свидетельствовать о замедлении процессов деструкции органического вещества и о переходе изучаемого биоценоза в более устойчивое состояние, стремящееся к состоянию *климаксовой системы*.

Коэффициент биохимического накопления гумуса по Муромцеву

Биохимический коэффициент накопления гумуса по Муромцеву – численное отношение полифенолоксидазной активности почвы к пероксидазной активности. Данный коэффициент показывает темпы биохимического образования и накопления гумуса в почве. Считается, что с повышением коэффициента Муромцева усиливается интенсивность переработки органического вещества и повышается синтез гуминовых и фульвокислот почвы.

Одним из наиболее распространенных методов оценки стабильности почвообитающей микробиоты и определения пределов устойчивости ее

биохимической активности является концепция двухфазного анализа эколого-физиологических ниш микробиоценоза, отражающего потенциалы ремиссионной сохраняемости и общей биологической активности микробного пула почвы. Данный анализ включает определение численности приоритетных для исследования микроорганизмов из инактивированных и мобилизованных почвенных образцов. Метод предложен В.Д. Мухой и Л.И. Васильевой.

Инактивированными образцами почвы считаются высушенные образцы до воздушно-сухого состояния. *Мобилизованными* образцами почвы считаются высушенные до воздушно-сухого состояния образцы, которые увлажнили до 60% от ПВ и выдержали в термостате в течение 12 суток при +28 °С. Также в качестве мобилизованных образцов почвы допускается использовать свежие влажные образцы, отобранные непосредственно перед проведением анализа.

Далее, на основе численности микробиоты в почве двухфазный анализ предполагает расчет показателей, отражающих собственно уровень экологической стабильности почвенного микробного пула. Сюда входит степень микробиологической устойчивости почвы относительно инактивированной и мобилизованной микробиоты (DMS_N и DMS_C), которая показывает уровень стабильности функционирования азот- и углеродредуцирующей микробных ниш; показатели общего микробного преобразования (интенсивности трансформации) органического вещества почвы из инактивированной и мобилизованной почвы (IMT_{IS} и IMT_{MS}) и частной микробиологической трансформации N- и C-содержащих компонентов в почве (IMT_N и IMT_C), отражающие направление и интенсивность трансформации органической матрицы, а также соединений азота и углерода в почве; показатель микробиологической насыщенности (окультуренности) почвы (DMS_N и DMS_C), характеризующий степень микробного насыщения (наполнения) почвенного вещества, то есть показывающий характер микробиотической наполненности почвы, которая свойственна для типичного (или окультуренного) педогенеза конкретной почвенной разности (напр., типа).

Степень микробиологической устойчивости почвы (DMS_N), выражаемая в %, рассчитывается отношением численности микроорганизмов,

определенных на МПА из инактивированного образца к численности микроорганизмов, определенных на МПА из мобилизованного образца, результат которого умножен на 100. Данным образом определяется DMS_N по микробиоте, участвующей в трансформации органических форм азота почвы. Аналогичным образом рассчитывается DMS_N по микробиоте, участвующей в трансформации минеральных соединений азота, при этом в расчет берется численность микроорганизмов, соответственно определенных на КАА из инактивированных и мобилизованных образцов, отношение которой также умножено на 100.

Степень микробиологической трансформации N-содержащих веществ в почве (IMT_N), выражаемая в усл. ед., определяется отношением показателя DMS_N , определенного по численности с МПА, к показателю DMS_N , определенному по численности с КАА. Данный показатель может быть рассчитан в отношении инактивированной (IMT_{IS-N}) и мобилизованной (IMT_{MS-N}) почвы.

Степень микробиологической устойчивости почвы (DMS_C), выражаемая в %, рассчитывается отношением численности микроорганизмов, определенных на АГК из инактивированного образца к численности микроорганизмов, определенных на АГК из мобилизованного образца, результат которого умножен на 100. Данным образом определяется DMS_C по микробиоте, участвующей в трансформации органических негумусовых форм углерода почвы. Аналогичным образом рассчитывается DMS_C по микробиоте, участвующей в трансформации гумусовых форм углерода, при этом в расчет берется численность микроорганизмов, соответственно определенных на ГА из инактивированных и мобилизованных образцов, отношение которой также умножено на 100.

Степень микробиологической трансформации C-содержащих веществ в почве (IMT_C), выражаемая в усл. ед., определяется отношением показателя DMS_C , определенного по численности с АГК, к показателю DMS_C , определенному по численности с ГА. Данный показатель может быть рассчитан в отношении инактивированной (IMT_{IS-C}) и мобилизованной (IMT_{MS-C}) почвы.

Степень микробиологической насыщенности (окультуренности) почвы (DMS_N), выражаемая в усл. ед., определяется произведением суммы численности микроорганизмов, определенных на МПА и КАА, и отношения численности микроорганизмов, определенных на МПА, к численности микроорганизмов, определенных на КАА. Данный показатель может быть рассчитан в отношении инактивированной (DMS_{IS-N}) и мобилизированной (DMS_{MS-N}) почвы.

Степень микробиологической насыщенности (окультуренности) почвы (DMS_C), выражаемая в усл. ед., определяется произведением суммы численности микроорганизмов, определенных на АГК и ГА, и отношения численности микроорганизмов, определенных на АГК, к численности микроорганизмов, определенных на ГА. Данный показатель может быть рассчитан в отношении инактивированной (DMS_{IS-C}) и мобилизированной (DMS_{MS-C}) почвы.

Определение численности отдельных групп микробиоценоза почвы, участвующих в различных стадиях переработки органического вещества (принципиальная схема деятельности почвенных гетеротрофов на рис. 10), и определение биологической активности почвы, так или иначе связанной с учитываемыми группами микроорганизмов, являются значимым этапом микробиологической характеристики агробиоценоза, поскольку позволяет судить о направленности преобразования вещества в почве, степени гумусированности растительных и иных остатков и в целом об этапе развития почвы исследуемой почвенно-климатической территории.

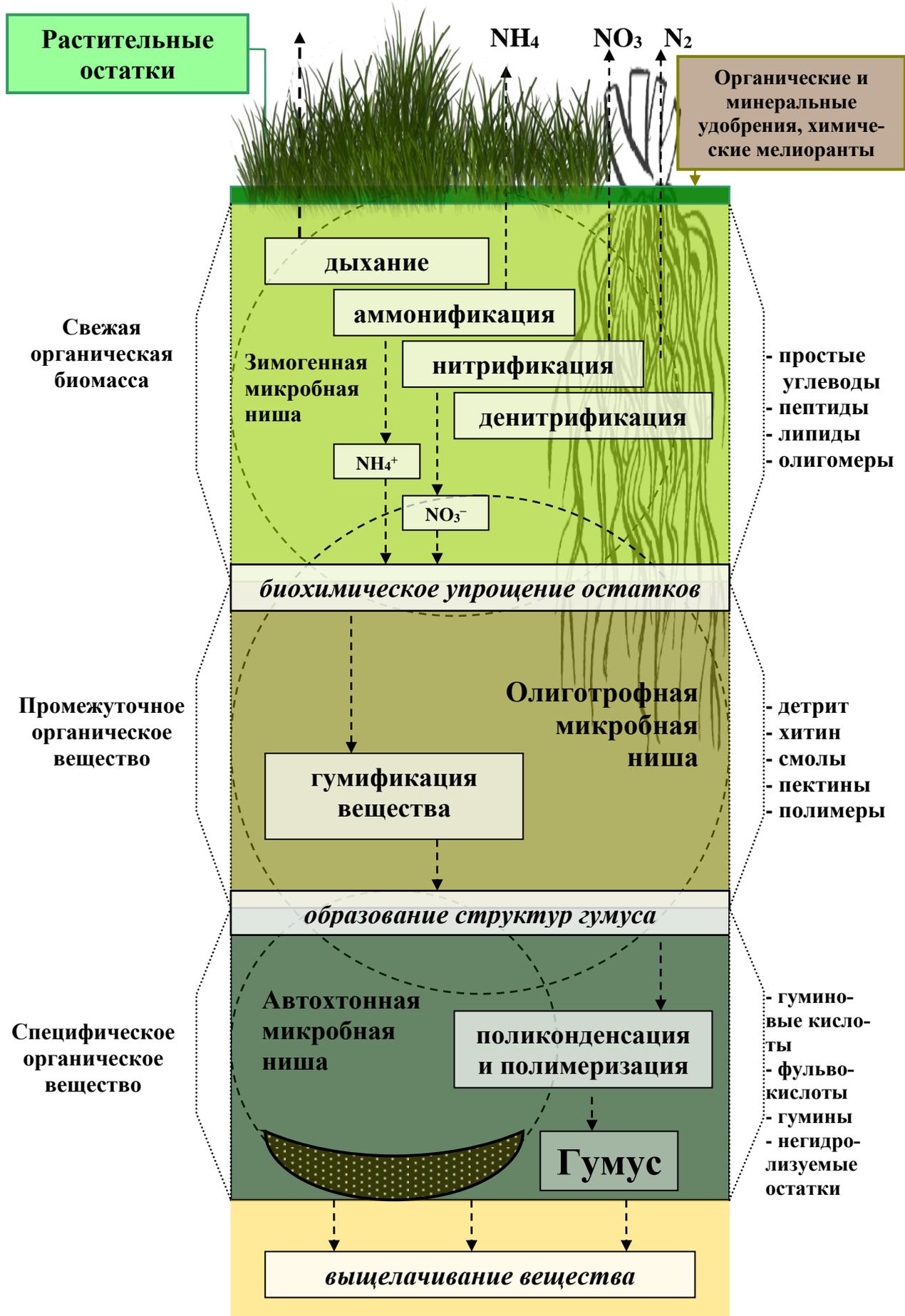


Рис. 10. Типовая схема функционирования сапротрофного микробиоценоза в почвах

Глава 6. Санитарная функция почвы и антропогенное загрязнение

В последние десятилетия антропогенное вмешательство в естественный ход биологических циклов преобразования почвенного, водного и воздушного веществ планеты значительно возросло. Естественно, что даже имея определенный буфер против негативного влияния человеческой деятельности, природе уже не по силам полностью справиться с таковой в рамках обозримого будущего.

Единственным средством достаточно быстрой трансформации отходов и всевозможных загрязнителей остается преобразующая деятельность педосферы, суть которой заключается в инактивации и деструкции поступающих в почву органических и неорганических веществ токсического действия. Данные функции осуществляются комплексом почвенной микробиоты в совокупности с мезофауной.

Разложение инородных веществ, уничтожение патогенной микробиоты органических удобрений и вывозимых на поля микробиосодержащих продуктов, деградация остаточных количеств пестицидов и коммунально-бытовых сбросов, а также пластмасс, нефти и нефтепродуктов, синтетических волокон, сорбируемых почвой пылегазовыбросов и других веществ: все это протекает в почвенной толще под прямым или косвенным воздействием микроскопической жизни.

При этом опасность загрязнения почвы определяется уровнем потенциального отрицательного влияния этого загрязнения, в том числе на биологическую активность самой почвы и на процессы ее самоочищения.

Антисептическое свойство является одним из главных среди санитарных функций почвы. При бактериологическом загрязнении (внесение сверхвысоких доз органических удобрений и подобных веществ) состав микробиоценоза сильно изменяется. Для оценки такого изменения существует система определения относительного количества микроорганизмов-индикаторов санитарно-бактериологического загрязнения.

Для мониторинга и диагностики почв, загрязненных тяжелыми металлами, в первую очередь определяют ее биохимические показатели, в частности активность ферментов *протеазы*, *каталазы* и *инвертазы*, для диагностики нефтяного загрязнения почвы лучше использовать показатели активности окислительно-восстановительных ферментов (*каталазы*, *поли-*

фенолоксидазы, пероксидазы и т.д.), для диагностики процессов перенасыщения почв – показатели активности оксидоредуктаз (*пероксидазы*) и *дыхание почвы*. Для диагностики степени самовосстановления пахотных почв, подвергшихся таким резким техногенным воздействиям, как снятие и восстановление плодородного горизонта, чрезмерное уплотнение пашни тяжелой техникой, а также попытки воссоздания гумусово-аккумулятивного слоя почвы искусственными или полуискусственными материалами, помимо комплекса физико-химических и агрохимических показателей используют набор биохимических параметров учета преобразования гумусовых веществ почвы (активность ферментов *полифенолоксидазы* и *пероксидазы*, *численность на ГА и ПА*) и другие.

Наиболее репрезентативным показателем устойчивости почвы к техногенным воздействиям является определение потенциальной активности ее микробного сообщества. В частности, это *величина микробной биомассы* и интегральный *показатель дыхания почвы*. На основе данных характеристик подсчитывается *микробный метаболический коэффициент (ММК) по Н.Д. Ананьевой*, который равен *отношению интенсивности дыхания почвы к биомассе микроорганизмов*.

Теоретически высокое значение ММК имеют почвы развивающихся молодых или антропогенно нарушенных экосистем, низкое – почвы климаксных экосистем, характеризующихся повышенной устойчивостью к разнообразным воздействиям.

Наряду с инструментальными методами оценки загрязнения природной среды и оценки влияния этого загрязнения на микробное сообщество почвы используют методы *биотестирования*.

Биотестирование – это методический прием, позволяющий в лабораторных условиях выявить токсичность почвы, снега, сточной воды и прочих сред по реакции на изучаемую среду живых организмов – биотестов. В качестве биотестов используются животные, растения и микроорганизмы.

Методы биотестирования позволяют существенно дополнить оценку складывающейся обстановки в экосистеме, проводимой с помощью общепринятых аналитических методов. Как известно, почва аккумулирует загрязнители, поступающие с пылевидными выпадениями, дождевыми стоками и т.д.

Многие загрязнители, вступая между собой в сложные химические и физико-химические взаимоотношения и подвергаясь фотохимическому

воздействию солнца, могут значительно изменять свою токсичность, как в сторону активизации, так и в сторону инактивации. В итоге этих преобразований может быть изменение общей токсичности среды обитания.

В таких условиях определение состава загрязнителей при помощи стандартных физико-химических методов очень сложно, так как требует больших временных затрат и дорогостоящего оборудования. Но, даже определив общий состав загрязняющих веществ, исследователь часто не в состоянии ответить на вопрос, каково их суммарное действие на биологические системы. Поэтому интегральную оценку влияния поллютантов, действующих в совокупности, можно дать только при использовании тест-организмов.

Используя индикаторный организм, можно получить воздействие на него сразу всего комплекса факторов, как положительных, так и отрицательных, и по изменению его состояния дать общую оценку токсичности среды.

При оценке токсичности почвы в качестве биотестов, как правило, используются растения. Известно, что устойчивость растения к неблагоприятным факторам среды зависит от его возраста, а точнее от фазы индивидуального развития. Этап прорастания семян – наиболее уязвимая фаза онтогенеза высших растений, когда наблюдается минимальная устойчивость к неблагоприятным факторам и, соответственно, максимальная чувствительность к их воздействию. В связи с этим растения в фазу проростков представляют собой наиболее актуальный объект тестирования, и различные параметры прорастания служат показателями при проведении экологических экспериментов.

Основными критериями прорастающих семян растений, изучаемых в биотестировании, являются всхожесть и энергия прорастания.

Всхожесть – количество семян, нормально проросших за определенный период времени при определенных оптимальных условиях прорастания (за исключением условия изучаемого фактора), по отношению к общему количеству взятых на проращивание семян; выражается в %.

Энергия прорастания – количество семян, нормально проросших за срок, более короткий, чем установлен для определения всхожести, по отношению к общему количеству взятых на проращивание семян; выражается в %.

6.1. Определение токсичности почв методом почвенных пластин

6.1.1. Определение общего токсикоза почвы

Токсичность почвы является результатом нарушения экологического равновесия в системе «почва-растение». Результатом этого нарушения является перегруппировка микроорганизмов почвы в направлении повышения активности развития патогенной для растительных и животных организмов микробиоты.

Принцип метода

Метод заключается в определении всхожести и энергии прорастания семян тест-культуры, помещенных в чашки Петри на поверхность почвенных пластин.

При проращивании семян необходимо соблюдать следующие условия:

- поддерживать в термостате требуемую температуру;
- ежедневно в чашки Петри пипеткой добавлять по 2 мл дист. воды;
- ежедневно, на несколько секунд, приоткрывать чашки Петри для проветривания и предупреждения плесневения семян.

Опыт проводится в нескольких повторениях с последующей статистической обработкой результатов. Полученные данные сравниваются с результатами, полученными при определении всхожести и энергии прорастания семян в чашке Петри с незагрязненной (контрольной) почвой.

Ход работы

Испытуемую почву с помощью пинцета освобождают от крупных корневых остатков и тщательно перемешивают шпателем. Навеску 60 г помещают в чашку Петри, увлажняют до состояния густой пасты и равномерно размазывают по дну чашки.

На поверхность полученной почвенной пластины раскладывают 50 семян тест-культуры, предварительно замоченной в течение суток. Одновременно в другую чашку Петри на незагрязненную почву помещают такое же количество замоченных семян для контроля.

Семена проращивают в термостате при +27°C в течение 3-4^х дней для определения энергии прорастания и в течение 5-7 дней для определе-

ния всхожести. После определенного периода инкубации подсчитывается число проросших зерен тест-культуры.

ФОРМА ЗАПИСИ

№ п/п	Показатель	Общее количество семян	Количество проросших семян	% проросших семян
1	всхожесть энергия прорастания			
2	всхожесть энергия прорастания			
3	всхожесть энергия прорастания			
в среднем	всхожесть энергия прорастания			

Результаты учета энергии прорастания и всхожести на опытном и контрольном образцах почвы служат для определения токсического действия на фитоценоз.

6.1.2. Определение микробного токсикоза почвы

Одна из главных причин «почвоутомления», или почвенного токсикоза, является возможность накопления в почве разнообразных метаболитов почвенных микроорганизмов. Фитотоксичные формы имеются у всех основных форм почвенной микробиоты. Но наибольшее их количество обнаружено среди микроскопических грибов (р. *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*) и бактерий р. *Pseudomonas* и *Bacillus*. Фитотоксичные микроорганизмы встречаются во всех почвах. Источниками поступления в почву токсических веществ помимо микробных токсинов могут являться продукты разложения послеуборочных остатков сельскохозяйственных культур, а также прижизненные выделения наземных и подземных органов растений.

Химическая природа фитотоксинов, обуславливающих токсичность почв, весьма разнообразна. Это производные фенолов, хинонов, полипептидов и другие соединения. Разнообразны и физиологические свойства фитотоксинов. Они могут быть канцерогенными для животных, действовать

как антагонисты по отношению к гиббереллинам и ауксинам, подавлять действие некоторых ферментов почвы, воздействовать на РНК и ДНК.

Принцип метода

Микробный токсикоз определяют методом почвенных пластин с инициированным амилолитическим микробным сообществом, которое получают после обогащения образца почвы крахмалом или глюкозой. Разница в результатах, полученных этими методами, свидетельствует о наличии микробного токсикоза в почве.

Ход работы

На поверхность подготовленной почвенной пластины в чашке Петри наносят тонкий слой крахмала полоской в 1 см по диаметру чашки. Для этого на почвенную пластину осторожно накладывают два чистых листа бумаги так, чтобы расстояние между ними было 1 см; чашку с почвой переворачивают и по диаметру чашки прикладывают на 1 сек. к крахмалу. Лишнее количество крахмала сдувают сжатым воздухом так, чтобы осталась тонкая полоска не более 2-3^х слоев крахмальных зерен.

Чашки Петри с инициированной почвой закрывают и помещают на 2 недели в термостат на инкубацию при +25°C. Периодически во время инкубации почву в чашках увлажняют дистиллированной водой.

По окончании срока инкубации на поверхность почвы раскладываются 50 замоченных семян тест-культуры. Через 3-5 суток определяют энергию прорастания и всхожесть семян, затем сравнивают их с результатами, полученными в опыте по определению общего токсикоза почвы методом почвенных пластин без активации микробного сообщества.

ФОРМА ЗАПИСИ

№ п/п	Показатель	Общее количество семян	Количество проросших семян	% проросших семян
1	всхожесть энергия прорастания			
2	всхожесть энергия прорастания			
3	всхожесть энергия прорастания			
в среднем	всхожесть энергия прорастания			

6.2. Определение токсичности почв методом водной вытяжки

Принцип метода

Метод основан на изучении характеристик прорастания семян (всхожести и энергии прорастания), помещенных в чашки Петри с фильтровальной бумагой, увлажненной водной вытяжкой из изучаемой почвы. После установленного периода инкубации в оптимальных для прорастания условиях температуры и влажности производится учет количества проросших семян и рассчитывается их процент от общего количества, помещенного на проращивание в чашки Петри.

Ход работы

Для проведения опыта производится отбор проб почвы в местах предполагаемого загрязнения. Контрольные образцы необходимо отбирать в лесу или в лесопарковой зоне на существенном расстоянии от источников загрязнения. Высушенную пробу почвы растирают в ступке и просеивают через сито с диаметром ячеек в 0,5 мм.

Водные вытяжки из проб почвы готовят по следующей методике. Навеску почвы в 20 г помещают в коническую колбу емкостью 100-150 мл и приливают 50 мл дистиллированной воды. Содержимое колбы взбалтывают и оставляют на 24 часа. После отстаивания суспензию отфильтровывают.

Нарезают фильтровальную бумагу соответственно размеру чашки Петри, увлажняют ее в полученном фильтрате почвы и укладывают в стерильную чашку Петри в 2-3 слоя.

В крышку чашки укладывают смоченный в почвенном фильтрате кружок фильтровальной бумаги так, чтобы диаметр круга заходил на 2 см на боковые стороны крышки чашки Петри.

Опыт проводят в 3-кратной повторности. В 3 чашки Петри отсчитывают по 50-100 семян культурных растений. Семена равномерно раскладывают в чашках на расстоянии 0,5-1,5 мм друг от друга и закрывают крышками с вложенной в них смоченной бумагой. Чашки с семенами помещают в термостат на инкубацию при +25°...+27°С.

Через 3-4 суток определяют энергию прорастания семян, а через 7-8 суток – их всхожесть. К числу всхожих семян у пшеницы и ржи относят

семена, имеющие нормально развитые корешки, размером не менее длины семени, и росток, составляющий не менее половины длины семени; у ячменя и овса должны быть нормально развитые корешки или один главный корешок длиной не менее длины семени.

По всем остальным культурам к всхожим семенам относят семена, имеющие нормально развитый корешок размером не менее длины семени, а у семян круглой формы – не менее диаметра семени.

ФОРМА ЗАПИСИ

№ п/п	Показатель	Общее количество семян	Количество проросших семян	% проросших семян
1	всхожесть энергия прорастания			
2	всхожесть энергия прорастания			
3	всхожесть энергия прорастания			
в среднем	всхожесть энергия прорастания			

6.3. Оценка степени фитотоксичности почвы

Фитотоксичность почвы определяется путем сравнения показателей прорастания семян под действием вытяжки из изучаемой почвы с данными, полученными с незагрязненной почвой.

В качестве критерия фитотоксичности почвы используется кратность снижения контролируемых показателей в опытной почве по сравнению с незагрязненной. При этом фитотоксичность ранжируется по 5-бальной системе, приведенной в таблице 26.

Таблица 26

Критерии оценки степени деградации почвы по ее фитотоксичности

Показатель	Степень деградации				
	0	1	2	3	4
Фитотоксичность почвы, кратность снижения всхожести семян и энергии их прорастания	<1,10	1,10-1,20	1,21-1,40	1,41-2,00	>2,00

Полученная оценка является дополнительным показателем, используемым при экологической характеристике почв и определении степени ее деградации, вызванной комплексом антропогенных факторов, влияющих на условия сохранения жизнеспособных функций почвенного покрова.

При картографировании (районировании) территории и выявлении зон экологической напряженности, связанной с рассмотренными ранее явлениями фитотоксичности почвы, пользуются параметрами таблицы 27.

Таблица 27

**Критерии выявления зон экологической напряженности
на местности по фитотоксичности почвы**

Снижение числа проростков	Площадь проявления показателя, %			
	<5	5-19	20-50	>50
менее чем в 1,1 раза	1	1	1	1
в 1,1-1,2 раза	2	2	2	2
в 1,2-1,4 раза	2	3	3	4
в 1,4-2,0 раза	3	3	4	5
более, чем в 2,0 раза	3	4	4	5

Условные обозначения:

- 1 – зона относительного благополучия;
- 2 – зона экологического риска;
- 3 – зона экологического кризиса;
- 4 – зона экологического бедствия;
- 5 – зона экологической катастрофы.

Заключение

Задача современной экологии совместно с почвенной микробиологией и энзимологией состоит в изучении особенностей взаимодействия почвы, факторов естественного почвообразования и антропогенной эволюции почвенного покрова с комплексом почвообитающих микроорганизмов и биологически активных ее веществ, в том числе ферментов.

Современная техногенная и агрогенная нагрузка на почвенный покров и сопредельные земельные участки в последнее время только возрастает в своих масштабах. В рамках данной проблематики актуальность микробиологических исследований почвенного покрова занимает особую позицию среди прочих почвенных научных исследований, поскольку именно микробиологическая составляющая почвы обладает наивысшей экологической чувствительностью, полифункциональными и индикаторными свойствами, инактивирующей активностью и восстанавливающей способностью во всех наземных экосистемах.

Большое значение в функционировании наземных биогеоценозов имеет часть микробного населения почвы, которая участвует в трансформации органического вещества. Данное функциональное ядро помимо выполнения роли поддержания круговорота вещества и энергии в педосфере упрощает сложную органическую составляющую почвы и привносимых веществ с опадом до относительно простых соединений. Задача современной почвенной микробиологии состоит в изучении особенностей формирования и трансформации органо-минерального вещества как одного из главных компонентов почвы. Микробиологическая переработка растительных остатков и минеральных структур во многом определяет пищевой режим в почве, поскольку формирует не только резерв доступных элементов питания, но и специфические компоненты гумуса.

В связи с этим изучение состояния почвенного микробиоценоза как «живого» потенциала органически активных веществ и минеральных биогенных элементов должно включать методы определения численности не только литотрофных, но и гетеротрофных микроорганизмов с комплексной им ферментативной активностью.

В заключение также следует, что более полное определение состояния микробиоценоза почвы как биохимического потенциала реакционно-активных веществ и биогенных элементов растений, буферной способности почвенного вещества, а также как защитного барьера от токсического действия антропогенных загрязнителей, невозможно без учета химических показателей в комплексе с микробиологическими и биологическими свойствами. Правильно выбирая совокупность исследуемых параметров микробного преобразования почвенного вещества, исследователь получает более информативную картину о состоянии благополучия почвенного покрова и экосистемы в целом.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ И ПОНЯТИЙ

Автотрофы – организмы, использующие в своем питании углекислоту воздуха в качестве главного или единственного источника углерода. В зависимости от источника энергии, используемого автотрофами для усвоения CO₂, различают фотоавтотрофы, которые используют энергию солнечного света (например, цианобактерии) и хемоавтотрофы, использующие энергию, полученную за счет окисления неорганических соединений. К хемоавтотрофам почвы относят большинство литотрофов, которые аккумулируют энергию при окислении минеральной части почвы (например, нитрифицирующие и сероредуцирующие бактерии, металлоокисляющие и т.п.).

Агар (агар-агар) – реактив, представляющий собой смесь полисахаридов сложного состава (агарозы и агаропектина). Агар получается из некоторых морских водорослей, (например, анфельции), при растворении в горячей воде образует гель и используется, главным образом, как отвердитель питательных сред.

Ассоциация микробного пула – сообщество популяций двух и более родов или видов микроорганизмов почвы, объединенных в микробиоценозе выполнением единой функции (например, ассоциация нитрифицирующих микроорганизмов почвы, состоящая из восьми основных родов бактерий-нитрификаторов).

Гетеротрофы – организмы, использующие в своем питании готовое органическое вещество, то есть органическую форму углерода. Подавляющее большинство микроорганизмов почвы является гетеротрофами.

Инкубация (инкубирование) – культивирование микроорганизмов на средах при определенной температуре в течение фиксированного времени.

Климатическая система – экологическая система в зрелом, устойчивом, равновесном состоянии (например, еловый лес в тайге, дубрава в зоне широколиственных лесов, микробиоценоз почвы под природным заливным лугом или в старом непроходимом лесу).

Консорция – функциональная единица микробиоценоза, состоящая из множества различных систематических единиц микроорганизмов и имеющая цель трансформации вещества почвы до того состояния, утилизация которого была бы возможной за счет следующей консорции микро-

организмов почвы. По сути, по мере разложения вещества почвы одна консорция микроорганизмов сменяется другой.

Космополит – вид, широко распространенный по земному шару, обитающий в почвах всех широтных зональностей. Нередко данный термин употребляется в смысле относительной всеядности всего почвенного микробиоценоза.

Культивирование – выращивание микроорганизмов на питательных средах при определенных условиях (температура, доступ воздуха, время и т.д.).

Культура микроорганизмов – развившиеся в результате культивирования на твердой или жидкой питательной среде микроорганизмы. Культура накопительная – вся выращенная на среде микробиомасса является потомством клеток преимущественно одного вида; культура чистая – потомством клеток только одного вида.

Культуральные признаки – морфологические признаки определенного микроорганизма, по которым его возможно идентифицировать до рода, а иногда до вида. Культуральными признаками микроорганизмов, растущих на твердых питательных средах, является внешний вид колоний, их размер и цвет, характер края, консистенция микробной массы и так далее. При выращивании методом укола с посевом на пробирку к таковым относятся цвет и характер роста микробной массы в толще столбика среды, а также степень ее разложения. При выращивании на жидких средах – цвет и внешний вид образующихся пленок, характер выделений (запах, пузырьки газа и т.д.).

Литотрофы – автотрофная часть микробного пула почвы, у которой синтез органического вещества из CO_2 воздуха обеспечивается энергией окисления или восстановления неорганических веществ (аммиака, нитрита, элементарной серы, сероводорода, молекулярного водорода, минералов почвы). Например, нитрификаторы, «силикатные» (силикатредуцирующие) бактерии и т.д.

Микробиологический пересев (пассирование) – перенесение *in vitro* уже выращенной культуры микроорганизма из одной среды на новую стерильную среду с целью продолжения роста и развития данной культуры микроорганизма.

Микробиологический посев – внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (образец почвы, проба воды, мяса и

т.п.) на (или в) стерильную питательную среду с целью получения чистой или накопительной культуры.

Микробиологический отклик – определенное изменение какого-либо параметра питательной среды или субстрата, которое говорит о явном присутствии искомого микроорганизма на (или в) среде и о выполнении им своей биохимической функции.

Микробный пул – наиболее полное количество микроорганизмов определенной почвы. Иначе говоря, под микробным пулом понимают все количество микроорганизмов почвы, но всегда имеют в виду, что данное определение несколько условно, поскольку определение численности всех микроорганизмов почвы на настоящий момент невозможно.

Микробный ценоз почвы, микробиоценоз – совокупность микроорганизмов, населяющая определенный участок почвы с более или менее однородными условиями и функционирующая как единое целое в трансформации органических и минеральных веществ данного биогеоценоза. Микробиоценоз является саморегулирующейся системой, но в то же время является подсистемой биогеоценоза или экосистемы.

Миксотрофы – микроорганизмы, способные питаться как готовым органическим веществом, так и синтезировать его в собственных клетках за счет поглощения веществ только неорганического происхождения.

Органотрофы – гетеротрофная часть микробного пула почвы, у которой синтез собственного органического вещества обеспечивается энергией окисления органических веществ других организмов. Например, микроорганизмы-аммонификаторы и целлюлолитики.

Паразиты – гетеротрофная часть микробного пула почвы, антагонистически использующая в своем питании живое органическое вещество. При этом, паразиты используют живой организм хозяина как среду обитания. Среди почвенных микроорганизмов паразитизм встречается в симбиотических организмах лишайников (гриб паразитирует на микроскопической водоросли), а также во многих бактериях, грибах и актиномицетах под паразитарным действием вирусов и фагов.

Питательная среда – определенный субстрат, на котором способны расти и развиваться микроорганизмы. Количество питательных сред, используемых в разных отраслях микробиологии и медицины, достигает 1500 видов.

Популяция микробного пула – совокупность особей микроорганизмов одного вида. В почвенной микробиологии термины микробной ассоциации и микробной популяции почвы нередко приравнивают и употребляют как синонимы.

Санитарное состояние почвы – совокупность физико-химических и биологических свойств почвы, определяющих качество и степень ее безопасности в эпидемическом и гигиеническом отношениях.

Сапротрофы – гетеротрофная часть микробного пула почвы, использующая в своем питании мертвое органическое вещество посредством постепенного выедания. Многие из почвенных микроорганизмов ведут сапротрофный образ жизни и, в зависимости от степени разложенности внесенных растительных и животных остатков в почву, делятся на группы зимогенных и олиготрофных микроорганизмов.

Сукцессия микробных сообществ – закономерная смена сообществ микроорганизмов в микробиоценозе почвы при его продвижении в развитии к устойчивому (климаксному, стационарному) состоянию.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК
(СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ И РЕКОМЕНДУЕМОЙ
УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЙ И НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ)

1. Агрономическая микробиология / Под ред. *Г.С. Муромцева*. – Л.: Колос, 1976. – 231 с.
2. Агроэкология / Под ред. *В.А. Черникова, А.И. Чекереса*. – М.: Колос, 2000. – 536 с.
3. *Алексеев В.А.* Геоэкология: экологическая геохимия. – Ростов н/Д: Феникс, 2017. – 685 с.
4. *Ананьева Н.Д.* Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. – М.: Наука, 2003. – 223 с.
5. *Аристовская Т.В.* Микробиология подзолистых почв. – Л.: Наука, 1965. – 188 с.
6. *Аристовская Т.В.* Микробиология процессов почвообразования. – Л.: Наука, 1980. – 187 с.
7. *Асеева И.В., Бабьева И.П., Звягинцев Д.Г., Мирчинк Т.Г., Худякова Ю.А.* Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1966. – 216 с.
8. *Базилевич Н.И., Гребенищikov О.С., Тишков А.А.* Географические закономерности структуры и функционирования экосистем. – М.: Наука, 1986. – 298 с.
9. Бациллы. Генетика и биотехнология / Под ред. *К. Харвуда*. – М.: Мир, 1992. – 530 с.
10. *Безбородов А.М., Квеситадзе Г.И.* Микробиологический синтез. – С-Пб.: Проспект Науки, 2011. – 144 с.
11. *Безуглова О.С., Орлов Д.С.* Биогеохимия. – Ростов н/Д: «Феникс», 2000. – 320 с.
12. Биогеохимия металлов: практическое руководство / Под ред. *Г.И. Каравайко, Дж. Росси, А. Агате, С. Груздева, З.А. Авакяна*. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. – 375 с.
13. Биогеохимические процессы в подзолистых почвах / Под ред. *В.В. Пономаревой*. – Л.: Наука, 1972. – 296 с.
14. *Биссвангер Х.* Практическая энзимология. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 328 с.
15. Большой практикум по микробиологии / Под ред. *Г.Л. Селибера*. – М.: Высшая школа, 1962. – 492 с.
16. *Гапонюк Э.И., Малахов С.Г.* Комплексная система показателей экологического мониторинга почв // Миграция загрязняющих веществ в почвах и сопредельных средах. – Л.: Гидрометеиздат, 1985. – С. 3-10.
17. *Гиляров М.С., Криволуцкий Д.А.* Жизнь в почве. – М.: «Молодая гвардия», 1985. – 192 с.
18. *Глазовская М.А.* Методологические основы эколого-геохимической устойчивости почв к техногенным воздействиям. – М.: Издательство МГУ, 1997. – 102 с.
19. *Грачева И.М., Иванова Л.А.* Биотехнология биологически активных веществ. – М.: Элевар, 2006. – 453 с.
20. *Гусев М.В., Минеева Л.А.* Микробиология. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 464 с.
21. Дegrаdация и охрана почв / Под ред. *Г.В. Добровольского*. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 2002. – 655 с.
22. *Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Лысак Л.В., Зенова Г.М.* Физикохимия и биология торфа. Методы оценки численности и разнообразия бактериальных и актиномицетных комплексов торфяных почв. – Томск: Изд-во Томского ГПУ, 2010. – 97 с.
23. *Добровольская Т.Г.* Структура бактериальных сообществ почв. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2002. – 282 с.
24. *Добровольский Г.В., Никитин Е.Д.* Экология почв. Учение об экологических функциях почв. – М.: Изд-во. Моск. ун-та, 2012. – 412 с.

25. *Ежов Г.И.* Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. – М.: Высшая школа, 1981. – 271 с.
26. *Емцев В.Т., Мишустин Е.Н.* Микробиология. – М.: Издательство «Юрайт», 2016. – 445 с.
27. *Заварзин Г.А.* Лекции по природоведческой микробиологии. – М.: Наука, 2014. – 348 с.
28. *Звягинцев Д.Г., Асеева И.В., Бабьева И.П., Мирчинк Т.Г.* Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980. – 224 с.
29. *Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М.* Биология почв. – М.: Изд-во МГУ, 2005. – 445 с.
30. *Зенова Г.М.* Почвенные актиномицеты редких родов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 2000. – 81 с.
31. *Зенова Г.М., Штина Э.А.* Почвенные водоросли. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 80 с.
32. *Зубкова Т.А., Карпачевский Л.О.* Матричная организация почв. – М.: РУСАКИ, 2001. – 296 с.
33. *Илялетдинов А.Н.* Микробиологические превращения металлов. – Алма-Ата: Наука, 1988. – 268 с.
34. *Каравайко Г.И.* Микробиологические процессы выщелачивания металлов из руд. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1984. – 88 с.
35. *Карпачевский Л.О.* Экологическое почвоведение. – М.: ГЕОС, 2005. – 336 с.
36. *Кислухина О.В., Калуняц К.А., Аленова Д.Ж.* Ферментативный лизис микроорганизмов. – Алма-Ата: Разан, 1990. – 200 с.
37. *Ковда В.А.* Биогеохимия почвенного покрова. – М.: Наука, 1985. – 264 с.
38. *Кожевин П.А.* Микробные популяции в природе. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 175 с.
39. *Коничев А.С., Севастьянова Г.А.* Биохимия и молекулярная биология. – М.: Дрофа, 2008. – 359 с.
40. *Коростелева Л.А., Коцаев А.Г.* Основы экологии микроорганизмов. – С-Пб.: Издательство «Лань», 2013. – 240 с.
41. *Корягин Ю.В., Корягина Н.В., Арефьев А.Н., Куликова Е.Г.* Биология почв. – М.: Издательство Юрайт, 2023. – 415 с.
42. *Красильников Н.А.* Лучистые грибки. Высшие формы. – М.: Изд-во «Наука», 1970. – 536 с.
43. *Купревич В.Ф., Щербакова Т.А.* Почвенная энзимология. – Минск: Наука и техника, 1966. – 274 с.
44. *Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н.* Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 120 с.
45. *Лях С.П., Рубан Е.А.* Микробные меланины. – М.: Наука, 1972. – 321 с.
46. *Манучарова Н.А.* Молекулярно-биологические методы в почвоведении и экологии. – М.: Университетская книга, 2014. – 68 с.
47. *Марфенина О.Е.* Микробиологические аспекты охраны почв. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. – 120 с.
48. *Матаруева И.А.* Микробиологические закономерности формирования гумусных запасов дерново-подзолистых почв. – Кострома: КГСХА, 2005. – 190 с.
49. Методы экспериментальной микологии. Справочник / Под ред. *В.И. Билай.* – Киев: Издательство «Наукова думка», 1982. – 552 с.
50. Микрофлора почв северной и средней части СССР / Под ред. *Е.Н. Мишустина.* – М.: Наука, 1966. – 391 с.
51. *Мирчинк Т.Г.* Почвенная микология. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 208 с.
52. *Мишустин Е.Н.* Ассоциации почвенных микроорганизмов. – М.: Наука, 1975. – 107 с.
53. *Мишустин Е.Н.* Микроорганизмы и продуктивность земледелия. – М. Наука, 1972. – 343 с.

54. *Муха В.Д.* Естественно-антропогенная эволюция почв (общие закономерности и зональные особенности). – М.: КолосС, 2004. – 271 с.
55. *Нетрусов А.И., Котова И.Б.* Микробиология. – М.: Издательский центр «Академия», 2009. – 352 с.
56. Номенклатура ферментов / Под ред. *В.Л. Кретовича*. – М.: ВИНТИ, 1966. – 256 с.
57. *Няникова Г.Г., Виноградов Е.Я.* *Vacillus Mucilaginosus*. Перспективы использования. – С-Пб.: НИИСХ, С-ПбГУ, 2000. – 124 с.
58. Определитель бактерий Берджи / Под ред. *Г.А. Заварзина*. – М.: Мир, 1997. – В 2-х т. – Т. 1, Т. 2. – 801 с.
59. Основные достижения и перспективы почвенной метагеномики / Под ред. *Е.В. Першиной, О.В. Кутовой, Б.М. Козута, Е.Е. Андропова*. – С-Пб.: Информ-Навигатор, 2017. – 288 с.
60. *Перельман А.И.* Геохимия. – М.: Высшая школа, 1989. – 528 с.
61. Почвенная микробиология / Под ред. *Д.И. Никитина*. – М.: Колос, 1979. – 316 с.
62. *Пошон Ж., Баржак Г.* Почвенная микробиология. – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1960. – 560 с.
63. Практикум по биологии почв / Под ред. *Д.Г. Звягинцева*. – М.: Издательство МГУ, 2002. – 120 с.
64. Практикум по микробиологии / Под ред. *А.И. Нетрусова*. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
65. *Савич В.И., Седых В.А., Гераськин М.М.* Охрана почв. – М.: Проспект, 2016. – 352 с.
66. Современная микробиология. В 2-х т. Т. 1 и Т. 2. / Под ред. *Й. Ленгелера*. – М.: Мир, 2009. – 1152 с.
67. *Сэги Й.* Методы почвенной микробиологии. – М.: Колос, 1983. – 296 с.
68. *Теплер Е.З.* Микроорганизмы рода *Nocardia* и разложение гумуса. – М.: ИНФРА-М, 2018. – 224 с.
69. *Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
70. *Титова В.И., Козлов А.В.* Методы учета численности и биомассы микроорганизмов почвы. – Н. Новгород: НГСХА, 2011. – 40 с.
71. *Титова В.И., Козлов А.В.* Методы оценки функционирования микробсообщества почвы, участвующего в трансформации органического вещества. – Н. Новгород: НГСХА, 2012. – 64 с.
72. *Туев Н.А.* Микробиологические процессы гумусообразования. – М.: Агропромиздат, 1989. – 239 с.
73. *Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л.* Микробиологическая трансформация азота в почве. – М.: ГЕОС, 2007. – 138 с.
74. *Хазиев Ф.Х.* Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 2005. – 252 с.
75. *Хазиев Ф.Х.* Системный экологический анализ ферментативной активности почв. – М.: Наука, 1982. – 202 с.
76. *Чернов И.Ю.* Дрожжи в природе. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. – 336 с.
77. *Щербакова Т.А.* Ферментативная активность почв и трансформация органического вещества. – Минск: Наука и техника, 1983. – 222 с.
78. *Шеуджен А.Х.* Биогеохимия. – Майкоп: ГУРИПП «Адыгея», 2003. – 1028 с.
79. Эволюция почв и почвенного покрова. Теория, разнообразие природной эволюции и антропогенных трансформаций почв / Под ред. *В.Н. Кудярова, И.В. Иванова*. – М.: ГЕОС, 2015. – 925 с.
80. Экология микроорганизмов / Под ред. *А.И. Нетрусова*. – М.: Изд-во Юрайт, 2015. – 268 с.

Учебное издание

Козлов Андрей Владимирович

**МЕТОДЫ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ
И ЭНЗИМОЛОГИИ В ЭКОСИСТЕМНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Учебно-методическое пособие для вузов

Издание в авторской редакции

Авторская корректура

Компьютерная верстка Н.В. Бражниковой

Подписано в печать 30.10.2023 г. Формат 60/84×16

Усл. печ. л. 9,5. Тираж 100 экз. Заказ № 12

Издательство ООО «Плодородие», 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 31-А

Тел.: 8 (499) 976-25-01, e-mail: pl@vniia-pr.ru