

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Н.Д. Пастухова

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ПОЧВЫ И ЕЕ ПЛОДОРОДИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**



Санкт-Петербург

2019

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Н.Д. Пастухова

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ И
БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ И ЕЕ
ПЛОДОРОДИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО
по направлениям подготовки 19.03.01 Биотехнология, 18.03.02 Энерго- и
ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и
биотехнологии и 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья
в качестве учебного пособия для реализации образовательных программ
высшего образования бакалавриата

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург

2019

УДК 60

Пастухова Н.Д. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ И ЕЕ ПЛОДОРОДИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ– СПб: Университет ИТМО, 2019. – 34 с.

Рецензенты: Чеботарь Владимир Кузьмич, кандидат биологических наук, заведующий лаборатории Технологии микробных препаратов ФГБНУ ВНИИСХМ

Рекомендовано для использования в учебном процессе для студентов, обучающихся в Университете ИТМО по направлениям подготовки 19.03.01 Биотехнология, 18.03.02 Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии и 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья. В пособии рассмотрены физико-химические и биологические факторы плодородия почв и способы его повышения, а также основные методы анализа почвы в биологических и экологических исследованиях, в том числе подходы к изучению микрофлоры почвы с целью получения биотехнологически ценных штаммов микроорганизмов.



Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2019

© Пастухова Н.Д., 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
I. Плодородие почвы	6
Физические факторы плодородия почвы	6
1. Гранулометрический состав и структура почвенного покрова	6
2. Водный режим почвы	8
3. Воздушный режим почвы	9
4. Температурный режим почвенного покрова	9
Химические факторы почвенного плодородия	11
1. pH почвенного раствора	11
2. Минеральный состав почвы	11
3. Содержание и состав органического вещества почвы	12
Биологические факторы плодородия почвы	14
1. Растения и почва	14
2. Почвенная фауна	15
3. Почвенная микрофлора	17
4. Фитосанитарное состояние почвы	20
Вопросы для самоконтроля	22
II. Основные методы исследования почвы	23
1. Пробоподготовка и физико-химический анализ почвы	23
2. Биологический анализ почвы	25
3. Молекулярный анализ почвенной микробиоты	29
Вопросы для самоконтроля	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	31
Список литературы	32

ВВЕДЕНИЕ

Начальный этап развития биотехнологии связывают с возникновением сбора семян растений для посева и селекции одомашненных животных, которые существовали уже в восьмом тысячелетии до н. э. в Месопотамии. Одной из основных задач *сельскохозяйственной биотехнологии* в наши дни является повышение продуктивности и устойчивости агроэкосистемы, что связано, в первую очередь, с сохранением плодородия почвы. В структуре земельного фонда Российской Федерации значительная доля приходится на земли сельскохозяйственного назначения или земли, пригодные для земледелия. Основными этапами землепользования являются мониторинг состояния почвенного покрова и создание условий для его эффективного и устойчивого функционирования. В разных регионах РФ это может сталкиваться с различными трудностями. В центральном округе страны более половины пахотных почв имеют кислую реакцию, и их подкисление продолжается. В некоторых областях Нечерноземной зоны свыше 30% пахотных почв имеют низкую обеспеченность обменным калием и характеризуются в основном средней обеспеченностью подвижным фосфором. При средних дозах минеральных (20 - 30 кг/га) и органических (0.5 – 1.0 т/га) удобрений пищевой режим продолжает ухудшаться. Поэтому удобрения должны обеспечивать не только питание культур, но и способствовать сохранению естественного плодородия, а в ряде случаев улучшать его.

Значительная часть черноземов сосредоточена в Юго-Восточном Закамье республики Татарстан, где действуют предприятия нефтегазодобывающей отрасли, машиностроения и сельского хозяйства. Экологическая ситуация в этом регионе неблагоприятна, что связано с загрязнением углеводородами и тяжелыми металлами. Возможность дальнейшей миграции загрязнителей в грунтовые воды и их доступность растениям обуславливает угрозу живым организмам, в том числе человеку. От состояния почвенного покрова зависит качество получаемой растительной продукции.

Наблюдается зависимость продукционного процесса от погодных условий, например, засухи или, наоборот, обводнения почвы в разные годы. Буферная способность почвы определяет долгосрочное обеспечение растений элементами питания и водой, препятствует их истощению.

Качество почвы определяется также её санитарным и фитосанитарным состоянием, т.е. отсутствием патогенной микрофлоры, отсутствием сорняков, вредителей, а также токсических веществ. Патогенные микроорганизмы могут попадать в почву с выделениями человека и животных. В почве могут встречаться яйца гельминтов и личинки паразитических червей, ведущих некоторое время свободный образ жизни. Их массовое развитие в почве происходит в весенне-летний и осенний сезоны. В зимний период они могут сохранять жизнеспособность на всех стадиях развития, особенно под снегом. Основными источниками яиц гельминтов являются больные люди, животные и птицы.

Фитотоксичность почвы связана с накоплением физиологически активных веществ - фенольных соединений, органических кислот, альдегидов, спиртов и т.д. При низких концентрациях таких веществ в почве обнаруживается стимулирующий эффект, а при увеличении содержания наступает сильное угнетение роста растений и прорастания семян. Фитотоксичные вещества накапливаются при возделывании на одном месте однородных культур или при создании в почве анаэробных условий. Так, при разложении остатков зерновых культур в почве обнаружено повышенное содержание фенольных соединений, которые, находясь в зоне семян растений, ингибируют прорастание. Поэтому для воспроизводства плодородия необходимо способствовать возвращению почвенного покрова к исходному состоянию.

Повышение плодородия почв с низким природным плодородием осуществляется двумя путями. Первый путь предполагает применение удобрений, мелиорантов, пестицидов, а также агрономически благоприятную структуру посевных площадей - севооборот. Второй подход основан на улучшении агрономических свойств почвы путем механической обработки и на применении мелиоративных приемов, но эффект такого технологического подхода обычно краткосрочен, поскольку основан на форсированном использовании ресурсов почвы.

В предлагаемом пособии рассматривается теоретический материал для семинарских занятий студентов-биотехнологов, а также описаны основные методы анализа почвы в биологических и экологических исследованиях, в том числе подходы к изучению микрофлоры почвы с целью получения биотехнологически ценных штаммов микроорганизмов. Изложенные данные могут быть использованы при выполнении курсовых работ и научно-исследовательских и производственных практик. Настоящее пособие рекомендовано для использования студентами, обучающимися в Университете ИТМО по направлениям подготовки 19.03.01 Биотехнология, 18.03.02 Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии и 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья в рамках дисциплин: Основы биотехнологии, Наука о Земле, Химия окружающей среды, Экологический мониторинг и Агрохимический способ коррекции уровня микронутриентов в растительном сырье для реализации основных профессиональных образовательных программ высшего образования бакалавриата.

I. Плодородие почвы

Плодородие почвы - способность почвы удовлетворять потребность растений в элементах питания, влаге и воздухе, а также обеспечивать условия для их нормальной жизнедеятельности. Это эмерджентное свойство, которое проявляется при взаимодействии компонентов почвы. Плодородие любой почвы может быть повышено при правильном ее использовании. Почвы разных участков могут обладать одинаковым химическим составом, но различным эффективным плодородием на данном отрезке времени из-за различия в водно-физических свойствах, биологических и производственных особенностях. К элементам плодородия относятся конкретные свойства почвы, определяющие высоту урожаев, такие, как физические, химические и биологические свойства.

Физические факторы плодородия почвы

1. Гранулометрический состав и структура почвенного покрова

Развитая почва представляет собой смесь механических элементов трех видов: минеральные, органические и органоминеральные частицы. В минеральных почвах преобладают минеральные механические частицы разной формы и размера, разного химического и минералогического состава. Относительное содержание в почве и породе механических элементов (фракций) называется *гранулометрическим составом*. Механические частицы почвы больше 1 мм в диаметре называют *скелетом почвы*, частицы меньше 1 мм — *мелкоземом*. Мелкозем рассматривают как *физический песок*, если его частицы более 0,01 мм, и как *физическую глину*, если размер частиц составляет менее 0,01 мм. В зависимости от содержания физического песка и физической глины почвы могут быть песчаными, супесчаными, суглинистыми и глинами [3].

Гранулометрический состав определяет сорбционные (поглощительные) свойства почвы. Тонкодисперсные частицы в силу большой абсолютной и удельной поверхности обладают высокой емкостью поглощения. С уменьшением частиц растёт их гигроскопичность, влагоемкость и пластичность. Частицы менее 0,001 мм обладают четко выраженной коагуляционной способностью. Эта способность механических тонкодисперсных частиц исключительно важна при структурообразовании почвы. Такие частицы, вследствие высокой поглощительной способности, содержат большее количество гумуса.

По мере увеличения в составе почвы мелкозема уменьшается *плотность почвы*. Валовой химический состав разных механических фракций почвы закономерно изменяется независимо от типа почвы. При увеличении дисперсности почвенных частиц в них резко уменьшается содержание кислорода и возрастает количество таких элементов, как железо, алюминий, кальций, магний, калий и натрий.

Наиболее ценной частью рыхлых пород и почв являются частицы до 0,001 мм, поскольку в них содержатся основные запасы зольных питательных элементов.

Пластичность почвы зависит от содержания в почве физической глины. Аналогично гранулометрический состав влияет и на *твёрдость почвы*. При высокой твёрдости почвы затруднён рост проростков и корней растений, а нередко этот фактор является и причиной гибели растений. Также твёрдые почвы оказывают большое сопротивление при техническом возделывании и при воздействии живых организмов.

Набухаемость почвы связана с формированием вокруг коллоидных и глинистых частиц так называемых *оболочек связанной воды*, которые уменьшают силы сцепления между этими частицами, в итоге раздвигают их и способствуют увеличению объема почвы. В основном величина и характер набухания почвы зависят от *минералогического состава почвы*, в

частности, от содержания вторичных минералов типа монтмориллонита, имеющих подвижную кристаллическую решетку.

Среди других технологических свойств важную роль играет *липкость* почв: при излишней липкости увеличивается тяговое сопротивление при обработке почвы, и в результате резко ухудшается её качество. Липкость почвы напрямую связана с содержанием физической глины в почвенном горизонте.

При качественной оценке (*бонитировке*) пахотных почв гранулометрический состав как фактор плодородия почв играет важную роль. В большинстве случаев лучшее сочетание физико-химических и биологических факторов плодородия отмечается в почвах среднего гранулометрического состава. Для разных типов почв оценка гранулометрического состава как фактора плодородия может отличаться. Так, наиболее высокое плодородие черноземов соответствует тяжелому гранулометрическому составу. В то же время для дерново-подзолистых почв в зонах достаточного или избыточного увлажнения наиболее благоприятен более легкий гранулометрический состав.

Структура почвенного покрова – другой важный показатель физического состояния почвы. Под структурой понимают строение пахотного слоя почвы, её физико-механические и технологические свойства.

Частицы твердой фазы почвы способны склеиваться в комочки различной формы и величины - агрегаты. Способность почвы распадаться на агрегаты различной величины называют *структурностью*.

В почвоведении структура почвы - важный морфологический признак: по размеру агрегатов судят о генетических особенностях почвы и ее отдельных горизонтов. По классификации С. А. Захарова, различают следующие типы структуры: глыбистую, комковатую, ореховатую, зернистую, столбчатую, призматическую, плитчатую, пластинчатую, листоватую, чешуйчатую [3]. Черноземы обычно характеризуются отчетливо выраженной зернистой структурой, серые лесные почвы - ореховатой. Хорошо окультуренные дерново-подзолистые почвы приобретают комковатую структуру, тогда как неокультуренные подзолы отличаются плитчатой и листоватой.

Принята следующая классификация структурных агрегатов по размеру: глыбистая структура характерна для агрегатов более 10 мм, макроструктура наблюдается у комков от 0,25 до 10 мм, микроструктура - при размере менее 0,25 мм. В условиях эрозионной опасности и в засушливых районах особое агрономическое значение приобретает увеличение размеров агрегатов до 1 - 2 мм в диаметре.

Образование структурных агрегатов в почве может происходить вследствие *коагуляции* (взаимного осаждения) коллоидов, а также при коагуляции коллоидов под влиянием электролитов. Эти процессы проявляются на фоне более общих механических, физико-химических и биологических факторов структурообразования. Механическое разделение почвенной массы на комки (агрегаты) в природных условиях происходит под воздействием корневых систем растений, жизнедеятельности биоты почвы, под влиянием периодических промораживания - оттаивания, увлажнения и высушивания почвы. В обрабатываемых почвах разделение на агрегаты происходит при воздействии почвообрабатывающих машин или орудий.

Состояние структуры почвы определяет параметры строения пахотного слоя. Для образования прочной структуры почвы необходимы следующие условия: достаточное количество минеральных и органических коллоидов; достаточное содержание в почве щелочноземельных оснований; благоприятные гидротермические условия в почве; воздействие на почву корней растений, почвенной фауны (дождевых червей, насекомых, землероек и др.).

Структурное состояние почвы является достоверным интегральным показателем её плодородия.

Важным физическим фактором почвенного плодородия является и *мощность её пахотного и гумусового слоев*. Под мощностью обрабатываемого слоя понимают объем почвы, в котором развивается корневая система растений. Глубокий пахотный слой обеспечивает более благоприятные водно-воздушный и тепловой режимы. Осадки, поливная вода быстро

поглощаются почвой, аккумулируются в ней и затем потребляются растениями по мере их роста и развития. Тонкий пахотный слой не способен длительное время аккумулировать воду для растений и других живых организмов.

Таким образом, глубокий пахотный слой является своеобразным регулятором влажности почвы как при недостатке, так и при избытке выпадающих осадков. Это обеспечивает благоприятный питательный режим почвы, обусловленный, в свою очередь, нормально протекающими процессами разрушения и синтеза органического вещества.

При обработке почвы на 20 - 22 см в подпахотном слое нельзя обнаружить такие важные группы микроорганизмов, как нитрификаторы и целлюлозолитические микроорганизмы [2]. При обработке почвы на 30 - 40 см эти микроорганизмы широко представлены в почве. Общее количество микроорганизмов в почве и продуцирование почвой CO_2 при глубокой обработке возрастало в 1,5 - 2 раза [2].

2. Водный режим почвы

Вода в почве необходима для прорастания семян и для последующего роста и развития растения. С ней в растение из почвы поступают питательные вещества, а испарение воды листьями обеспечивает нормальные температурные условия жизнедеятельности растения.

Вода необходима для почвообразования и формирования почвенного плодородия. Без нее невозможно развитие почвенной фауны и микрофлоры. Процессы превращения, трансформации и миграции веществ в почве также требуют наличия воды.

Для определения потребности растений в воде применяют такой показатель, как *транспирационный коэффициент*, количество весовых частей воды, затраченной на одну весовую часть урожая.

Степень доступности почвенной влаги растениям и состояние водного режима выражают следующими *почвенно-гидролитические константы*:

1. *Максимальная адсорбционная влагоемкость* (МАВ) - это влажность почвы, соответствующая наибольшему содержанию недоступной растениям прочносвязанной влаги.

2. *Максимальная гигроскопичность* (МГ) определяется количеством воды, которое почва может сорбировать из воздуха, полностью насыщенного водяным паром. Влага, соответствующая максимальной гигроскопичности, полностью недоступна растениям.

3. *Влажность устойчивого завядания растений* (ВЗ) определяется по содержанию в почве воды, при котором растения обнаруживают признаки завядания, не проходящие при помещении растений в атмосферу, насыщенную водяным паром.

4. *Наименьшая (полевая) влагоемкость почвы* (НВ) соответствует капиллярно-подвешенному насыщению почвы водой, когда последняя максимально доступна растениям.

Капиллярная влагоемкость определяется количеством воды, содержащимся в капиллярах почвы, подпертых водоносным горизонтом. Наименьшая влагоемкость аналогична капиллярной, но при условии отрыва капиллярной воды от воды водоносного горизонта.

5. *Полная влагоемкость* (ПВ) - это такое содержание влаги в почве, когда все ее поры, капиллярные и некапиллярные, насыщены водой.

6. *Водопроницаемостью* почвы называют способность впитывать и пропускать через себя воду. Водопроницаемость зависит от гранулометрического состава, структуры почвы и степени увлажнения.

7. *Водоподъемная способность почвы* определяется как способность к капиллярному подъему воды. Обусловлено это свойство действием менисковых сил смоченных водой стенок почвенных капилляров.

Условия водного режима в пахотной почве постоянно изменяются. Радикальным методом регулирования водного режима почв является её мелиорация при двухстороннем регулировании водного режима - орошение со сбросом лишней воды или осушение в комплексе с дозированным орошением.

3. Воздушный режим почвы

Почвенный воздух отличается от атмосферного большим содержанием углекислого газа и меньшим содержанием кислорода. Колебания в составе почвенного воздуха наблюдаются в зависимости от типа почвы, системы удобрений и обработки почвы, а также типа выращиваемой сельскохозяйственной культуры. При содержании в почве углекислого газа более 3 - 5%, а кислорода менее 10% наступает угнетение растений [2].

Недостаток воздуха в почве очень сильно лимитирует ее плодородие. Почвенный воздух заполняет поры, не занятые водой. Избыточная влажность приводит к резкой его недостаточности. Почвенный воздух необходим для дыхания корней растений, почвенных организмов, биохимических процессов превращения питательных элементов [2]. Почвенный углекислый газ также потребляется растениями в процессе фотосинтеза, как и атмосферный.

Газообмен между почвой и атмосферой осуществляется посредством диффузии. Также газообмен происходит при изменении барометрического давления или температуры почвы и воздуха, при поступлении в почву воды, а также при воздействии ветра. При нагревании почвы воздух частично выходит наружу, а при охлаждении почвы почвенные поры получают воздух из атмосферы. При поступлении в почву воды воздух из почвенных пор вытесняется, затем, после оттока из них влаги, они заполняются новым воздухом.

Оптимальное содержание воздуха в пахотной почве для отдельных культур составляет: зерновые культуры до 20 % общей пористости, пропашные - 20 - 30 %, многолетние травы - около 20 %.

Основным приемом регулирования воздушного режима почвы является механическая обработка, которая способствует газообмену в почве. Её значение возрастает при избыточном увлажнении почв или их тяжелом гранулометрическом составе.

4. Температурный режим почвенного покрова

Все микробиологические процессы и жизнедеятельность фауны в почве протекают в определенных температурных границах. Аналогично, физиологические процессы, происходящие в растениях, требуют определенных температур. При этом отдельные живые организмы предъявляют различные требования к температурному режиму почвы.

Наряду с крайними границами температур, характеризующими *температурные минимум* и *максимум* для отдельных видов живых организмов, существует свой определенный *оптимум* – наиболее благоприятная температура для протекания биологических процессов. Требования к температурным условиям могут меняться по мере роста и развития организма.

Протекание физико-химических процессов в почве также может зависеть от температурного режима.

Основным источником тепла в почве служит солнечная энергия. Другой, менее значительный источник - это тепло, выделяемое в почву в результате биологических и химических превращений, а также тепло, поступающее из глубинных слоев Земли.

Аккумуляция и передача тепловой энергии в почве зависит от следующих её свойств: теплопоглощательной способности и теплопроводности. *Теплопоглощательная способность* почвы характеризуется величиной альбедо (А), то есть долей отражаемой почвой солнечной радиации.

А зависит от цвета почвы, ее структуры и выровненности, а также влажности. Растительность, покрывающая почву, значительно изменяет альбедо. На лучепоглотительную и лучеотражательную способность почвы большое влияние оказывает степень ее гумусированности.

Теплопроводность почвы - это количество тепла, протекающее через слой почвы площадью 1 см^2 и толщиной 1 см в перпендикулярном к ней направлении, при разнице на обеих сторонах слоя в 1°C . Теплопроводность, как и теплоемкость, зависит от гранулометрического и химического составов почвы, ее влажности. Сухие, хорошо гумусированные почвы плохо проводят тепло. Сырые тяжелые почвы отличаются повышенной теплопроводностью.

На поглощение почвой солнечной энергии большое влияние оказывает экспозиция склона. Южные склоны значительно отличаются от северных по тепловому режиму почв. Иногда эти различия достигают величин, соответствующих разным климатическим зонам.

Расход тепла почвой происходит при лучеиспускании тепла в атмосферу, при *конвекции* - передаче тепла прилегающему слою воздуха, а также при испарении воды.

Меры по улучшению теплового режима почв совпадают с мерами регулирования водного режима. Важное значение имеет снегозадержание и агролесомелиоративная организация территории, дождевание и мульчирование поверхности почвы.

Химические факторы плодородия

1. pH почвы

Одной из основных характеристик является pH почвенного раствора. Химические и биологические процессы в почве также протекают при определенном pH. При повышении кислотности почвы снижается поглощение питательных веществ растениями, происходят изменения в цитоплазме клеток корня, нарушается ее проницаемость, наружные клетки ослизняются, корни плохо растут [2].

Большинство возделываемых культур, как и почвенная биота, лучше развиваются при слабокислой или нейтральной реакции почвенного раствора. Между тем, отдельные виды могут значительно различаться по требовательности как к наиболее оптимальному для их роста интервалу pH, так и к смещению его в ту или иную сторону.

Повышенная кислотность угнетает многие важные почвенные микроорганизмы, например, многие нитрифицирующие и азотфиксирующие бактерии (клубеньковые и свободноживущие), почвенную фауну - дождевых червей, клещей, насекомых, ногохвосток. Биологическая активность кислой почвы ниже, чем нейтральной.

Таким образом, в кислых и щелочных почвах формируется специфическая устойчивая к этим условиям микрофлора, то же в полной мере касается фауны и растительности. Как правило, состав микробиоты, флоры и фауны в них беднее, чем в почвах с близким к нейтральному значению pH.

Чтобы привести реакцию почвы к интервалу слабокислая - слабощелочная применяют химическую мелиорацию почв. Кислые почвы периодически известкуют, а щелочные, такие как солонцы, гипсуют.

2. Минеральный состав почвы

В почве могут присутствовать практически все элементы периодической таблицы Д.И. Менделеева. Среди них количественно преобладают кислород, кремний, железо, кальций, натрий, калий, углерод и хлор. Из химических элементов, входящих в небольших количествах в минеральный состав почвы (микроэлементов) содержатся - фтор, йод, медь, цинк, марганец, кобальт, молибден и др.

Значительное влияние на минеральный состав почвы оказывает *материнская порода*. Минеральные (неорганические) вещества почвы на 60 - 80% представлены кристаллическим кремнеземом или кварцем. Значительное место занимают алюмосиликаты - полевые шпаты и слюда. К алюмосиликатам относятся и вторичные глинистые минералы, в частности монтмориллонитовая группа (монтмориллонит, нонтронит, бейделит, соконит, гекторит, стивенсит). Значение монтмориллонитов обусловлено тем, что они определяют поглотительную способность и емкость поглощения катионов (например, тяжелых металлов) почвой. Чем старше почва, тем больше *минералогический состав почвы* отличается от состава породы, на которой она образовалась.

Растения усваивают азот и зольные элементы из почвы в форме минеральных солей в почвенном растворе. При этом используются как восстановленные (соли аммония), так и окисленные (соли азотной кислоты) соединения азота.

Растения могут усваивать и относительно простые органические азот- и фосфорсодержащие вещества, такие как аминокислоты и фитин, но практическое их значение в питании невелико.

Недостаток в почве обменных кальция и магния может вызвать резкое ухудшение физических и химических свойств почвы - структуры, емкости поглощения и буферности. В почвенном растворе появляются свободные ионы алюминия и марганца, токсичные для растений. Подвижность же ряда микроэлементов, например, молибдена, уменьшается, растения испытывают в них недостаток.

Для повышения содержания в почве таких жизненно важных элементов, как калий, азот и фосфор, вносят минеральные удобрения. Эффективность удобрений зависит от климатических условий и состояния почвенного покрова. Уровень плодородия почвы, состояние питательного режима, ее трансформационные возможности в отношении доступности вносимых удобрений для возделываемых растений - все это оказывает влияние на выбор видов удобрений.

3. Содержание и состав органического вещества почвы

Органическое вещество почвы образуется из остатков живых организмов - растений, микроорганизмов, почвенных животных, а также продуктов их жизнедеятельности. В этих остатках содержатся все макро- и микроэлементы, необходимые для роста и развития растениям и животным.

Первичное органическое вещество, поступившее в почву, подвергается сложным превращениям, включающим процессы разложения, вторичного синтеза и гумификации. В результате совокупного действия этих процессов в почве образуется сложная смесь органических веществ, состоящая из плохо разлагаемых растительных и животных остатков, а также промежуточных продуктов разложения органических соединений; собственно гумусовых веществ, образовавшихся путем микробного синтеза и химических процессов; растворимых органических соединений, минерализуемых до простых минеральных соединений (H_2O , CO_2 и др.)

Органическое вещество сохраняет энергию солнца в почве в химической форме и формирует таким образом ее плодородие. На ход и скорость разложения органических остатков биологического происхождения влияют, во-первых, внешние условия среды - влажность, температура, рН почвы, содержание в ней кислорода и питательных веществ, а, во-вторых, химический состав растительных остатков.

Превращение первичного органического вещества в почве проходит в несколько этапов. На первом этапе происходит химическое взаимодействие между различными веществами (например, ароматические соединения клеточных оболочек могут вступать в химические реакции с белками растительных клеток). Этот процесс можно ускорить за счет биологических процессов и катализаторов.

На втором этапе происходят перемешивание остатков с почвой при помощи почвенной фауны.

На третьем этапе превращения первичного органического вещества в почве происходит *минерализация* его с помощью микроорганизмов. В первую очередь минерализуются водорастворимые органические соединения, а также крахмал, пектин и белковые вещества. Значительно медленнее минерализуются хитин и целлюлоза. При разложении последней освобождается лигнин - соединение, устойчивое к микробиологическому разложению.

Конечными продуктами превращений первичного органического вещества являются минеральные продукты - CO_2 , H_2O , нитраты, фосфаты, а в анаэробных условиях H_2O и CH_4 . Кроме того, в почве в качестве продуктов метаболизма микроорганизмов накапливаются низкомолекулярные органические кислоты - муравьиная, уксусная, щавелевая и др. Процессы минерализации органического вещества в почве имеют экзотермический характер и поэтому могут служить ее нагреванию.

Часть продуктов биологической трансформации первичного органического вещества превращается в особую группу высокомолекулярных соединений - *гумусовые вещества*, сам процесс называют *гумификацией*. Гумусовые вещества составляют до 90% органического вещества почвы.

Гумусовые вещества делят на три основные группы соединений: гуминовые кислоты, фульвокислоты и гумины. *Гуминовые кислоты* (ГК) - темноокрашенная фракция высокомолекулярных соединений, извлекаемая из почвы щелочными растворами, которая при подкислении вытяжки выпадает в осадок в виде *гуматов*.

В составе гуминовых кислот содержится углерода - 52 - 62 %, водорода - 3,0 - 5,5 %, кислорода - 30 - 33%, азота - 3 - 5 %. Основу молекулы ГК образует ядро, сформированное ароматическими и гетероциклическими кольцами типа бензола, фурана, пиридина, нафталина, антрацена, индола и хинолина. Ароматические кольца соединены между собой в рыхлую сетку, боковые периферические структуры молекулы - в алифатические цепи. Ядро молекулы ГК отличается гидрофобными свойствами, боковые цепи - гидрофильными. Конституционная часть молекулы ГК - это функциональные группы: карбоксильные и фенолгидроксильные, определяющие кислотный характер ГК и способность к катионному обмену.

Фульвокислоты (ФК) - это органические оксикарбоновые азотсодержащие кислоты. В составе ФК углерода - 45,3 %, водорода - 5 %, кислорода - 47,3 %, азота - 2,4 % [2]. По сравнению с элементным составом ГК, фульвокислоты содержат меньше углерода и азота, а кислорода - больше. Фульвокислоты следует рассматривать как химически наименее «зрелые» гуминовые соединения. Между ГК и ФК существует тесная связь. Как те, так и другие очень неоднородны и представлены многочисленными фракциями.

Гумины являются наиболее инертной частью почвенного гумуса и не извлекаются из почвы при обычной обработке ее щелочными растворами. По своему составу гумины близки к ГК. Фракция гуминовых веществ более прочно связана с минеральной частью почвы, что значительно меняет ее свойства.

В значительной степени важная роль органического вещества в формировании почвы основана на его способности взаимодействовать с минеральной частью. Образующиеся при этом *органоминеральные соединения* - важное составляющее любой почвы. Образованию органоминеральных соединений в почве способствует высокая биологическая активность. Торф является малодоступным органическим веществом, поэтому его внесение в почву не приводит к образованию органоминеральных соединений.

Органическое вещество почвы, аккумулируя огромное количество углерода, участвует в круговороте углерода в природе, а также способствует накоплению других важных элементов в земной коре. В этом состоит важная биогеохимическая функция органического вещества почвы.

Биологические факторы плодородия почвы

1. Растения и почва

Как отмечалось выше, на плодородие почвенного покрова значительное влияние оказывают живые организмы, чья жизнедеятельность связана с почвой: это сами растения, почвенная фауна и микрофлора (микроорганизмы, населяющие почву). Растения оказывают на почву различное влияние как при вегетации (круговорот веществ в почве, физическое рыхление корнями и др.), так и после - состав и структура растительного опада, обогащающего почвенное плодородие.

Важно отметить присутствие в почве *низших растений*, что не всегда учитывается. В почвах присутствует несколько сотен видов одноклеточных водорослей, относящихся к зеленым и диатомовым. Их численность составляет 10 - 100 тыс. клеток/ г почвы. Зеленые водоросли чаще присутствуют во влажных и кислых почвах, в то время как диатомовые водоросли населяют хорошо дренируемые почвы, богатые органическим веществом. Водоросли осуществляют фотосинтез и продуцируют органическое вещество в плодородных почвах, могут синтезировать углеводы, которые способствуют склеиваемости почвы.

С целью получения элементов питания и полезных веществ растения способны вступать в симбиотические отношения с микроорганизмами, способными переводить важные химические элементы в биодоступную форму. У *высших растений* бывает недостаточно собственных корней, что восполняется наличием *микоризы*. *Микоризные грибы* образуют сеть филаментов, которые увеличивают всасывающую поверхность растений. В итоге растения получают дополнительный доступ к питательным веществам и воде. В свою очередь, грибы получают прямой доступ к углеводам, которые вырабатываются растениями в ходе фотосинтеза.

При выращивании растений в почве происходят одновременно два противоположных процесса: синтез и накопление органического вещества, а также и его разрушение. Интенсивностью обоих процессов и их соотношением определяются влияние данной культуры на почву. Если конечный результат положительный, за культурой признается свойство улучшать плодородие почвы, и наоборот. На процесс разрушения органического вещества влияют не столько сами культуры, но и приемы их возделывания.

На пахотных почвах источником органического вещества служат надземные и корневые остатки растений, а также вносимые в почву органические удобрения. Растительные остатки разделяют на три группы: 1) пожнивные; 2) листостебельные; 3) корневые остатки растений.

Пожнивные остатки представлены стерней злаков, частями стеблей, листьев и других надземных частей растений, которые остаются на поле после уборки урожая. Листостебельные части растений включают корневища, столоны картофеля, корневые шейки клевера, люцерны и других трав, остатки клубней, корнеплодов, луковиц. Размеры корнепада зависят от типа культур и могут варьировать от 100 до 800 кг/га сухого вещества. Запасы гумуса за счет корнепада и корневых выделений могут пополниться на 130 - 230 кг/га [2]. Корни еще при жизни растений активно участвуют в почвенных процессах и способствуют равномерному распределению органического вещества и образованию структурных агрегатов, как отмечалось выше.

Наряду с количеством растительных остатков, важное значение имеет их химический состав и скорость разложения в почве. Растительные остатки многолетних трав содержат большое количество питательных элементов. Содержание основных элементов в корневых остатках многолетних бобовых трав, которые формируют симбиоз с азотфиксирующими микроорганизмами, колеблется: азота до 2,60 %, фосфора - до 0,80 %. Количество азота и фосфора в корнях бобово-злаковых травосмесей зависит от доли каждого компонента и составляет до 2,37 % азота и до 1,06% фосфора, в поукосных остатках - 2,18 % и 0,54 %, соответственно [2]. Злаковые травы содержат значительно меньшее количество азота в корнях и поукосных остатках. Поэтому именно бобовые рассматривают как культуры, улучшающие состояние почвы и ее плодородие.

Важную роль в формировании структуры почвы и ее плодородия играют полимеры, входящие в состав живых организмов. Основные биополимеры, поступающие в почву с растительными остатками, - это *крахмал*, *целлюлоза* и *лигнин*. Все три полимера являются водонерастворимыми, что является отрицательным при биологическом и небιологическом разложении фактором. Только крахмал при повышении температуры воды начинает растворяться, но при этом образует коллоидный раствор - клейстер. В кислой среде он постепенно гидролизуеться вплоть до глюкозы. Поэтому именно крахмал является наиболее биодоступным среди этих полимеров природного происхождения. Многим гетеротрофным бактериям (например, представителям рода *Bacillus*) и микромицетам свойственна *амилазная активность* (расщепление крахмала до олигосахаридов с участием амилаз - ферментов класса гидролаз). Амилазы есть также у животных и, что интересно, у самих растений.

Целлюлоза, которая есть в составе клеточных оболочек всех высших растений, в воде нерастворима, также не растворяется в слабых кислотах и большинстве органических растворителей. Волокна, окружающие семена хлопчатника, состоят из целлюлозы более чем на 90 %. Гидролиз целлюлозы, тем не менее, возможен в определенных условиях, и в почве присутствуют *целлюлозоразрушающие микроорганизмы* (самые известные из них - бактерии рода *Cellulomonas*). Животные не способны к деструкции целлюлозы, но травоядные животные имеют в пищеварительном тракте микробных симбионтов, которые расщепляют и помогают им усваивать этот полисахарид. Расщепление целлюлозы связано с действием фермента *целлюлазы*.

Лигнин входит, в основном, в одеревеневшие стенки растительных клеток и присутствует у сосудистых растений и некоторых водорослей. Он практически негидролизуеться, обладает высокой прочностью на сжатие. Поэтому одеревеневшие клеточные стенки обладают ультраструктурой, подобной структуре железобетона: микрофибриллы целлюлозы по своим свойствам соответствуют арматуре, а лигнин - бетону. Лигнин широко используется в промышленности (древесные материалы и пр.) и медицине. Энтеросорбенты на основе лигнина связывают различные микроорганизмы, токсины экзогенной и эндогенной природы, аллергены и ксенобиотики, а затем выводятся через кишечник в неизмененном виде. Древесина лиственных пород содержит 18 - 24 % лигнина, хвойных - 23 - 50 %, а солома злаков - 12 - 20 %.

Отдельно можно упомянуть *пектины*, которые присутствуют во всех высших растениях, особенно во фруктах, а также и в некоторых водных растениях. Пектины способствуют поддержанию в растительных тканях тургора, повышают засухоустойчивость растений, устойчивость овощей и фруктов при хранении, чем отчасти и обусловлено их промышленное использование. Воду пектины сначала сорбируют, затем начинают растворяться. В промышленности их используют также как желирующие агенты. Пектины, в отличие от других полимеров растений, обладают хорошей биодоступностью. Их активно разлагают микромицеты и бактерии (например, представители рода *Clostridium*).

2. Почвенная фауна

Под *почвенной фауной* понимают организмы, которые обитают в течение существенной части своего жизненного цикла в почве. Фауна - важный компонент почвы, в хорошо окультуренной почве общая масса живых организмов может достигать 10 т/га. Выделяют следующие функции почвенной фауны - разложение органического вещества почвы, участие в биогеохимических циклах основных элементов, первичная продуктивность и структура почвенного покрова, а также регуляция водного обмена, эрозии и вредителей.

По размеру обитателей почвы делят на макро-, мезо- и микрофауну. Почву населяют позвоночные животные, главным образом, грызуны (суслики, байбаки, сурки, хомяки, хорьки, мыши, слепыши, кроты), образующие местами многочисленные норы. Заполненные норы землероев, имеющие на почвенном разрезе вид овальных пятен разного диаметра, называют котловинами. Перерытость почвы чаще отрицательно влияет на ее свойства, увеличивая

карбонатность и водопроницаемость до очень большой потери воды на фильтрацию. Глубокая обработка почвы и выравнивание поверхности уменьшают это вредное воздействие.

Почвенные животные заселяют, в основном, верхние (глубиной до 20 - 40 см) горизонты почвы, в сухих местностях лишь отдельные виды проникают на глубину на несколько метров [1].

Мезофауну почвы составляют насекомые, ногохвостки, клещи, нематоды, коловратки, мокрицы, многоножки, пауки, моллюски и др. Черви и личинки перемешивают почву, вынося землю наверх из глубоких слоев, и обогащают ее органическим веществом. Почвенная масса, прошедшая через кишечник дождевых червей, обогащается азотом и кальцием, приобретает большую емкость поглощения. Таким образом, дождевые черви улучшают химические и физические свойства почвы, увеличивая пористость, аэрацию и влагоемкость. В сильно кислых и щелочных, заболоченных или очень сухих почвах дождевые черви могут отсутствовать [1].

К микрофауне почвы относят микроскопических *эукариот* - простейших, таких как амёбы, инфузории и др., которые ведут хищный или паразитический образ жизни. Они живут в воде, заполняющей почвенные поры. Чем меньше размеры организмов, тем больше их содержится в почве. Простейшие содержатся в количестве более миллиона экземпляров в 1 г почвы. Для сравнения, насекомые и их личинки исчисляются тысячами экземпляров на 1 м², ногохвостки и клещи - десятками тысяч, нематоды - миллионами. Число позвоночных в некоторых почвах достигает нескольких тысяч на 1 га.

Одна из функций почвенных организмов - создание прочной комковатой структуры почвы пахотного слоя. Последнее в решающей степени определяет водно-воздушный режим почвы, создает условия высокого плодородия почвы.

Почвенные организмы выделяют в процессе жизнедеятельности различные физиологически активные соединения, способствуют переводу одних элементов в подвижную форму и, наоборот, закреплению других в недоступную для растений форму.

В обрабатываемой почве функции почвенных организмов сводятся к поддержанию оптимального питательного режима (частичное закрепление минеральных элементов с последующим освобождением), оструктурированию почвы, устранению неблагоприятных экологических условий в почве. Почвенная фауна способствует перемещению веществ по профилю почвы, тщательному перемешиванию органической и минеральной части почвы.

В почве существуют тесные многообразные связи между всеми живыми организмами, которые ее населяют. Между одними группами формируются симбиотические, взаимно полезные связи, между другими - антагонистические. Для трансформации органического вещества в почве важное значение имеют *синтрофные ассоциации* между организмами. При синтрофных связях субстрат используется одновременно.

Среди полимеров, поступающих в почву с животными остатками, стоит упомянуть наиболее известные - гликоген и хитин. *Гликоген*, который иногда называют животным крахмалом, в клетках животных служит основным запасным углеводом и основной формой хранения глюкозы. Поэтому он достаточно легко усваивается многими живыми организмами. *Хитин* - это основной компонент экзоскелета (кутикулы) членистоногих и других беспозвоночных, он также входит в состав клеточной стенки грибов. Каждый год на Земле в живых организмах образуется и разлагается около 10 миллиардов тонн хитина. Химически хитин представляет собой природное соединение из группы азотсодержащих полисахаридов, нерастворимое в воде и полярных органических растворителях (этанол, диэтиловом эфире, ацетоне), но хорошо растворяется в концентрированных растворах некоторых солей. Одно из промышленных производных хитина - хитозан. Ферменты, гидролизующие хитин, называют *хитиназы*. Многие актиномицеты и бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas* за счёт секреции хитиназ способны использовать хитин в качестве единственного источника

углерода. Эти ферменты также присутствуют у растений, грибов, животных и насекомых, кодирующие их гены есть даже у вирусов.

В целом биополимеры, присутствующие у животных и растений, при попадании в почву оказывают на ее структуру и химический состав существенное влияние, а также играют важную роль в формировании гумуса.

3. Почвенная микрофлора

Основной вклад в биомассу среди почвенных обитателей (в расчете на г сухой массы/м²) вносят микроорганизмы - до 85%. В целом, к микроорганизмам относят микроскопические живые организмы - как *прокариоты* (не имеющие организованного ядра в клетке, доядерные - бактерии, археобактерии, цианобактерии), так и *эукариоты* (ядерные - микроскопические грибы, водоросли, простейшие, нематоды и др.). Если говорить конкретно о прокариотах, которые численно преобладают над всеми остальными, то в одном грамме почвы можно насчитать один миллиард бактериальных клеток и 10 тыс. различных геномов, т.е. по факту видов [20]. Почва является своеобразным «хранилищем» всех микроорганизмов биосферы, которые тем или иным путем попадают в неё из остальных биотопов. Поэтому почва является ресурсом глобального биоразнообразия. Понятно, что часть из них активно функционирует в почве, а другая часть просто сохраняется в ожидании благоприятных условий для своей жизнедеятельности (образно это называют состоянием «бдительного ожидания»). Принято делить почвенных прокариот на *автохтонную* и *зимогенную микрофлору* (термины принадлежат выдающемуся микробиологу С. Н. Виноградскому).

Виноградский считал, что *автохтонная микрофлора* разлагает гумусовые вещества. Однако, по современным представлениям, среди аборигенных прокариот есть те, кто могут и не осуществлять минерализации гумуса. *Зимогенная микрофлора*, напротив, развивается при поступлении в почву легкодоступного органического вещества, ее представители активно размножаются и могут преобладать численно при наличии питательного субстрата. Сюда часто относят представителей гетеротрофных бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*.

По типам почв наблюдается такое распределение численности микроорганизмов: бурые и серозёмы > каштановые > чернозёмы > серые лесные > подзолы и дерново-подзолистые > тундрово-глеевые и глеево-подзолистые почвы > кислые и щелочные почвы (например, торфяные и солончаки). В окультуренных почвах доля культивируемой микрофлоры, как правило, больше, чем в целинных.

Поскольку почва является гетерогенной средой, где формируются различные микрзоны, условия в которых могут существенно отличаться, в том числе по наличию биодоступных соединений, органического вещества и воды, распределение микроорганизмов в почве имеет *микрзональный характер* [17], что важно учитывать при почвенном микробиологическом анализе. Часть микроорганизмов находится в почвенном растворе, но часто благодаря *адгезии* почвенные прокариоты распределяются на поверхности твердой фазы, в таком состоянии может повышаться активность ферментов и в целом жизнедеятельность микроорганизмов.

В микрзонах также усиливается взаимодействие между самими микроорганизмами вследствие близкого контакта. Это важно для анализа многоступенчатых процессов трансформации химических соединений, в которых могут участвовать разные группы микроорганизмов.

Здесь особую роль играют *хищные* (по отношению к другим микроорганизмам) почвенные *бактерии*. Некоторые из них, прикрепляясь снаружи к клеткам хозяина, теряют подвижность и развиваются как *экзопаразиты*, лизируя клетки хозяина, другие - проникают внутрь клетки и поэтому обладают сложным жизненным циклом с переменной местообитания и, соответственно, чередованием в жизненном цикле разных морфологических типов клеток. При

этом часто хищные бактерии обладают узкой хозяйской специфичностью, предпочитая определенные виды хозяев.

Коммуникация микроорганизмов в почве может происходить не только контактным способом, но и биохимически. С этой целью микроорганизмы способны выделять самые разные химические соединения. Такое биохимическое взаимодействие приводит к «совместной деятельности» микроорганизмов на уровне вида, этот феномен получил название *quorum sensing* («чувство кворума»). Стоит отметить, что именно в почве распространены социальные бактерии, например, миксобактерии (порядок *Mycoboccales*), имеющие серьезный биотехнологический потенциал. Для миксобактерий характерен сложный цикл развития, включающий образование плодовых тел и свободноживущую стадию. Такой цикл обеспечивается одним из самых больших в прокариотическом мире геномов (около 10 млн пар нуклеотидов). Их колонии способны передвигаться по поверхности, что также обеспечивается системой *quorum sensing*, и выделять различные антибиотические соединения и экзоферменты, которые, собственно, и разрушают сложные органические субстраты в почве.

В зависимости от особенностей питания различают *автотрофные* и *гетеротрофные* прокариоты. Автотрофные бактерии синтезируют углеводы, фиксируя двуокись углерода, используя свет или химические соединения. Бактерии-гетеротрофы являются *сапрофитами* и разлагают органические вещества, например корни или опад для получения органического вещества.

По локализации почвенные прокариоты можно разделить на *свободноживущие* в почве и ассоциированные с растениями (*ассоциативная микрофлора*). Последние могут жить как на поверхности растений (*эпифитная микрофлора*), так и проникать в ткани растений (*эндофиты*).

По характеру отношений с растениями выделяют как симбиотические, которые формируют с растением взаимовыгодное сотрудничество, так и фитопатогенные микроорганизмы. На наземной части формируется *филосферная микрофлора*, на корнях - *ризосферная*. В конечном итоге оба типа микрофлоры попадают в почву, хотя микрофлора ризосферы может оказаться более приспособленной к почвенным условиям.

Ризосфера представляет собой узкий участок почвы, прилегающий к корням растения. Сюда растения выделяют множество веществ, выполняющих различные функции - продукты жизнедеятельности, гормоны. Интересна также химическая коммуникация растений с бактериями и грибами, в результате которой растения выделяют вещества-сигналы для бактерий и грибов, которые впоследствии вступают с ними в симбиотические отношения - *экзо-* (на поверхности хозяина) и *эндосимбиоз* (с проникновением внутрь хозяина).

Отдельно стоит упомянуть микрофлору почвенных животных, поскольку своя специфическая микрофлора формируется не только у представителей макро- и мезофауны, но и даже у микроскопических эукариот, например, простейших - таких, как амебы и инфузории. Интересно, что по видовому составу она может существенно отличаться от микрофлоры окружающей почвы. Потенциально микрофлора почвенных эукариот может являться пулом различных патогенных и условно-патогенных для человека форм бактерий, что до сих пор пристально не исследовалось.

По расположению можно выделить микрофлору, формирующуюся на поверхности хозяина и внутри тела, например, в пищеварительном тракте и т.д. По количеству клеток на поверхности растений и животных находится больше микробных клеток, чем клеток хозяина. Это же касается и человека. Внутри тела животного *эндогенная микрофлора* особенно специфична, часто вследствие анаэробных условий и отличий по другим физическим и химическим показателям среды.

В целом, почвенная микрофлора отличается как видовым, так и функциональным разнообразием. Среди важных в функциональном отношении групп стоит отметить участвующие в биогеохимических циклах основных биогенных элементов (углерода, азота, фосфора и серы) и *целлюлолитические микроорганизмы*. Например, *клубеньковые* (образующие симбиоз с растениями) и *свободноживущие азотфиксирующие бактерии* усваивают

молекулярный азот атмосферы и обогащают им почву. В биотехнологии используют как свободноживущие азотфиксирующие бактерии (например, группы *Azotobacter*), так и симбиотические (как представители рода *Rhizobium*).

Для оценки деятельности почвенной микробиоты используют такой показатель, как *биологическая активность почвы*. С этой целью подсчитывают общее количество почвенных микроорганизмов и учитывают их физиологическую активность. Наиболее универсальный показатель деятельности почвенных организмов - продуцирование ими углекислого газа, то есть *дыхание почвы*.

Также определяют активность важных физиологических групп микроорганизмов - целлюлозоразлагающие, *фосфатмобилизирующие*, *сульфатовосстанавливающие* и *железоокисляющие*, а также участвующие в цикле азота - азотфиксирующие, *нитрифицирующие*, *денитрифицирующие* и *аммонифицирующие* микроорганизмы. Существуют различные методы, связанные с культивированием определенных физиологических групп микроорганизмов на селективных средах и выявлением их активности, например по продукции определенных газов.

В биотехнологии также могут использоваться фосфатмобилизирующие, аммонифицирующие и нитрифицирующие бактерии, поскольку они поставляют доступные соединения фосфора и азота растениям. Деятельность денитрификаторов в почве, напротив, подавляют ингибиторами, поскольку она может приводить к потерям азота, который возвращается в атмосферу и становится недоступным большинству организмов.

Наименее изучена деятельность в почве *анаэробных зубактерий*, а также *архебактерий*. Последние были открыты достаточно поздно по сравнению с зубактериями. Анаэробы требуют специальные условия культивирования, что в какой-то степени осложняет работу с ними в лабораторных условиях. Вместе с тем *анаэробные метаногены* имеют серьезный биотехнологический потенциал. Само метановое брожение представляет собой процесс биодеструкции органических веществ с выделением свободного метана, что легло в основу получения *биогаза*. Здесь важными являются оба процесса, поскольку в процессе биодеструкции в анаэробных условиях можно разлагать достаточно токсичные и *рекацитрантные* (сложноразлагаемые) химические соединения. Выделяющийся в значительных количествах метан может быть использован в промышленности. Этот подход используется широко в разных странах, таких как США, Голландия, Израиль и в ряде развивающихся стран. Этот подход имеет существенный потенциал и в России, где агрокомплекс ежегодно производит около 773 миллиона тонн отходов, из которых можно получить 66 миллиардов м³ биогаза, или около 110 миллиардов кВт•ч электроэнергии. Таким образом можно разлагать и высокотоксичные соединения.

Биогаз состоит из метана (до 87%), CO₂ (до 50%) и следов H₂ и H₂S. Одной из разновидностей биогаза является биоводород, где конечным продуктом жизнедеятельности бактерий является не метан, а водород. Способностью образовывать метан обладают около 50 видов архебактерий из 17 родов, относящимся к отделу *Euryarchaeota*. Но в производстве биометана и биоводорода участвуют не только *метаногенные бактерии*.

Стоит отметить, что последнее время широкое распространение получили как современные химические методы, позволяющие определять пути метаболизма соединений, так и молекулярно-биологические методы, которые позволяют выявить генетическую регуляцию микробного метаболизма, а также в целом *генетическое разнообразие почвы*. При этом важен учет микроорганизмов, как продуцирующих важные соединения в почве, так и деструкторов органических соединений природного и неприродного происхождения, а также микроорганизмов, которые принимают участие в биогеохимических циклах всех важнейших элементов в окружающей среде и в почве, в частности.

Между самими микроорганизмами также формируются разные типы взаимодействия: от взаимовыгодных, когда в ассоциации они помогают друг другу - например, в поэтапной переработке и усвоении сложноразлагаемых соединений (как лигнин, хитин и целлюлоза), так и

антагонистические, когда микроорганизмы выделяют в почву вещества, подавляющие развитие других микроорганизмов.

Практическое значение для сельскохозяйственной биотехнологии имеет способность некоторых микроорганизмов оказывать губительное действие на представителей фитопатогенной микрофлоры. Усилить активность желательных микроорганизмов можно путем внесения в почву органического вещества. В этом случае отмечается активное развитие почвенных сапрофитов, которые, в свою очередь, стимулируют развитие микроорганизмов, угнетающих фитопатогенные виды. Для нормального функционирования почвенных организмов необходимы прежде всего энергия и питательные вещества. Для большинства микроорганизмов (в первую очередь, для гетеротрофной микрофлоры) такой источник энергии - органическое вещество почвы. Поэтому активность почвенной микрофлоры главным образом зависит от поступления или наличия в почве органического вещества.

4. Фитосанитарное состояние почвы

Плодородие почвы в значительной степени определяется её фитосанитарным состоянием, т.е. чистотой от сорняков, вредителей, болезнетворных организмов, а также токсических веществ. *Фитотоксичность почвы* может быть обусловлена накоплением физиологически активных веществ, таких как фенольные соединения, органические кислоты, альдегиды, спирты и др. При низких концентрациях фитотоксических веществ в почве может обнаруживаться стимулирующий эффект, но при увеличении их содержания наступает сильное угнетение прорастания семян и роста растений. Так, при многолетнем бессменном возделывании монокультур, например, пшеницы, ячменя и кукурузы, наступает обеднение почвы и угнетение роста корневой системы, что может явиться причиной изреженности бессменных посевов.

Основные источники образования и поступления токсических веществ - корневые выделения растений, растительные остатки и продукты метаболизма некоторых групп микроорганизмов. Наиболее интенсивно фитотоксические вещества накапливаются при возделывании на одном месте однородных или близких культур или при создании в почве анаэробных условий.

Когда в структуре посевных площадей преобладают близкие культуры, например, зерновые, в почву ежегодно поступает сходная по количеству и качеству органическая масса из корневых выделений и растительных остатков. Это приводит к изменению соотношения основных групп внутри микробиоценоза, появлению фитотоксических форм, которые поставляют в почву вредные для культурных растений вещества. Например, при разложении растительных остатков зерновых культур в почве обнаружено повышенное содержание фенольных соединений, которые, находясь в зоне семян растений, ингибируют их прорастание.

Анаэробные условия способствуют образованию токсических веществ, так как при этом корневые выделения и промежуточные продукты минерализации гумуса превращаются в сильно восстановленные соединения, что обуславливает создание очагов токсичности в почве. В зоне корня могут накапливаться микроорганизмы, неблагоприятно действующие на растения.

Фитотоксины почвенных микроорганизмов могут нарушать обмен веществ у растений, оказывать влияние на интенсивность дыхания, а также значительно снижать фотосинтетическую активность растений.

Корни растений выделяют различные аминокислоты, углеводы и другие вещества. Вместе с экссудатами в почву поступает вещества, участвующие в метаболизме высших растений: сахара, гликозиды, органические кислоты, витамины, ферменты, алкалоиды и другие. Все эти вещества могут быть в той или иной мере использованы микроорганизмами в качестве источника питания. Поэтому в зоне корня наблюдается более активное развитие микроорганизмов, чем в целом в почве. Было показано, что в зоне корня присутствуют почти все условно-патогенные бактерии, имеющие медицинское значение [14]. В целом почва является конечным реципиентом всех веществ (в том числе токсичных) и микроорганизмов (в том числе патогенных для животных, человека и растений), циркулирующих в атмосфере и водной среде.

С другой стороны, чувствительные к химическому загрязнению микроорганизмы можно использовать как биоиндикаторы загрязнения почв. Было показано, что при химическом загрязнении из почвы исчезают некоторые гетеротрофные бактерии, обильно представленные в почве в естественных условиях [17]. В *биотестировании* (установлении токсичности среды с помощью *тест-объектов*) часто используют наиболее чувствительные организмы, такие как некоторые водоросли, инфузории и ракообразные. К чувствительным биоиндикаторам также относятся микроорганизмы, мхи, лишайники и моллюски.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое плодородие почвы?
2. Основные физические характеристики почвы, как они связаны с плодородием почвы?
3. Основные химические характеристики почвы, как они связаны с плодородием почвы?
4. Что такое фитосанитарное состояние почвы?
5. Что такое *биоиндикация* и *биотестирование*?
6. Как микроорганизмы влияют на почвенное плодородие?
7. Какие другие биологические факторы плодородия почвы вы знаете?
8. Какие основные биополимеры, поступающие в почву, вы знаете?

II. Основные методы исследования почвы

1. Пробоподготовка и физико-химический анализ почвы

Отбор почвенных образцов

Особенности отбора будут зависеть от конечной цели исследовательской работы. В случае технологического анализа используют принятые государственные стандарты отбора, опубликованные в соответствующих документах, на основании картографических данных. После рекогносцировочного осмотра территории на картографическую основу наносят сетку элементарных участков установленного размера. *Элементарный участок* - это наименьшая площадь, которую можно охарактеризовать одной объединенной пробой почвы. Размеры таких участков регламентированы для разных типов почв и географических локаций. *Точечные пробы* отбирают буром (используется бур тростьевой или аналог), на уплотненных почвах допускается отбор проб лопатой (например, штыковая лопата). Каждую *объединенную пробу* составляют из 20 - 40 точечных, масса объединенной пробы должна быть не менее 400 г. Отобранные объединенные пробы вместе с этикеткой помещают в мешочки (полотняные, полиэтиленовые или бумажные) или картонные коробки, которые маркируют по месту отбора образцов. Для микробиологического анализа рекомендуется использовать стерильные или близкие к таковым материалы, стекло и пластик стерилизуют автоклавированием, металлические - фламбированием или протиранием этанолом, остальные - можно стерилизовать излучением. При невозможности - предпочтительно брать новые, ранее не использованные материалы.

Для анализа естественных, антропогенно не загрязненных местообитаний отбор производится вдали от массовых скоплений людей и транспорта. Для статистической достоверности необходимо проводить анализ при 3 - 5 повторностях контрольных и опытных образцов.

Подготовка образцов почвы

Модельные эксперименты проводят при постоянной температуре и влажности почвенного образца. Мы рекомендуем при работе с образцами, отобранными в наших широтах, проводить инкубацию при температуре + 28°C и влажности, составляющей 50% от полной влагоемкости почвы (ПВ). В этом случае используют не полевую влагоемкость, а влагоемкость, определенную в лабораторных условиях следующим образом: взвешивают стаканчики с влажной почвой, записывают вес и затем высушивают до постоянного веса в сушильном шкафу при 105°. Снова взвешивают и регистрируют показания. ПВ рассчитывают по формуле:

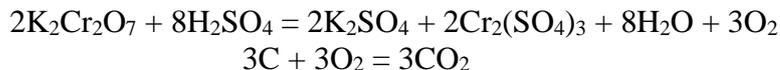
$$ПВ = ((b-c) : (c-a)) \times 100,$$

где, а - масса пустого стаканчика, г; в - масса стаканчика с влажной почвой, г; с - масса стаканчика с абсолютно - сухой почвой.

Определение содержания гумуса в почве

Для определения содержания гумуса используют метод И.В. Тюрина, который основан на окислении органического вещества почвы хромовой кислотой до образования углекислоты. Количество кислорода, израсходованное на окисление органического углерода, определяют по разности между количеством хромовой кислоты, взятой для окисления, и количеством её, оставшимся неизрасходованным после окисления. В качестве окислителя применяют раствор $K_2Cr_2O_7$ в серной кислоте, предварительно разбавленной водой в соотношении 1:1. К навеске

почвы приливают раствор в серной кислоте и кипятят ровно 5 мин. В некоторых модификациях метода реакцию проводят при комнатной температуре в течение суток. Органические вещества, входящие в состав гумуса, окисляются до O_2 и H_2O . В качестве катализатора реакции используют Ag_2SO_4 . Реакция протекает следующим образом:



По количеству израсходованного окислителя рассчитывают содержание в почве гумуса.

Определение рН почвы и содержания в ней элементов

Для получения сопоставимых значений используют малые навески почвы и буферные растворы. Наиболее удобным способом является использование мульти-тест электрометра ИПЛ201 (или любого аналога) при измерении в водной почвенной вытяжке, таким образом удобно определять рН и формы N в почве. С этой целью стандартную навеску почвы помещают в колбу и заливают стерильной водой определённого объема, перемешивают в течение 1,5 ч и оставляют до суток. Затем производят расчет на г (иногда на 100 г) сухой почвы.

При определении содержания фосфора в почве существует ряд сложностей, что связано с отсутствием единой шкалы и единых методов для разных типов почв. В почвах присутствуют различные фосфорсодержащие минералы и соединения: гидроксил- и фторапатит, фосфаты, органические соединения и сложные соединения, которые образовались при сорбции фосфатов почвенными коллоидами. Некоторые из них отличаются низкой водорастворимостью и биодоступностью для растений. Для определения используют вытяжки в растворах сильных минеральных или органических кислот, иногда щелочные и водные вытяжки. В целом существуют методы весового, объемного, колориметрического и нефелометрического анализа. Для определения группового состава фосфатов в почве применяют фракционный анализ: навески одной и той же почвы обрабатывают различными растворителями.

Определение валового содержания фосфора в почве проводят методом К.Е. Гинзбург: навеску почвы 0.5 г помещают в жаростойкие плоскодонные колбы на 100 и добавляют несколько капель дистиллированной воды для смачивания. Затем добавляют 8 мл конц. H_2SO_4 и 0.5 мл 50 %-ной $HClO_4$. Закрывают колбы воронками и оставляют до обугливания (минимально 30 мин). Далее нагревают до полного обесцвечивания раствора и переносят в мерные колбы на 100 мл, доводят до метки и перемешивают. После этого оставляют до полного оседания. Затем 10 мл раствора переносят в мерные колбы и осаждают железо по Уоррен и Пью. После этого фильтрат используют для колориметрического определения фосфора.

Подвижные формы фосфора и калия определяют методом Эгнера-Рима (ДЛ-метод), который основан на извлечении фосфора и калия из почвы раствором молочнокислого кальция, забуференным раствором соляной кислоты до рН 3.5 при отношении почвы к раствору 1:50. Фосфор традиционно определяется на фотоэлектроколориметре как синий фосфорно-молибденовый комплекс, калий на пламенном фотометре (соответствует ГОСТ 26209-91).

2. Биологический анализ почвы

Биологическая активность почвы в первую очередь связана с состоянием микробного сообщества и может характеризоваться как количественным и качественным составом *микробиоценоза*, так и интенсивностью биохимических процессов, протекающих в почве за счет,

в основном, микробных ферментов. Высокая биологическая активность нежелательна в зонах с усиленными минерализационными процессами, и наоборот. Поэтому контроль биологической активности в *агроценозах* необходим при управлении их продуктивностью. Понятно, что при окультуривании почвы биологическая активность может существенно меняться.

Базальное и субстрат-индуцированное дыхание почвы

Для определения *биологической активности* используют такой показатель, как *базальное дыхание почвы* (БД), которое определяется по объему выделения CO_2 при измерении на газовом хроматографе с детектором электронного захвата. Измерения производятся до и после инкубации почвенных образцов в течение суток при 28°C . Таким образом можно измерить активность организмов, способных осуществлять аэробное дыхание [12].

Широко используется такой показатель, как *субстрат-индуцированное дыхание*, которое также способно дать оценку *углерода микробной биомассы* $\text{С}_{\text{мик}}$ [12, 13]. Глюкозу в концентрации 5 мг/кг добавляют в почву сразу после измерения БД, после чего инкубируют 3 ч при 22°C . *Микробный метаболический коэффициент* $q\text{CO}_2$ рассчитывают как отношение скорости БД к $\text{С}_{\text{мик}}$ [13]. Нами было показано, что эти показатели могут успешно использоваться для оценки антропогенного воздействия на почву и наличия в ней токсических веществ, способных ингибировать микробную активность [1].

Для анализа *гетеротрофных бактерий* проводят посев почвенной суспензии на глюкозопептонную среду с дрожжевым экстрактом после инкубации в динамике [17]. Состав среды следующий (г/л): пептон - 1.0, дрожжевой экстракт - 1.0, K_2HPO_4 - 1.0, глюкоза - 1.0 (рН 6.8 - 7.0). Среди гетеротрофных бактерий значительный биотехнологический потенциал имеют представители родов *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Для выделения аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов используют *поверхностный посев* на чашки Петри, при выделении *микроаэрофильных* и *анаэробных* - *глубинный посев*. С этой целью после посева чашку заливают слоем 1,5 - 2 см расплавленного и предварительно охлажденного до 45° агар-агара. Для культивирования анаэробов удобным является использование специальных коммерческих систем культивирования с поддержанием определенной атмосферы или, наиболее просто, газ-пакетов.

Выделение *грибов* и *актиномицетов* проводят на КА среде (г/л): крахмал (растворимый) - 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2.0, K_2HPO_4 - 1.0, MgSO_4 - 1.0, CaCO_3 - 1.0 [9].

Для выделения и культивирования *сульфатредуцирующих бактерий* используют среду следующего состава (г/л): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2.0, Na_2SO_4 - 2.4, NH_4Cl - 1.0, K_2HPO_4 - 5.0, CaCl_2 - 0.1, соль Мора - 0.5, лактат натрия - 10.0, раствор микроэлементов - 1мл [9].

Для выявления *амилолитической активности* используют питательную среду (г/л): пептон - 10.0, KH_2PO_4 - 5.0, растворимый крахмал - 2.0, агар - 15.0, рН среды 6,8 - 7,0. Среду стерилизуют при 1 атм и разливают в стерильные чашки Петри. Когда среда застынет исследуемые бактерии высевают по диаметру чашки или уколком. Продолжительность культивирования составляет от двух до десяти суток. Гидролиз крахмала обнаруживают после обработки раствором Люголя (йод кристаллический - 1 г, калий йодистый - 2 г, вода дистиллированная - 300 мл) [9].

Для выделения и культивирования *микроорганизмов, разлагающих целлюлозу*, культуры засевают «медальонами» на поверхность минимальной глюкозо-солевой среды, содержащей 0,2% растворимой целлюлозы. После 48 часов инкубирования при 28°C чашки Петри со средой заливают 3 - 4 мл 0,1% раствора Конго красного и выдерживают около 30 мин. После этого краситель сливают, а среду промывают 8% раствором NaCl . Наличие светлых неокрашенных пятен в месте роста и вокруг «медальонов» бактерий свидетельствует о продукции ими

целлюлолитических ферментов. Предпочтительным является использование среды Гетчинсона без дополнительных источников углерода. Используют как целлюлозу, так и фильтровальную бумагу, последнюю можно также использовать в виде дисков.

Для выявления *пектолитической активности* исследуемые бактериальные культуры засевают «медальонами» на поверхность полноценной питательной агаризованной среды, содержащей ионы Ca^{2+} , с нанесенным на нее полипектатным гелем. После инкубирования в течение 24 часов при 28°C продукцию пектолитических ферментов регистрируют по образованию лунок на поверхности полипектатного геля.

Протеолитическая активность микробов направлена на расщепление белков до промежуточных (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или конечных (сероводород, индол, аммиак) продуктов. Исследования проводят на средах с желатином, молоком, сывороткой, пептоном. *Тест на желатиназу*: культуру микроорганизмов засевают уколом в столбик питательного бульона, содержащего 12% желатины. Посевы выдерживают при комнатной температуре ($20 - 22^\circ\text{C}$) в течение 5 - 7 дней, при этом регистрируют не только наличие разжижения, но и его характер. Разжижение может быть послойным, что свойственно бактериям рода *Pseudomonas*; холерный вибрион разжижает желатину в виде гвоздя; стафилококки - в виде чулка. Рост бацилл напоминает елочку, перевернутую вершиной вниз, характер разжижения в этом случае послойный.

Сероводород, как, например, конечный продукт расщепления таких аминокислот, как цистин, цистеин и метионин, можно определять следующим способом: петлю исследуемой культуры микробов засевают в пробирку с мясопептонным бульоном. Сероводород обнаруживают с помощью полоски фильтровальной бумаги, пропитанной раствором ацетата свинца, которую закрепляют между стенкой пробирки и пробкой. При взаимодействии сероводорода и ацетата свинца бумага чернеет в результате образования сульфида свинца.

Цикл азота: денитрификация, нитрификация, аммонификация и азотфиксация в почвах

Уровень активности денитрификаторов и нитрификаторов в почве можно измерить общедоступными химическими методами, а разнообразие участвующей в этих процессах микрофлоры культуральными и молекулярно-биологическими методами. *Эмиссию N_2O* измеряют на газовом хроматографе с детектором электронного захвата после инкубации почвенных образцов в течение суток при 28°C . Содержание водорастворимых форм азота измеряют с помощью мультитест-электрометра, как описано выше.

Нитрифицирующих бактерий выделяют на минеральной среде следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 2.0$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1.0$, $\text{MgSO}_4 - 0.5$, $\text{FeSO}_4 - 0.1$, $\text{CaCO}_3 - 5.0$, $\text{NaCl} - 0.4$ [9].

Для выявления *аммонифицирующих бактерий* в почве [9] используют мясопептонный бульон (МПБ) или мясопептонный агар (МПА). Накопительную культуру аммонификаторов можно получить, засевая комочками почвы пептонную воду или МПБ в пробирках или колбах. Пробирки закрывают ватными пробками и под них подвешивают влажную красную лакмусовую бумажку для обнаружения аммиака.

Для обнаружения *денитрифицирующих микроорганизмов* используют метод накопительной культуры на среде Гильтая. Готовят два раствора: 1) $\text{KN}_3 - 2.0$, аспарагин - 1.0 г, дистиллированная вода - 250 мл; 2) натрий лимоннокислый - 2.5 г, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 2$ г, $\text{CaCl}_2 - 0.2$ г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 2$ г, $\text{FeCl}_3 -$ следы, дистиллированная вода - 500 мл. Оба раствора сливают и доводят объем среды до 1000 мл. Устанавливают рН 7 по индикатору бромтимоловому синему, который добавляют в среду. Цвет среды должен быть зеленый. Среду разливают в пробирки, стерилизуют, затем засевают комочками почвы. Инкубация продолжается 5 - 7 дней в термостате при $25 - 30^\circ$. Об идущем процессе восстановления нитратов и образовании азота свидетельствуют посинение

среды, появление пузырьков газа и пены на поверхности среды. Среда в пробирках мутнеет от развивающихся в ней бактерий.

Уровень *азотфиксации* в почве измеряют на газовом хроматографе общепринятым ацетиленовым методом [9]. *Нитрогеназа* азотфиксирующих микроорганизмов способна восстанавливать ацетилен (C_2H_2) до этилена (C_2H_4). С этой целью образцы инкубируют в ацетилен-воздушной атмосфере. ацетилен вводят в воздушное пространство в количестве 10% от объема сосуда. Можно также проводить *определения азота по Кьельдалю* и масс-спектрометрически, но эти методы менее чувствительны. Метод можно использовать и для измерения азотфиксации в почвах и в микробных культурах. Для анализа азотфиксирующей микрофлоры используют среду Эшби (г/л): K_2HPO_4 - 0.2, $MgSO_4$ - 0.2, $NaCl$ - 0.2, K_2SO_4 - 0.1, $CaCO_3$ - 5.0, маннит - 20.0 [9].

Фитостимуляция и фитотоксичность

Фитостимулирующую активность имеют микроорганизмы, способные к синтезу растительных гормонов, таких как *ауксины* - производные индола [16]. Для определения количества индолил-3-уксусной кислоты используют D, L-триптофан в качестве прекурсора ИУК в концентрации 0,05%. Во флакон вносят 10 мл раствора триптофана и 40 мл жидкой среды для последующего культивирования микроорганизмов [7]. Полученную суспензию разливают по 1 мл в микропробирки, куда вносят 1 петлю исследуемого штамма, взятого с твердой среды. Культивирование осуществляли в течение трёх суток в стационарном режиме при температуре 28°C. Для определения содержания ИУК в культуральной жидкости используют колориметрический метод с применением реактива Сальковского: помещают в стерильную пробирку 0,5 мл надосадочного бактериального материала и 0,5 мл реактива Сальковского. Выросшие культуры центрифугируют в течение 10 мин при 13000 об/мин. Через 30 мин у активных штаммов появляется розовое окрашивание, что говорит о содержании ИУК.

Ростостимулирующую активность бактерий проверяют при проращивании обработанных бактериальными суспензиями семян. Используют бактериальные суспензии в концентрации 10^6 - 10^8 КОЕ/мл. С этой целью проводят раститровку исследуемых культур. Культуры инкубируют в течение 3 суток на предпочитаемой ими питательной среде, производят подсчет выросших колоний. Титр вычисляют по формуле:

$$T = (a \cdot 10^n) : V,$$

где T - количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 мл; a - среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения; V - объем суспензии, взятый для посева; 10^n - коэффициент разведения [5]. О действии исследуемых культур судят по всхожести семян, измеряя длину побега и корня и сравнивая с контролем.

Методом проростков определяют также уровень *фитотоксичности почвы*. Для обработки служит почвенная суспензия (водная почвенная вытяжка), при этом фиксируют ингибирование прорастания.

С целью *биотестирования* могут также использоваться чувствительные к химическому загрязнению организмы, например водоросли и дафнии. Соответствующие методы и *тест-объекты* патентуются и используются для *экотоксикологической* оценки почв и других субстратов. Нами также было показано, что чувствительные гетеротрофные бактерии могут использоваться как *индикаторы химического загрязнения* [17]. Химическое загрязнение почвы также сказывается на показателях физиологической активности [1] - уровне дыхания и

азотфиксации. Удобным показателем антропогенной нагрузки является *Микробный метаболический коэффициент* [1].

Почвенные бактерии также способны подавлять рост фитопатогенных микроорганизмов [18], что является важным свойством при отборе *биотехнологически ценных культур*. Для определения *фунгицидной активности* исследуемых штаммов бактерий используют посев методом «колодцев» [23]. Суспензии конидий фитопатогенных грибов вносят в расплавленный и остуженный до 37 - 40 °С картофельно-сахарозный агар (КСА). Соотношение объема суспензии к объему среды определяют после прямого подсчета клеток в камере Горяева. Среду с грибными суспензиями перемешивают и разливают в чашки Петри. После застывания в каждой чашке фламбированным пробочным сверлом проделывают по 4 колодца диаметром 10 мм. Затем 100 мкл бактериальной суспензии в концентрации до 10⁸ кл/мл вносят в приготовленные колодцы. Инкубация происходит в течение необходимого для грибов времени (культуры могут отличаться по этому показателю) от 3 до 14 дней. Антагонистический эффект проявляется в угнетении роста грибных колоний и развития мицелия. Фунгицидную активность штаммов бактерий определяют как радиус зоны ингибирования роста патогенных грибов вокруг колодцев.

Анализ *бактерицидной активности* исследуемых штаммов проводят с помощью метода «агаровых блоков». В качестве тест-объектов используют штаммы бактерий, являющихся патогенами растений. Штаммы высевают сплошным газоном на твердую среду и выращивают в течение суток при температуре 28°С. Из каждой чашки Петри стерильным пробочным сверлом вырезают агаровые блоки диаметром 10 мм. Тестируемые культуры патогенных микроорганизмов высевают сплошным газоном на чашки Петри с картофельным агаром. Сверху на каждую чашку Петри раскладывают по 4 блока с проверяемыми культурами. Инкубацию проводят при температуре 28°С, в течение 4 суток. Присутствие *антагонистической активности* определяют по наличию *зон ингибирования* роста фитопатогенных бактерий вокруг агаровых блоков. Радиусы зон подавления также измеряют и сводят в таблицу.

В целом, в почве насчитывается более 100000 видов микроорганизмов [20], из них в настоящее время в биотехнологии используют чуть более 100, поэтому потенциал для промышленности у почвенной микрофлоры огромен и требует дальнейшего изучения. Для оценки функционального разнообразия культивируемых форм микроорганизмов мы рекомендуем использование трехмерных диаграмм, которые позволяют сравнить активность сразу нескольких функциональных групп [1]. Этот же подход эффективен для оценки влияния антропогенной нагрузки на функциональную активность микробиоты [1].

В биологии почв для оценки биоразнообразия и влияния на него различных факторов могут быть успешно использованы традиционные для общей экологии подходы. Для оценки общего видового разнообразия культивируемой микрофлоры почвы мы использовали методы ранжированных кривых доминирования-разнообразия, индексы видового богатства и выравненности, а также индексы разнообразия [17].

3. Молекулярный анализ почвенной микробиоты

Последние десятилетия всё большее значение приобретают современные молекулярно-биологические методы исследования почвы, базирующиеся на анализе последовательностей ДНК или РНК, а также белков, липидов, углеводов и метаболитов. Эти методы являются высокоинформативными, высокотехнологичными, но часто более дорогостоящими и менее доступными для исследователя. Наиболее доступные из них основаны на *ПЦР-детекции* или *идентификации микроорганизмов*. С целью идентификации биотехнологических штаммов

можно использовать стандартный метод, основанный на определении последовательностей генов, кодирующих рибосомальные РНК [22], 16S рРНК для бактерий и 18S рРНК для грибов.

В последние десятилетия установлено, что значительная часть представителей естественных микробных сообществ не культивируются в лабораторных условиях [15, 20]. По некоторым данным, всего лишь 1 % видов, обнаруживаемых в образце из окружающей среды, принадлежат к числу культивируемых [20]. Молекулярные методы, базирующиеся на анализе последовательностей ДНК или РНК, позволяют, с одной стороны, выявлять и идентифицировать микроорганизмы из естественных природных источников вне зависимости от их культивируемости в лабораторных условиях, а, с другой стороны, выделять определенные физиологические или филогенетические группы из всего представленного многообразия микроорганизмов.

Исследования показали принципиальную возможность использования метода *in situ* гибридизации с целью изучения сообщества почвенных бактерий [11, 15]. Нами также была показана возможность применения метода *in situ* гибридизации с целью обнаружения в почве микрофлоры, трансформирующей ксенобиотики [4]. При данном подходе разрабатываются зонды, комплементарные участкам целевых генов, в нашем случае это были гены, ответственные за разложение гербицидов. После этого отрабатывается методика обработки образцов зондами, например, можно использовать мембраны или предметные стекла, инкубированные в почве. Присутствие целевых генов и целевой группы микроорганизмов фиксируются по флуоресцентному сигналу, подаваемому зондом после соединения с комплементарной последовательностью ДНК.

В последние годы развитие получил подход *метагеномики* для исследования почвенных сообществ. *Метагеном* почвы представляет собой совокупность геномов всех микроорганизмов почвы, поэтому первым этапом *метагеномного анализа* является выделение *тотальной ДНК* из почвенного образца - как культивируемых, так и некультивируемых в лабораторных условиях организмов. На следующем этапе используют методы *секвенирования нового поколения* (NGS). В метагеномике (ввиду огромного количества информации) для определения состава микробного сообщества обычно используют не целые геномы, а эволюционно консервативные гены, такие как 16S рРНК. На сегодняшний день есть несколько сотен метагеномных проектов, среди которых есть посвященные анализу почвы и экосистем, например, Earth Microbiome Project (EMP).

Интересно, что в почве выделяют и внеклеточную ДНК [21], которая может сорбироваться, например, на глинистых материалах или связываться с органическим веществом почвы [8]. Бактерии, широко представленные в почве, также могут выделять внеклеточную ДНК [8], это может играть значительную роль в межвидовых взаимодействиях. Накопление внеклеточной ДНК делает гумусовый горизонт зоной активной концентрации генетической информации [8]. Это было показано при применении *денатурирующего градиентного гель-электрофореза* [10]. ДГГЭ представляет собой вариант метода электрофореза в агарозном геле, используемый для разделения сходных по размерам фрагментов ДНК. При этом в геле создается градиент денатурирующих ДНК условий (обычно с помощью градиента концентрации формамида или мочевины). При проведении электрофореза в таких условиях фрагменты ДНК частично или полностью денатурируют, что изменяет их электрофоретическую подвижность. Это позволяет разделять молекулы нуклеиновых кислот с идентичной длиной, отличающиеся только одним основанием.

Таким образом, развитие новых методов почвенного анализа приводит к получению значительных объемов новой информации, которая аккумулируется биотехнологическими базами (например, геномными и метагеномными) и для дальнейшей обработки и анализа требует развития подходов *биоинформатики* - разрабатываются пакеты программ и пайплайны на их

основе для работы с геномами, метаболомами, а также для метагеномного анализа. Например, известно, что в одном грамме почвы, используемой для выращивания растений, содержится от 10^9 - 10^{10} микробных клеток [19]. Сбор, курирование и извлечение полезной биологической информации из наборов данных такого размера представляют из себя сложные вычислительные задачи. На основе данных, полученных с помощью метагеномного анализа, можно выявить свойства микроорганизмов, относящихся к некультивируемым таксонам, понять их роль в круговороте веществ, а также их взаимоотношения с растениями.

Вопросы для самоконтроля

1. Как осуществляется пробоподготовка почвы?
2. Как проводят физико-химический анализ почвы?
3. Как определяется *Биологическая активность почвы*?
4. Какие основные физиологические группы микроорганизмов исследуют в почве и как? Какую роль они играют в биогеохимических циклах основных биогенных элементов в биосфере?
5. Как определяется *фитостимуляция и фитотоксичность*?
6. Какие основные методы молекулярного анализа почвы вы знаете?
7. Что такое *микробиом* и *метагеном* почвы?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сельскохозяйственная биотехнология рассматривает плодородие как одно из важнейших условий увеличения продуктивности земледелия. С точки зрения фундаментальной науки, плодородие – это результат почвообразовательного процесса и одно из основных свойств почвы. Всякая почва всегда обладает потенциальным плодородием, при этом плодородие почв непрерывно изменяется, т.е. имеет динамику. Поэтому изучение факторов, влияющих на плодородие, имеет как практический, так и научный интерес. Наибольший практический потенциал для биотехнологии имеют почвенные бактерии, способные осуществлять разнообразный спектр химических превращений химических соединений. Считается, что можно выделить бактерии, способные утилизировать любое химическое соединение как природного, так и синтетического происхождения. Также они способны к синтезу биологически активных соединений различного назначения, а также к продукции биогаза и белка одноклеточных. Микроорганизмы, участвующие в биогеохимических циклах основных химических элементов в биосфере, могут успешно использоваться в повышении плодородия.

Список литературы

1. Ваккеров-Коузова, Н. Д. Влияние ксенобиотиков на микробиологические и агрохимические показатели дерново-подзолистой почвы // Почвоведение. 2010, № 8, с. 1–5.
2. Дояренко, А.Г. Факторы жизни растений. - М., 1966.
3. Захаров, С.А. Курс почвоведения. - М: Госиздат, 1927.
4. Конева, Н.Д. Характеристика и выделение *in situ* бактерий, трансформирующих атразин // Микробиология. 2004, т 73, № 4, с. 1–5.
5. Маслиенко, Л.В., Курилова, Д.А., Асатурова, А.М., Шипиевская, Е.Ю. Влияние лабораторных образцов биопрепаратов на основе перспективных штаммов антагонистов фитопатогенов на проростки сои // Масличные культуры: Науч.-техн. бюл. ВНИИ маслич. культур. – Краснодар, 2010. - № 1, с. 104-108.
6. Мешков, И.В. Влияние углубления и окультуривания пахотного слоя на распределение микроорганизмов в профиле дерново-подзолистых почв /И.В. Мешков, Р.Н. Ходакова// Труды Почвенного института им. В.В. Докучаева. - М., 1956. Вып. 19. - С. 20-22.
7. Шеховцова, Н.В., Маракаев, О.А., Первушина, К.А., Холмогоров, С.В., Цапляева, К.Г. Образование ауксинов эндофитными бактериями подземных органов *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (*Orchidaceae*) // Вестн. ОГУ, 2011. – № 12. С. 361–363.
8. Основные достижения и перспективы почвенной метагеномики. Под ред. Першиной, Е.В., Кутовой, О.В., Когута, Б.М., Андропова, Е.Е. – СПб: Информнавигатор, 2017.
9. Практикум по микробиологии. Под ред. Теппер, Е.З., Шильниковой, Е.К., Переверзевой, Г.И.- 4-е изд. перераб. - М.: Колос, 1993.
10. Agnelli, A., Ascherb, J., Cortia, G., Ceccherini, M.T., Nannipieri, P., Pietramellara, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA // Soil Biol Biochem. 2004. V. 36, p. 859-868.
11. Amann, R.I. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology // Molecular Ecol. 1995. V. 4. P. 543-554.
12. Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils // Soil Biol. Biochem. 1978. № 10. P. 215–221.
13. Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. Application of eco-physiological quotients (qCO₂ and qD) on microbial biomass from soil of different cropping histories // Soil Biol. Biochem. 1990. № 22. P. 251–255.
14. Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. Environ. Microbiol. V. 7, № 11, p. 1673–1685.
15. Brock, T.D. The study of microorganisms *in situ*: Progress and problems // Symposia of the Society for General Microbiology. 1987. V. 41. P. 1-17.
16. Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J. H., Chang, W.-S., Park, Y.-J., Senthilkumar, P., Choi, K.-M., Lee, J.-H., Oh, B.-T. Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus stratosphericus* strains against bacterial pathogens acting through both induced plant resistance and direct antagonism // FEMS Microbiology Letters. 2017. V. 364, № 23. P. 1-8.
17. Koneva, N. D., Kruglov, Yu. V. The Dynamics of the Size and Structure of the Soil Bacterial Complex in the Presence of Azobenzene // Microbiologiya. 2001. Vol. 70, № 4, pp. 480–483.
18. Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria // World journal of microbiology and biotechnology. 2017. V. 33, № 11, P. 197-213.

19. Vogel, T.M., Simonet, P., Jansson, J.K., Hirsch, P.R., Tiedje, J.M. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome // *Nature Reviews Microbiology*. 2009. V. 7, № 4, pp. 252–252.
20. Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. № 566 p. 782–787.
21. Wackernagel, A. The various sources and the fate of n acids in soil // Nannipieri, P., Smalla, K. (eds.) *Nucleic acids and proteins in soil*. - Berlin: Springer, 2006.
22. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991. V. 173, № 2, p. 697-703.
23. Winding, A., Binnerup, S. J., Pritchard, H. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi // *FEMS Microbiology Ecology*. 2004. V. 47, № 2, p. 129–141.



Миссия университета – открывать возможности для гармоничного развития конкурентоспособной личности и вдохновлять на решение глобальных задач.

Пастухова Наталия Данииловна

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ И
ЕЕ ПЛОДОРОДИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ
учебное пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО Н. Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверский пр., 49