

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

К.Ш. Казеев
С.И. Колесников
В.Ф. Вальков

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
И ИНДИКАЦИЯ ПОЧВ:
МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ростов-на-Дону
Издательство РГУ
2003

УДК 631.4:577.4:502.7
ББК 40.3
К60

Рецензент:
доктор биологических наук, профессор О.С. Безуглова

Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований. Ростов н/Д: Изд-во РГУ, 2003. 216 с.

ISBN

В работе представлены методология биодиагностики состояния почв. Дана характеристика, оценка и область применения конкретных методов. Проведен сравнительный анализ используемых показателей и выявлены наиболее информативные. Предложен метод интегральной оценки эколого-биологического состояния почвы. Определены перспективы его использования.

Работа адресована студентам, аспирантам и специалистам в области почвоведения, экологии, охраны окружающей среды.

Kazeev K., Kolesnikov S., Valkov V. Biological diagnostic and indication of soils: the methodology and methods of researches.

In work the biodiagnostic methodology of a status of soils represented. The performance, evaluation and area of application of concrete methods is given. The comparative analysis of used parameters is made and most informative are revealed. The method of an integrated evaluation of a ecological and biological status of soil is offered. The perspectives of its use are determined.

The work is addressed to the students, post-graduate students and experts in area of soil science, ecology, protection of an environment.

ISBN

УДК 631.4:577.4:502.7
ББК 40.3

© Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф., 2003

Подготовка и публикация издания выполнены при финансовой поддержке ФЦП «Интеграция».

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ	10
1.1. Биомониторинг почв: современное состояние, проблемы, перспективы	10
1.2. Биологические свойства почвы	13
1.2.1. Фауна почв.....	16
1.2.2. Микробиологическая активность почв	17
1.2.3. Ферментативная активность почв.....	21
1.2.4. Гумусное состояние.....	24
1.3. Основные принципы методологии исследования и оценки эколого-биологического состояния почв	25
1.3.1. Комплексный подход	26
1.3.2. Выбор наиболее информативных показателей	27
1.3.3. Определение интегрального показателя биологической активности почвы	29
1.3.4. Профильно-генетический метод	30
1.3.5. Сравнительно-географический анализ.....	31
1.3.6. Учет пространственной и временной вариабельности.....	31
1.3.7. Единообразие методики и методов исследования	32
1.4. Основные методы определения экологических и биологических свойств почвы	32
1.5. Методика проведения лабораторных и полевых модельных исследований	35
1.6. Прогнозирование экологических последствий антропогенных воздействий	36
1.7. Нормирование антропогенной нагрузки по степени нарушения экологических функций почвы.....	37
1.8. Оценка применимости различных показателей биологического состояния в мониторинге и диагностике почв	40
ГЛАВА 2. ПОЛЕВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВ.....	46
2.1. Типы почвенных разрезов	46
2.2. Заложение почвенных разрезов	47
2.3. Описание почвенных разрезов.....	48
2.4. Морфологические признаки почв.....	50
2.5. Полевые анализы.....	62
2.6. Отбор почвенных образцов	63

ГЛАВА 3. ГЕОБОТАНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	65
3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСТЕНИЙ	66
3.2. УЧЕТ ЗАПАСОВ НАДЗЕМНОЙ И ПОДЗЕМНОЙ БИОМАССЫ	66
3.3. ЭКОЛОГО-ФЛОРИСТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ (СИСТЕМА БРАУН-БЛАНКЕ)	67
3.4. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ШКАЛЫ Л.Г. РАМЕНСКОГО	70
ГЛАВА 4. ЗООЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
ПОЧВ	77
4.1. УЧЕТ КРУПНЫХ ПОЧВЕННЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ.....	77
4.2. УЧЕТ МЕЛКИХ ПОЧВЕННЫХ ЧЛЕНИСТОНОГИХ	80
4.3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ ПОЧВЕННО-ЗООЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	82
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ	84
5.1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	84
5.1.1. Отбор почвенных образцов для микробиологических и биохимических исследований.....	84
5.1.2. Подготовка почвенных образцов для микробиологических исследований	85
5.2. ИЗУЧЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДАМИ ПРЯМОЙ МИКРОСКОПИИ	86
5.2.1. Метод Виноградского	87
5.2.2. Люминесцентный метод	88
5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ПОСЕВА НА ПЛОТНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	90
5.3.1. Приготовление сред.....	91
5.3.2. Подготовка посуды и материалов для микробиологического посева	93
5.3.3. Учет численности микроорганизмов.....	97
5.3.4. Определение численности почвенных микроорганизмов методом комочков обрастания	98
5.3.5. Методы расчета количества микроорганизмов и их биомассы в почве	99
5.3.6. Соотношение между показателями численности бактерий в почве по данным микроскопии и посева.....	100
5.4. ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	100
5.4.1. Исследование бактерий.....	100
5.4.2. Исследование актиномицетов	110
5.4.3. Исследование микроскопических грибов	113

5.4.4. Исследование дрожжей	125
5.4.5. Почвенные водоросли	128
5.5. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАССЫ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВЕ ..	134
5.5.1. Регидратационный метод определения биомассы микроорганизмов	134
5.5.2. Измерение микробной биомассы методом фумигации- экстракции	137
5.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ	140
5.6.1. Показатели структуры микробных сообществ по данным метода посева	140
5.6.2. Метод определения структуры комплекса почвенных грибов и актиномицетов по радиальной скорости роста .	142
5.7. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИИ	143
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ	
ПОЧВЫ	147
6.1. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ	147
6.1.1. Каталаза	147
6.1.2. Дегидрогеназы	149
6.1.3. Ферриредуктазы	151
6.1.4. Пероксидазы	152
6.1.5. Полифенолоксидазы	153
6.1.6. Аскорбатоксидаза	154
6.1.7. Инвертаза	155
6.1.8. α - и β - Амилазы	157
6.1.9. Протеазы	158
6.1.10. Уреаза	159
6.1.11. Фосфогидролазы	160
6.1.12. Фосфатаза	161
6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ «ДЫХАНИЯ» ПОЧВЫ	162
6.2.1. Определение «дыхания» почвы в лаборатории по Галстяну	162
6.2.2. Определение «дыхания» почвы в полевых условиях по Карпачевскому, Киселевой	164
6.2.3. Определение интенсивности дыхания микробной биомассы по Роуэллу	164
6.3. АПЛИКАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ	166
6.3.1. Определение целлюлозолитической активности почвы ..	167
6.3.2. Определение интенсивности накопления свободных аминокислот	167
6.3.3. Определение протеазной активности методом фотобумажной автографии	168

6.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ	169
6.5. СКОРОСТЬ РАЗЛОЖЕНИЯ МОЧЕВИНЫ ПО АРИСТОВСКОЙ, ЧУГУНОВОЙ.....	169
6.6. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВЫ.....	170
ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМУСОВОГО СОСТОЯНИЯ	
ПОЧВ	173
7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГУМУСА ПО МЕТОДУ ТЮРИНА В МОДИФИКАЦИИ НИКИТИНА	175
7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУППОВОГО ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ГУМУСА ПО ТЮРИНУ В МОДИФИКАЦИИ ПОНОМАРЕВОЙ И ПЛОТНИКОВОЙ ...	177
7.3. УСКОРЕННЫЙ ПИРОФОСФАТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА ГУМУСА ПО КОНОНОВОЙ И БЕЛЬЧИКОВОЙ	184
7.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ В ПОЧВАХ ПО МЕТОДУ ДЮБУА	186
ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ ЩЕЛОЧНО-КИСЛОТНЫХ И	
ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ	
ПОЧВЫ	187
8.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ЩЕЛОЧНО-КИСЛОТНЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ	187
8.1.1. Определение кислотности (рН) почв потенциометрическим методом	187
8.1.2. Оценка величины рН	189
8.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ	190
8.2.1. Определение окислительно-восстановительного потенциала (Eh) потенциометрическим методом	191
8.2.2. Оценка величины Eh	192
ГЛАВА 9. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ	194
Приложения	197
Приложение 1. Инструкция по определению биологических свойств почв	197
Подготовительный период	197
Полевой период.....	198
Камеральный период	199
Приложение 2. Некоторые коэффициенты — показатели биологических процессов в почве	201
Приложение 3. Шкалы для оценки биологической активности почвы	203
ЛИТЕРАТУРА.....	205

ВВЕДЕНИЕ

Биомониторинг, биодиагностика и биоиндикация почв приобретает все большее значение, как для проведения научных исследований, так и для выполнения практических производственных мероприятий. Методы почвенной микробиологии, биохимии и зоологии применяются для характеристики биологического состояния почв и его изменений под действием различных антропогенных факторов. Эти методы широко используются специалистами в области экологии, почвоведения, охраны окружающей среды и т.д.

В руководстве нет возможности дать готовые правила, в каком случае следует применять те или другие методы. Выбор должен сделать сам исследователь, причем это ответственная и часто трудная задача. От правильного ее решения зависит успех всей работы.

Обычно перед исследователем стоит проблема подбора методов для выполнения своей конкретной работы. При этом он сталкивается с противоречием: с одной стороны, возникает желание определить как можно больший набор показателей, с другой стороны, существуют ограничения, связанные с финансированием, приборным оснащением, доступностью химреактивов, физическими затратами труда и т.д., и т.п.

В связи с этим при планировании исследований по биомониторингу и биодиагностике (впрочем, как и любых других) необходимо правильно оценивать свои силы и средства. Следует придерживаться принципов «лучше меньше да лучше» и «лучшее враг хорошего».

Не обязательно стремиться к выполнению как можно большего набора показателей. Авторам неоднократно приходилось встречать работы с огромным количеством данных (полученных с использованием разнообразных методов) плохо сведенных между собой, с нечеткими или общеизвестными выводами. Получить необходимые результаты и сделать значимые выводы, можно используя зачастую лишь 2-3 показателя. Это возможно благодаря тому, что многие биологические показатели связаны между собой.

В то же время, в почвенной биологии и биохимии несмотря на длительные поиски до сих пор не найдено какого-либо одного показателя, исследуя который можно было бы делать вывод о биологическом состоянии почвы в целом.

Большая сложность в использовании большинства биологических показателей связана с их значительной пространственной и временной изменчивостью. Многие исследователи биологических параметров почв сталкивались с проблемой, когда выводы, следующие по данным, полученным в разные годы (сезоны, месяцы и даже дни) противоречили друг

другу. Значительное варьирование биологических показателей требует большого числа повторностей, как полевых, так и аналитических.

В первой главе изложена методология исследования биологических свойств почв и возможности применения различных методов в диагностике и индикации состояния почв и экосистем в целом. Дана характеристика, оценка и область применения конкретных методов. Проведен сравнительный анализ используемых показателей и выявлены наиболее информативные. Предложен метод интегральной оценки эколого-биологического состояния почвы. Определены перспективы его использования.

В последующих главах представлены конкретные методы определения различных показателей, характеризующих биологическое состояние почв. Впервые в одном издании объединены, адаптированы и модифицированы различные методы почвоведения, геоботаники, зоологии, микробиологии, биохимии, агрохимии и других научных направлений в целях их использования в биодиагностике и биоиндикации почв. В работе представлены общепринятые в почвоведении и биологии методики. Глава 2 написана с использованием работ: Почвы СССР: Справочник-определитель (1979), Практикум по почвоведению (1986), Гаврилюк (1990), Вальков, Колесников, Казеев (2002). Глава 3: Практикум по почвоведению с основами геоботаники (1999), Миркин с соавт. (2001). Глава 4: Количественные методы ... (1987), Гиляров (1949, 1965, 1975), Чернов (1975), Зенова с соавт. (2002). Глава 5: Методы почвенной микробиологии и биохимии (1991), Егоров (1983), Практикум по микробиологии (1976), Скворцов (1981), Сэги (1983), Методические рекомендации ... (1987), Теппер, Шильникова, Переверзева (1987), Зенова с соавт. (2002). Раздел 5.4.5: Зенова, Штина (1990). Раздел 5.7: Заварзин, Колотилова, 2001; Добровольская, Лысак, Зенова, Звягинцев, 2001. Раздел 6.1: Галстян (1974, 1978, 1982), Хазиев (1976, 1982, 1990), Методы почвенной микробиологии и биохимии (1991). Раздел 6.2: Практикум по агрохимии (1989), Методы почвенной микробиологии и биохимии (1991). Раздел 6.3: Гельцер (1986), Методы почвенной микробиологии и биохимии (1991). Раздел 6.6: Бабьева, Зенова (1989). Глава 7: Пономарева, Плотникова (1968), Орлов с соавт. (1975, 1981), Аринушкина (1970), Агрохимические методы исследования почв (1975), Никитин (1972), Практикум по почвоведению (1986). Раздел 7.4: Орлов, Садовникова (1975). Глава 8: Агрохимические методы исследования почв (1975), Практикум по почвоведению (1986), Практикум по агрохимии (1989).

Настоящее издание может быть использовано при биоиндикации и биодиагностике деградационных изменений в почве, при биомониторинге состояния почв, а также естественных и антропогенно-нарушенных экосистем в целом, при оценке воздействия на окружающую среду (ОВОС), при

экологическом нормировании загрязнения почв, при разработке методов санации загрязненных почв, при определении предельно допустимой антропогенной нагрузки на территорию, при создании экологических карт, при прогнозировании экологических последствий определенной хозяйственной деятельности на данной территории, при оценке риска катастроф, при проведении экологической экспертизы, паспортизации, сертификации и других научных и природоохранных мероприятий.

Изложенные в настоящих рекомендациях методики модифицированы, апробированы и адаптированы авторами для использования в научно-исследовательской работе студентами и аспирантами. Большинство из них могут быть использованы специалистами разных направлений биологии и почвоведения без специальной подготовки и сложного оборудования.

ГЛАВА 1. МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ

1.1. БИОМОНИТОРИНГ ПОЧВ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

Современное общество выработало ряд специальных мер, направленных на охрану окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов. К ним относятся контроль состояния окружающей среды, оценка воздействия на окружающую среду, экологическое нормирование, экологическая экспертиза, паспортизация, сертификация и другие. Среди них особое место занимает экологический мониторинг.

Мониторинг окружающей среды (экологический мониторинг) — система наблюдения, оценки и прогнозирования состояния окружающей человека природной среды. Конечная цель экологического мониторинга — оптимизация отношений человека с природой, экологическая ориентация хозяйственной деятельности.

В зависимости от масштабов наблюдения различают мониторинг глобальный, региональный и локальный. *Глобальный мониторинг* — слежение за развитием общемировых биосферных процессов и явлений (например, за состоянием озонового слоя, изменением климата). *Региональный мониторинг* — слежение за природными и антропогенными процессами и явлениями в пределах какого-то региона (например, за состоянием озера Байкал). *Локальный мониторинг* — мониторинг в пределах небольшой территории (например, контроль за состоянием воздуха в городе).

В зависимости от степени выраженности антропогенного воздействия различают мониторинг импактный и фоновый. *Фоновый (базовый) мониторинг* — слежение за природными явлениями и процессами, протекающими в естественной обстановке, без антропогенного влияния. Осуществляется на базе биосферных заповедников. *Импактный мониторинг* — слежение за антропогенными воздействиями в особо опасных зонах.

Экологический мониторинг возник на стыке экологии, биологии, географии, геофизики, геологии и других наук.

Выделяют различные виды мониторинга в зависимости от критериев (Хоружая, 1998): биоэкологический (санитарно-гигиенический); геоэкологический (природо-хозяйственный); биосферный (глобальный); геофизический; климатический; биологический; здоровья населения и др.

Особую роль в системе экологического мониторинга играет биологический мониторинг, т.е. мониторинг биотической составляющей экосистем (биоты).

Биологический мониторинг — это контроль состояния окружающей природной среды с помощью живых организмов. Главный метод биологического мониторинга — биоиндикация, которая заключается в регистрации любых изменений в биоте, вызванных антропогенными факторами. (В биологическом мониторинге могут быть использованы не только биологические, но и любые другие методы, например химический анализ содержания загрязняющих веществ в живых организмах.)

Биоиндикация — обнаружение и определение биологически и экологически значимых антропогенных нагрузок на основе реакции на них живых организмов и их сообществ.

Метод оценки абиотических и биотических факторов местообитания при помощи биологических систем часто называют *биоиндикацией* (лат. *indicare* — указывать). В соответствии с этим организмы или сообщества организмов, жизненные функции которых так тесно коррелируют с определенными факторами среды, что могут применяться для их оценки, называются *биоиндикаторами*. Это емкое определение относится и к индикации природных условий местообитания в целом, осуществляемой, например, в сельском и лесном хозяйстве по присутствию растений, характерных для определенного экотопа.

Все биологические системы — организмы, популяции или биоценозы — в ходе своего развития приспособились к комплексу факторов местообитания. Они занимают в биосфере определенную область — экологическую нишу — в которой существуют в подходящих условиях, нормально питаются и размножаются. Каждый организм обладает в отношении любого действующего на него фактора генетически детерминированным, филогенетически приобретенным, уникальным *физиологическим диапазоном толерантности*, в пределах которого этот фактор является для него переносимым. Если фактор отличается слишком высокой или слишком низкой интенсивностью, но еще не летален, то организм находится в *физиологическом пессимуме*. За пределами некоторого минимального и максимального значения фактора дальнейшая жизнь невозможна. В ограниченной области интенсивности фактора, особо благоприятной для данной особи, организм существует в условиях *физиологического оптимума*. Физиологический диапазон толерантности обычно неодинаков для разных стадий развития организма и для всех особей данной популяции.

Физические или химические измерения антропогенных факторов среды дают количественные и качественные характеристики фактора, но позволяют лишь косвенно судить о его биологическом действии. Биоиндикация позволяет получить информацию о биологических последствиях и сделать лишь косвенные выводы об особенностях самого фактора.

Для количественной оценки значимости отклонений необходимы абсолютные или относительные калибровочные стандарты. Выделяют следующие стандарты для сравнения при биоиндикации антропогенных или испытывавших антропогенное воздействие факторов среды (Биоиндикация загрязнений ..., 1988):

I. Абсолютные стандарты сравнения.

а) Сравнение с показателями биологической системы, свободной от воздействий.

б) Экспериментальное исключение антропогенных или антропогенно-модифицированных факторов.

в) Сравнение с биологическими системами прошлого, слабо или вообще не подверженными действию антропогенных факторов.

г) Построение градиента изменений одного и того же объекта вплоть до времени пренебрежимо малого антропогенного воздействия.

II. Относительные стандарты сравнения.

а) Корреляция с пространственно-временными изменениями антропогенных или испытывающих антропогенное воздействие факторов среды.

б) Установление эталонных объектов, испытывающих незначительное или известное антропогенное воздействие.

К большинству природных неблагоприятных факторов среды биологические системы способны приспосабливаться, адаптироваться, избегая или снижая негативный эффект. Опасность антропогенных нагрузок состоит, прежде всего, в том, что биологические системы — будь то организмы, популяции или биоценозы — недостаточно адаптированы к ним. Антропогенное воздействие часто создается с такой скоростью, что эти системы часто не успевают активизировать соответствующие адаптационные процессы. Многие антропогенные факторы среды потому и становятся опасными для живого, что они крайне отличны по величине, интенсивности, продолжительности и моменту воздействия от той обычно существующей в природе нормы, к которой адаптированы биологические системы. В результате они часто влияют на диапазон толерантности, что нередко приводит к превышению допустимой нагрузки на организмы и к распаду биологической системы (Биоиндикация загрязнений ..., 1988).

Кроме того, в природе на организм воздействует не один какой-нибудь стрессор, а всегда наблюдается целый комплекс нарушающих факторов. При этом отдельный фактор может временно или постоянно доминировать. В связи с этим реакции организмов на стрессоры в лабораторных условиях не всегда совпадают с таковыми в естественных условиях.

Биоиндикация может осуществляться на различных уровнях организации живого (макромолекула, клетка, орган, организм, популяция, биоце-

ноз). В соответствии с организационными уровнями биологических систем можно установить различные уровни биоиндикации, которые, впрочем, нельзя строго разграничить (Биоиндикация загрязнений ..., 1988):

1-й уровень: биохимические и физиологические реакции;

2-й уровень: анатомические, морфологические, биоритмические и поведенческие отклонения;

3-й уровень: флористические, фаунистические и хорологические изменения;

4-й уровень: ценоотические изменения;

5-й уровень: биогеоценотические изменения;

6-й уровень: изменения ландшафтов.

При биоиндикации следует учитывать четыре основных требования:

1. Относительная быстрота проведения.

2. Получение достаточно точных и воспроизводимых результатов.

3. Присутствие объектов, применяемых в целях биоиндикации, по возможности в большом количестве и с однородными свойствами.

4. Диапазон погрешностей по сравнению с другими методами тестирования не более 20 %.

Результаты биоиндикации необходимо подвергать математической обработке.

К особенностям биоиндикаторов относятся следующие (по Химическое загрязнение ..., 1991):

- реакция на относительно слабые нагрузки вследствие высокой чувствительности биологических объектов, а также эффекта кумуляции дозы;
- суммирование действия различных антропогенных факторов;
- не требуется регистрация химических и физических параметров состояния окружающей среды;
- фиксация скорости проходящих изменений в окружающей среде;
- обнаружение тенденций развития окружающей среды;
- обнаружение возможных путей попадания токсикантов в пищевые цепи;
- возможность оценки и контроля степени воздействия загрязняющих веществ на живые организмы и человека.

1.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЧВЫ

Уже в начале XX века была известна огромная роль живого вещества почв. С.А. Захаров (1931) цитирует выражение Бертло, что почва представляет из себя «нечто живое» («quelque chose de vivant»). Значительное влияние организмов на свойства почвы В.И. Вернадский (1919 цит. по 1992) выразил во фразе «... **все процессы в почве связаны с участием**

живого вещества или продуктов его изменения. В широком понимании слова все эти явления можно считать биохимическими».

Изучение биологии почв в нашей стране связано в первую очередь с именами С.Н. Виноградского, Н.А. Красильникова, Е.Н. Мишустина, Т.В. Аристовской, Д.Г. Звягинцева и др. в области микробиологии почв; В.Ф. Купревича, Т.А. Щербаковой, А.Ш. Галстяна, Ф.Х. Хазиева, С.А. Абрамяна и др. в области ферментативной активности почв; М.С. Гилярова, Д.А. Криволицкого, Б.Р. Стригановой и др. в области почвенной зоологии; П.А. Костычева, И.В. Тюрина, М.М. Кононовой, Д.С. Орлова, Л.Н. Александровой, Л.А. Гришиной и др. в области гумусного состояния почв. Их исследованиями установлены закономерности распределения организмов и их метаболитов в зависимости от свойств почв и почвенных процессов, что послужило теоретической базой для их применения в диагностике и мониторинге почв.

При проведении биомониторинга и биодиагностики почв ведущими являются показатели биологической активности. По предложению Д.С. Орлова с соавт. (1991) под биологической активностью почвы следует подразумевать интенсивность протекающих в ней биологических процессов. Биологическая активность почвы обусловлена суммарным содержанием в почве определенного запаса ферментов, как выделенных в процессе жизнедеятельности растений и микроорганизмов, так и аккумулярованных почвой после разрушения отмерших клеток. Биологическая активность почв характеризует размеры и направление процессов превращения веществ и энергии в экосистемах суши, интенсивность переработки органических веществ и разрушения минералов.

В качестве показателей биологической активности почв используются: численность и биомасса разных групп почвенной биоты, их продуктивность, ферментативная активность почв, активность основных процессов, связанных с круговоротом элементов, некоторые энергетические данные, количество и скорость накопления некоторых продуктов жизнедеятельности почвенных организмов (Химическое загрязнение ..., 1991).

В идеале показателями биологической активности почв должны служить какие-либо важные и всеобщие процессы, осуществляемые в почве всеми или подавляющим большинством населяющих ее организмов, например, термогенез, количество АТФ. Однако измерение таких параметров связано с разного рода сложностями (Звягинцев, 1978). Поэтому на практике определяют интенсивность более частных процессов, таких как выделение CO_2 , накопление аминокислот и др.

Показатели биологической активности определяют, используя различные методы: микробиологические, биохимические, физиологические и химические.

В результате многочисленных исследований была установлена необходимость разделения биологической активности почв (и соответственно методов ее определения) на актуальную и потенциальную, не всегда совпадающие между собой. Потенциальная биологическая активность — активность почвы, измеренная в искусственных условиях, оптимальных для протекания конкретного биологического процесса. Измеряют ее следующими методами: определение численности бактерий методами прямого микроскопирования: по Виноградскому или люминесцентно-микроскопическим методом, определение длины гиф грибов и актиномицетов люминесцентно-микроскопическим методом, определение численности микроорганизмов методом посева почвенной суспензии на плотные питательные среды, определение ферментативной активности, лабораторные методы определения дыхания, нитрификации, азотфиксации, денитрификации и др. Актуальная (действительная, естественная, полевая) биологическая активность характеризует реальную активность почвы в естественных (полевых) условиях. Измерить ее можно только непосредственно в поле с помощью следующих методов: определение дыхания, азотфиксации, денитрификации в полевых условиях, аппликационные методы (определение интенсивности разложения льняного полотна и накопления свободных аминокислот), определение численности и видового состава микробсообществ методами «стекол обрастания» Холодного, капилляров Перфильева и др.

Методы определения потенциальной биологической активности почв могут служить хорошими диагностическими показателями потенциального плодородия почв, степени удобренности, окультуренности, эродированности, а также загрязненности какими-либо химическими веществами (ТМ, нефтью, пестицидами и др.). Однако, при характеристике интенсивности биологических процессов, протекающих в естественных условиях, следует пользоваться методами для определения актуальной биологической активности, т.к. в реальной обстановке лимитирующие факторы (рН среды, температура, влажность и т.д.) могут резко ограничивать интенсивность процесса и, несмотря на большие потенциальные возможности, процесс может идти очень медленно (Звягинцев, 1978).

Важной особенностью показателей биологической активности и биогенности почв является их значительное пространственное и временное варьирование, что требует при их определении большого числа повторных наблюдений и тщательной вариационно-статистической обработки (Звягинцев, 1978; Звягинцев, Голимбет, 1983).

1.2.1. ФАУНА ПОЧВ

Важнейшую роль в круговороте веществ в природе, почвообразовании, плодородии почв играют животные. Почвенный зоологический мир по многообразию значительно превосходит мир наземных животных (Гиляров, Криволицкий, 1995). В почве обитает огромное количество видов простейших, червей, насекомых и их личинок, многоножек, клещей, ногохвосток, мокриц и др. Вся их жизнедеятельность и жизнеобитание взаимосвязаны между собой и экологическими факторами. Величина биомассы животных в почве варьирует в пределах от сотен миллиграммов до сотен граммов в 1 м² (Гиляров, 1965; Криволицкий, Покаржевский, Сизова, 1985; Криволицкий, 1994; Гиляров, Криволицкий, 1995; Стриганова, 2000). Мелкие животные вносят ощутимый вклад в общую зоомассу почвы. Даже филогенетически очень далекие организмы (микробы, беспозвоночные, позвоночные), принадлежащие к близким трофическим группам, имеют величины биомассы одного порядка (Чернов, 1975). Существует обратная зависимость интенсивности обмена веществ от размеров (массы) организма. Чем мельче животное, тем больше оно расходует кислорода на единицу веса своего тела.

По степени связи почвенных беспозвоночных с почвенной средой обитания этому признаку М.С. Гиляровым (1949) были выделены три основные группы: 1) *геобионты* — беспозвоночные, обитающие в почве в течение всего жизненного цикла (дождевые черви, микроартроподы, многоножки, многие насекомые и др.), 2) *геофилы* — беспозвоночные, у которых отдельные стадии развития тесно связаны с почвой (личинки крылатых насекомых) и 3) *геоксены* — беспозвоночные, кратковременно находящиеся в почве в поисках укрытия и защиты от неблагоприятных погодных условий, хищников и пр.

В глобальном масштабе видовое разнообразие фауны почвенных беспозвоночных (геобионтов и геофилов) составляет примерно треть от общего числа известных видов (Стриганова, 1999). В одном местообитании встречается до нескольких сотен видов беспозвоночных, относящихся к одной размерной группировке. Например, количество видов раковинных амёб в лесной почве составляет 60-70, число видов гамазовых клещей — 70-75, криптостигматных клещей — 25-53, количество видов насекомых, относящихся к группе мезофауны — 20-150 (Стриганова, 1999).

Показатели локального разнообразия животного населения в почве выше, чем в наземном ярусе: среднее видовое богатство почвенной фауны в расчете на единицу площади (альфа-разнообразие) превышает таковое в наземной среде. Если принять во внимание, что в почвенном профиле животное население сосредоточено лишь в верхнем горизонте, то индекс

разнообразие видов на единицу объема оказывается еще выше, чем, например, в растительном ярусе.

Между представителями одной размерной группировки наблюдается разделение пространственных ниш по горизонтали и по почвенному профилю. В структуре животного населения четко выражена приуроченность отдельных форм к определенным генетическим горизонтам. Основная масса почвенных форм обитает в корнеобитаемом горизонте, они связаны с корневым отпадом, живыми корнями, микрофлорой. М.С. Гиляров (1949) установил пространственную корреляцию между распределением корней растений по почвенному профилю, мощностью гумусового горизонта и глубиной ходов животных.

В большинстве работ в составе животного населения почвы выделяются 4 основные трофические группировки — сапрофаги, фитофаги, хищники и миксофаги (формы со смешанным питанием). В умеренном поясе в трофической структуре доминируют сапрофаги по численности и биомассе. В широколиственных лесах и луговых сообществах доля сапрофагов составляет 70-80% от общей зоомассы.

Б.Р. Стриганова (1999) выделяет следующие группировки сапрофагов: первичные разрушители растительных остатков, вторичные разрушители, детритофаги, микробофаги.

Многие почвенные животные являются эффективными индикаторами соответствующих почвенных свойств, на чем основано использование животных для зоологической индикации почв (Гиляров, 1965). Исследованиями различных авторов установлено, что численность и видовой состав почвообитающих животных может служить диагностическим показателем степени окультуренности почв (Гиляров, 1965, Гельцер, 1986). Под влиянием антропогенных факторов, в частности распашки земель, использования пестицидов, нефтяного, промышленного и других форм загрязнения окружающей среды, видовое разнообразие и численность почвенной фауны снижается (Криволуцкий, 1994; Миноранский, 1998). На сельскохозяйственных угодьях количество дождевых червей, мокриц, кивсяков и многих других сапрофагов в несколько раз меньше, чем в естественных биотопах (Миноранский, 1998).

1.2.2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ

Различные территории Земли отличаются друг от друга климатическими условиями, химическим составом подстилающих пород и другими факторами, обуславливающими направление почвообразовательного процесса и характер миграции химических элементов. Вследствие этого хи-

мический состав естественных сред обитания организмов географически неоднороден.

Однако, общепризнанно, что большинство видов бактерий — космополиты, их распространение не определяется географическим фактором и зависит от экологических условий мест обитания. Например, сходные виды бактерий обитают на различных континентах и широтах. Поэтому не принято говорить о географических закономерностях распространения тех или иных микроорганизмов, правильнее сказать, что ареалы обитания одинаковых видов микробов определяются сходностью сочетаний абиотических и биотических факторов природной среды. Несмотря на то, что почвенные микроорганизмы имеют колоссальные ареалы распространения, в определенных почвах создаются наиболее благоприятные условия для их развития и жизнедеятельности. Поэтому состав и содержание микроорганизмов в различных типах почв существенно отличается. Имеется немало примеров, свидетельствующих о приуроченности определенных видов микроорганизмов к зональным типам почв. В каждой конкретной почве складываются своеобразные микробные ценозы, имеющие определенную структуру. В работах Е.Н. Мишустина (1956), О.М. Паринкиной (1989), Д.Г. Звягинцева с соавт. (1996), Т.Г. Добровольской с соавт. (1996) приводятся данные по географическому расселению микроорганизмов разных групп в основных почвах СНГ. Установлено, что содержание бактерий, особенно спорообразующих форм, развивающихся на почвенном гумусе, с севера на юг увеличивается. Также с севера на юг возрастает численность актиномицетов, а численность грибов снижается.

В почвах разных природно-климатических зон содержатся разные типы сообществ микроорганизмов. Особое значение для почвообразования, круговорота минеральных и органических веществ в экосистемах имеют бактерии, актиномицеты и микромицеты. Несмотря на то, что микроорганизмы по сравнению с высшими растениями являются космополитами, все же отмечается вполне отчетливая зависимость структуры микробоценозов от почвенно-экологических условий (Громыко, 1974; Бабьева, Зенова, 1989; Добровольская и др., 1996; Звягинцев и др., 1996; Звягинцев и др., 1999). В каждой конкретной почве складываются своеобразные микробные ценозы, имеющие определенную структуру. Микробная биомасса в разных почвах колеблется от единиц до нескольких десятков т/га, причем на долю грибов приходится от 89 до 99% биомассы, а доля прокариот (бактерии, актиномицеты) составляет 1-12%. Девяносто процентов видов растений микотрофны, т.е. имеют на корнях микоризу. Более 160 видов растений имеют на корнях актиноризу (Калакуцкий, Шарая, 1990). Симбиоз связан с diaзотрофными актиномицетами рода *Frankia*.

Особенностью почвы как среды обитания микроорганизмов является ее гетерогенность. Микрозоны разделены здесь в пространстве и во времени, поэтому почва представляет собой множество экологических ниш. Микрозональность определяется локальным поступлением органических остатков и корневых выделений растений, варьированием значений температуры, влажности, pH, Eh, концентрацией минеральных элементов и т.д. Благодаря микрозональности в почве одновременно могут идти разнообразные и иногда несовместимые процессы — аэробные и анаэробные, автотрофные и гетеротрофные, протекающие при низких и высоких значениях pH (Добровольская и др., 1996).

В современной экологической терминологии принято подразделять микроорганизмы на r-стратегов, быстро развивающихся за счет легко доступных соединений, содержащихся в высоких концентрациях в среде, и K-стратегов, способных к медленному росту за счет питательных субстратов, имеющих в незначительных концентрациях, уже неспособных обеспечить рост r-стратегов.

Наряду с активно функционирующими группами микроорганизмов в почве содержится огромное количество пассивных группировок, так называемый микробный пул (англ. pool — объединенный резерв) или запас микроорганизмов, не обеспеченных элементами питания и оптимальными физическими факторами среды, ожидающий благоприятных условий.

Поступающее в почву органическое вещество может обеспечить в среднем не более нескольких десятков поколений бактерий за год. Микробный пул обуславливает поддержание гомеостатического состояния почвы, т.е. постоянства химических и других свойств, характерных для данной почвы. При поступлении в почву свежего органического вещества или внесения удобрений в процесс их трансформации включаются микроорганизмы, которые должны привести систему почвы в состояние равновесия (Звягинцев, 1987).

В качестве одного из наиболее общих показателей биологической активности почв часто называют “дыхание” почв — выделение углекислого газа и поглощение кислорода почвой (Мина, 1957; Галстян, 1974; Звягинцев, 1976; Орлов, 1976; Орлов и др., 1979). Выделение углекислого газа из почвы отражает интенсивность жизнедеятельности почвенной биоты, скорость минерализации опада и подстилки.

Различные почвы отличаются неодинаковой интенсивностью дыхания. При оптимальной влажности горизонт A₁ чернозема поглощает кислород в 2 раза больше горизонта A_{пах} дерново-подзолистых почв (Орлов и др., 1979).

Интенсивность “дыхания” относится к лабильным современным признакам, но в тоже время оно тесно связано с суммарной биологической

активностью и является очень четким и выразительным показателем изменения скоростей процессов в сезонной динамике, при изменении погодных условий, при загрязнении почв и т.д. (Звягинцев, 1976).

Экологические классификации микроорганизмов (по Заварзину, Колотиловой, 2001):

По типу питания: *Автотрофы* — строящие вещества своего тела из углекислоты. *Гетеротрофы* — использующие готовые органические соединения.

По отношению к температуре: *Психрофилы* (оптимум ниже 20°C), *мезофилы* (оптимум 25-35°), *термофилы* (растущие при температуре выше 50°, а максимум ниже 70°), *экстремальные термофилы* (не растут при температуре ниже 60-70°, а максимум около 90°), *гипертермофилы* (максимум выше 100°).

По отношению к pH среды: *Нейтрофилы* — развивающиеся в диапазоне pH больше 5 и ниже 9, но большинство организмов развиваются в основном при pH 6-8. *Ацидофилы* — живут при pH ниже 6, вплоть до pH ниже 2. К ним относятся некоторые бактерии. Умеренными ацидофилами являются большинство грибов. *Алкалофилы* развиваются при pH выше 8,5, с предельным значением около 11. К ним относятся уробактерии *Sporosarcina urea*, разлагающие мочевины с образованием аммиака; *бациллы* — обитатели содовых солончаков, *цианобактерии* и др.

По отношению к свободному кислороду:

Аэробы — нуждаются в кислороде для дыхания. *Облигатные аэробы* используют как акцептор электронов только O₂. *Микроаэрофилы* требуют пониженной концентрации кислорода. *Факультативные аэробы* могут переходить от дыхания кислородом к анаэробнозису.

Анаэробы разделяются на *аэротолерантные* (способны расти в присутствии воздуха) и *облигатные* (требуют отсутствия кислорода и восстановительной обстановки).

Бактерии используют только растворенный кислород и поэтому зависят от обмена водной среды своего обитания с воздухом. Токсичность кислорода определяется его реакционно-способными формами, самой активной из которых является синглетный кислород, *O₂. Его высокая реакционная способность приводит к неконтролируемым реакциям окисления. Для гашения действия синглетного кислорода организмы образуют антиоксиданты, например, каротиноиды. Поэтому организмы, развивающиеся на ярком свете, часто ярко окрашены.

Облигатные аэробы не только используют O₂ как наиболее выгодный окислитель, но и вынуждены защищаться от токсичных продуктов его восстановления. Обычным тестом на аэробность служит определение на-

личия каталазы по разложению H_2O_2 суспензией бактерий с выделением пузырьков O_2 .

По отношению к солености:

Почвенные организмы приспособлены к резким изменениям осмотических свойств среды обитания и ксерофилии — приспособлению к сухости. Многие из них являются *галолатерантными*. В почве характерны грамположительные организмы, особенно актиномицеты. Многие бактерии имеют различные приспособления к действию высушивания.

По отношению к концентрации субстрата:

Копиотрофы — преобладают при условиях обилия субстрата. К ним относятся большинство культивируемых в лабораториях форм.

Олиготрофы приспособлены к низким концентрациям субстрата и обладают высоким сродством к нему, что обеспечивается соответствующими транспортными системами. Среди олиготрофов выделяют *политрофов*, использующих сложные труднодоступные органические вещества (например, гумус), и *диссипотрофы*, питающихся рассеянными в среде низкомолекулярными продуктами гидролиза полимеров (например, целлюлозы). К первым относят нокардий и коринеформных бактерий, ко вторым — простекобактерий и спирохет.

Гидролитики — организмы, растворяющие твердые полимерные органические вещества посредством экзоферментов гидролаз. К ним относят сахаролитиков, липолитиков, пептолитиков и бактериолитиков.

1.2.3. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ

Из многочисленных показателей биологической активности почвы большое значение имеют почвенные ферменты. Их разнообразие и богатство делают возможным осуществление последовательных биохимических превращений, поступающих в почву органических остатков.

Название “фермент” происходит от латинского “ферментум” — брожу, закваска. Явление катализа и в настоящее время не получило полной разгадки. Сущность действия катализатора заключается в снижении энергии активации, необходимой для химической реакции, направляя ее обходным путем через промежуточные реакции. Эти реакции требуют меньшей энергии, чем реакции, идущие без катализатора, благодаря чему повышается и скорость основной реакции. Под действием фермента ослабляются внутримолекулярные связи в субстрате вследствие некоторой деформации его молекулы, проходящей при образовании промежуточного комплекса фермент-субстрата.

Ферментативную реакцию можно выразить общим уравнением:



т. е. субстрат (S) обратимо реагирует с ферментом (E) с образованием фермент-субстратного комплекса (ES).

Общее ускорение реакции под действием фермента обычно составляет 10^{10} - 10^{15} (Шугалей, Кесслер, 1986; Рис, Стенберг, 1988).

Таким образом, роль ферментов заключается в том, что они значительно ускоряют биохимические реакции и делают их возможными при обычной нормальной температуре.

Ферменты, в отличие от неорганических катализаторов, обладают избирательностью действия. Специфичность действия ферментов выражается в том, что каждый фермент действует лишь на определенное вещество, или же на определенный тип химической связи в молекуле. По своей биохимической природе все ферменты — высокомолекулярные белковые вещества. На специфичность ферментных белков влияет порядок чередования в них аминокислот. Некоторые ферменты помимо белка содержат более простые соединения. Например, в составе различных окислительных ферментов содержатся органические соединения железа. В состав других входят медь, цинк, марганец, ванадий, хром, витамины и др. органические соединения (Клесов, Березин, 1980; Рис, Стернберг, 1988; Шугалей, Кесслер, 1986).

В основу единой классификации ферментов положена специфичность к типу реакции, и в настоящее время, согласно решению Комиссии по ферментам Международного биохимического союза, ферменты подразделяются на 6 классов:

1. Оксидоредуктазы (катализируют процессы биологического окисления);
2. Гидролазы (катализируют расщепление с присоединением воды);
3. Трансферазы (переносят группы атомов);
4. Лиазы (отщепляют/присоединяют различные группы атомов без участия воды);
5. Изомеразы (изменяют структуру соединения);
6. Лигазы или синтетазы (катализируют присоединение друг к другу двух различных молекул).

В почвенной биодинамике наибольшее значение имеют оксидоредуктазы и гидролазы. Из оксидоредуктаз в почве наиболее распространены каталазы, дегидрогеназы, фенолоксидазы, пероксидазы. Они участвуют в окислительно-восстановительных процессах синтеза гумусовых компонентов. Из гидролаз наиболее широко распространены инвертаза, уреазы, протеаза, фосфатазы. Эти ферменты участвуют в реакциях гидролитического распада высокомолекулярных органических соединений и тем самым играют важную роль в обогащении почвы подвижными и доступными растениям и микроорганизмам питательными веществами.

Исследованием ферментативной активности почв занималось большое количество исследователей. В результате исследований доказано, что ферментативная активность — это элементарная почвенная характеристика. Ферментативная активность почвы складывается в результате совокупности процессов поступления, иммобилизации и действия ферментов в почве. Источниками почвенных ферментов служит все живое вещество почв: растения, микроорганизмы, животные, грибы, водоросли и т.д. Накапливаясь в почве, ферменты становятся неотъемлемым реактивным компонентом экосистемы (Галстян, 1974; Купревич, Щербакова, 1966; Купревич, 1974). Почва является самой богатой системой по ферментному разнообразию и ферментативному пулу (Купревич, 1974). Разнообразие и богатство ферментов в почве позволяет осуществляться последовательным биохимическим превращениям различных поступающих органических остатков.

Значительную роль почвенные ферменты играют в процессах гумусообразования. Превращение растительных и животных остатков в гумусовые вещества является сложным биохимическим процессом с участием различных групп микроорганизмов, а также иммобилизованных почвой внеклеточных ферментов. Д.С. Орлов и О.Н. Бирюкова (1984) выявили прямую связь между интенсивностью гумификации и ферментативной активностью. Ф.Х. Хазиев (1982) также связывает активность ферментов с содержанием органического вещества в почве.

Особо следует отметить значение ферментов в тех случаях, когда в почве складываются экстремальные для жизнедеятельности микроорганизмов условия, в частности при загрязнении ТМ. В этих случаях метаболизм в почве остается в известной мере неизменным, благодаря действию иммобилизованных почвой, и поэтому устойчивых, ферментов.

Максимальная каталитическая активность отдельных ферментов наблюдается в относительно небольшом интервале рН, который является для них оптимальным. Поскольку в природе встречаются почвы с широким диапазоном реакции среды (рН 3,5-11,0), то их уровень активности весьма различен.

Исследованиями различных авторов установлено, что активность почвенных ферментов может служить дополнительным диагностическим показателем почвенного плодородия и его изменения в результате антропогенного воздействия (Галстян, 1974, 1978, 1982; Хазиев 1976, 1982; Звягинцев 1978; Абрамян, 1992; Gresta, Olszowskij, 1974; Burns, 1977). Применению ферментативной активности в качестве диагностического показателя способствуют низкая ошибка опытов (не более 5-8 %) и высокая устойчивость ферментов при хранении образцов (Галстян, 1978, 1982).

1.2.4. ГУМУСНОЕ СОСТОЯНИЕ

Благодаря работам В.В. Докучаева, П.А. Костычева, Н.Н. Сибирцева, И.В. Тюрина, М.М. Кононовой, В.В. Пономаревой, Т.А. Плотниковой, В.Р. Волобуева, С.А. Алиева, Л.Н. Александровой, Д.С. Орлова и других исследователей известно, что содержание, распределение, состав гумуса, а также строение и свойства гумусовых веществ являются характерными для каждого почвенного типа, а, следовательно, могут служить вполне надежным диагностическим и классификационным признаком.

Особенностям процесса гумусообразования, закономерностям его проявления в различных биоклиматических зонах уделяется много внимания. Все исследования генетического характера М.И. Дергачева (1984) разделяет на два направления. Первое направление — зонально-генетическое. Оно предусматривает изучение гумуса (в связи с генезисом почв) в перегнойно-аккумулятивных горизонтах с учетом и установлением коррелятивных связей и зависимостей между гидротермическими условиями зоны и его составом и свойствами (Тюрин, Коконова, Орлов). Второе направление — профилно-генетическое. Его основоположницей является В.В. Пономарева.

Исследованиями И.А. Тюрина, М.М. Кононовой, Д.С. Орлова и др. установлена биохимическая сущность гумификации как специфического почвенного процесса превращения клетчатки, белков, лигнина и других химических соединений растительных остатков в различные вещества почвенного гумуса. Гумификацию можно рассматривать как процесс постмортального превращения органических остатков, протекающий под влиянием как биохимических так и чисто химических агентов и ведущий к формированию термодинамически наиболее стабильной в конкретных экологических условиях системы специфических (собственно гумусовых) и неспецифических органических соединений (Орлов и др., 1979).

Все органические соединения (компоненты) можно разделить на две группы по степени устойчивости к разложению. Первая — лабильные органические вещества, которые в значительной степени обуславливают динамику современных почвенных процессов и тесно связаны с жизнедеятельностью почвенных микробов. Вторая — устойчивые вещества, накапливающиеся в почве и характеризующие историю развития почвы, ее генетическую принадлежность и формирующие наиболее устойчивые и даже консервативные признаки почв (Орлов, 1990). Наиболее характерным представителем второй группы являются гуминовые кислоты и гумин. Они придают почвам стабильность, своеобразную буферность, определенный биохимический фон.

С биологической активностью почвы тесно взаимосвязаны ее физические и химические свойства, такие как рН среды, окислительно-

восстановительный потенциал и другие. Интегральным показателем биологических процессов в почве можно считать гумусное состояние почв. Следует отметить, что физические и химические свойства характеризуют относительно консервативные накопившиеся признаки и свойства почв, биология почв располагает показателями, которые характеризуют динамические свойства, являющиеся индикаторами современного режима жизни почв.

1.3. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДОЛОГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОЦЕНКИ ЭКОЛОГО- БИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ

Основные принципы разработанной авторами методологии и методов исследования и оценки эколого-биологического состояния почв изложены в ряде работ (Вальков, 1995; Казеев, 1996; Вальков и др., 1989, 1996, 1997a, 1997b, 1999, 2000; Казеев, Колесников, 1998a, 1998b, 2001, 2002; Колесников и др., 1999, 2000a, 2000b, 2000c, 2001a, 2001b, 2001c; Колесников, Казеев, 2002 и др.).

В основу методологии исследования и оценки эколого-биологического состояния почв на основе биологической активности почв был положен системный подход к изучению объектов или явлений природы, внедренный в естествознание В.В. Докучаевым. Кратко его идея заключается в следующем: любой объект или явление природы следует рассматривать не изолировано, а во взаимосвязи и взаимообусловленности с окружающими его объектами и процессами.

Биологическая активность почв должна рассматриваться как свойство почвы, производное совокупности абиотических, биотических и антропогенных факторов формирования почвы. В почве фито-, зоо-, микробоценозы объединяются в целостную систему с продуктами их жизнедеятельности (в первую очередь, с ферментами и гумусовым комплексом) и абиотическими компонентами почвенной среды (гранулометрическими и структурными элементами, физическими и водными свойствами, реакцией среды, поглонительной способностью и др.). Кроме того, на формирование и изменение биологической активности почв огромное влияние оказывает антропогенное воздействие (распашка целинных почв, внесение удобрений, известкование, загрязнение пестицидами, тяжелыми металлами и др.). Биологическая активность почвы играет важную роль в процессе формирования, становления или деградации почвенного плодородия.

Основными составляющими предлагаемой методологии изучения и оценки биологической активности почв являются следующие:

- комплексный подход совместного и одновременного изучения биологических объектов, их почвенных производных и абиотической среды;
- определение ряда наиболее информативных экологических и биологических показателей и последующее нахождение интегрального показателя эколого-биологического состояния почвы;
- профильно-генетический и сравнительно-географический подходы к оценке состояния почвы;
- учет пространственной и временной variability свойств почвы;
- единообразие методик и методов исследования.

1.3.1. КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД

Комплексный подход совместного и одновременного изучения биологических объектов, их почвенных производных и абиотической среды подразумевает исследование фито-, зоо- и микробоценозов, ферментативной активности и гумусового состояния, основных генетических свойств почвы.

Комплексность исследований может соблюдаться в большей или в меньшей степени. В настоящее время нет какого-то одного универсального метода определения биологической активности почвы. Предлагается большое количество разнообразных методов (раздел 1.4). Однако все они далеко не равнозначны. Для оценки биологической активности почвы недостаточно какого-либо одного показателя, так как каждый из них отражает лишь какую-то одну сторону происходящих в почве биологических процессов. Так, например, о биологической активности почвы часто судят только по степени разложения в почве хлопчатобумажного полотна или только по результатам экспресс-метода определения биологической активности почвы Аристовской, Чугуновой. Однако на самом деле с помощью первого метода можно судить лишь о целлюлозолитической способности почвы, а с помощью второго — о скорости разложения мочевины. Ограничиться каким-либо одним или двумя методами можно только при рекогносцировочных исследованиях, так как при высоких значениях одного из показателей биологической активности другие биологические процессы в это же время могут быть подавлены.

1.3.2. ВЫБОР НАИБОЛЕЕ ИНФОРМАТИВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Выбор показателей для мониторинга состояния окружающей среды, в частности для биомониторинга почв, должен основываться на следующих критериях:

- информативность показателя (тесная корреляция между показателем и антропогенным фактором);
- высокая чувствительность показателя;
- хорошая воспроизводимость результатов;
- незначительное варьирование показателя;
- небольшая ошибка опыта;
- простота, малая трудоемкость и высокая скорость метода определения;
- широкая распространенность метода в стране и за рубежом, соответствие принятым стандартам.

С другой стороны, нет смысла определять необоснованно большое количество разнообразных показателей биологического состояния почвы. Практика показала, что для объективной достоверной оценки биологической активности почвы достаточно определения набора наиболее информативных показателей, отражающих разные параметры биологического состояния.

Выбор показателей для мониторинга и диагностики эколого-биологического состояния почв должен проводиться в зависимости от целей и задач исследования, вида антропогенного воздействия на почву, имеющейся лабораторно-аналитической базы, подготовки персонала и других критериев.

Нами дана оценка наиболее широко применяемым показателям эколого-биологического состояния почв. В основу анализа показателей положено сравнение вариабельности полученных данных и чувствительности методов к выявлению разных уровней загрязнения почвы.

Зафиксирован следующий ряд биологических свойств почв по степени их устойчивости к антропогенным воздействиям: *активность каталазы > активность инвертазы > активность уреазы = активность фосфатазы > скорость разложения мочевины > целлюлозолитическая способность > интенсивность накопления свободных аминокислот > фитотоксичность > численность микроскопических грибов > численность актиномицетов > численность бактерий > численность спорообразующих бактерий.*

Несмотря на то, что микробиологические показатели первыми реагируют на антропогенное воздействие, их реакция хуже коррелирует (или вовсе не коррелирует) со степенью этого воздействия, чем реакция биохимических показателей.

мических показателей. Кроме того, микробиологические показатели отличаются намного более значительным варьированием, по сравнению с биохимическими показателями. И, наконец, микробиологические показатели являются существенно более трудоемкими и дорогостоящими в определении, а также требуют исполнения высококвалифицированным персоналом. Поэтому, при проведении мониторинга и диагностики состояния почв, в первую очередь, следует определять биохимические показатели как более чувствительные, менее варьирующие, менее трудоемкие и менее дорогостоящие по сравнению с микробиологическими показателями.

Показатели общей численности основных групп почвенных микроорганизмов, определенные как методами прямой микроскопии, так и методом посева, являются малоприменимыми для биомониторинга, поскольку характеризуют только потенциальный запас микроорганизмов в почве, но по ним нельзя достоверно судить какая часть микроорганизмов находится в активном, а какая часть в покоящемся состоянии. Кроме того, общая численность основных групп почвенных микроорганизмов отличается настолько значительным пространственным и временным варьированием, что оно часто перекрывает эффект воздействия антропогенного фактора.

В то же время, хорошие результаты дает использование отношения общей численности бактерий по данным микроскопии к численности по посеву ($k=M/P$) как показателя сукцессионных процессов в почве. Уменьшение значений k свидетельствует об омоложении микробной системы почвы. Например, нами зафиксирована высокая обратная корреляция между содержанием в почве тяжелых металлов и этим показателем ($r = -0,83-0,95$).

По сравнению с показателями общей численности основных групп почвенных микроорганизмов более целесообразным является определение видового состава и/или структуры комплекса почвенных микроорганизмов, например, методом иницированного микробного сообщества. Однако эти методы очень трудоемки, требуют длительного времени проведения анализа, специального оборудования, высокой квалификации персонала, и поэтому не могут быть широко использованы на практике.

Из биохимических показателей, в первую очередь, рекомендуются показатели изменения ферментативной активности: каталазы, инвертазы, уреазы, фосфатазы и ряда других почвенных ферментов. Именно активность ферментов наилучшим образом коррелирует со степенью антропогенного пресса ($r = -0,5-1,0$). Так, изменение ферментативной активности, на наш взгляд, является ведущим показателем влияния на свойства почвы загрязнения тяжелыми металлами. Показатели микробиологической активности, фитотоксичности почвы, состояния растений и почвообитающей

фауны являются вторичными, опосредованными через ингибирование тяжёлыми металлами ферментов живых организмов.

При биомониторинге можно использовать и такие показатели как изменение скорости разложения мочевины, целлюлозоразрушающей активности, интенсивности накопления свободных аминокислот. Следует иметь в виду, что указанные показатели по своей сути аналогичны определению активности уреазы, целлюлазы и протеазы соответственно. Однако, если ферментативная активность отражает потенциальную биологическую активность почвы, то аппликационные методы определения степени разложения полотна и интенсивности накопления в почве свободных аминокислот регистрируют актуальную (полевую) биологическую активность. Поэтому эти методы должны разумно сочетаться. Следует иметь в виду, что аппликационные методы отличаются значительной ошибкой опыта и могут использоваться только при условии большой повторности.

По значениям наиболее информативных показателей биологической активности почвы рекомендуется определять интегральный эколого-биологический показатель состояния почвы.

1.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

Для суждения о биологической активности и эколого-биологическом состоянии почвы недостаточно какого-либо одного показателя, так как каждый из них отражает лишь какую-то одну сторону биологических и биохимических процессов в почве. Поэтому необходимо использовать широкий набор показателей состояния почвы.

Для объединения большого количества показателей была разработана методика определения *интегрального показателя эколого-биологического состояния почвы (ИПЭБСП)* (Вальков, Казеев, Колесников, 1999). Данная методика позволяет оценить совокупность биологических показателей. Для этого в выборке максимальное значение каждого из показателей принимается за 100 % и по отношению к нему в процентах выражается значение этого же показателя в остальных образцах.

$$B_1 = (B_x / B_{\max}) \times 100\%, \quad (1)$$

где B_1 — относительный балл показателя, B_x — фактическое значение показателя, B_{\max} — максимальное значение показателя.

После этого, суммируются уже относительные значения многих показателей (например, активность разных ферментов, дыхание, содержание гумуса и др.). Их абсолютные значения суммированы быть не могут, так как имеют разные единицы измерения (мг, % и т.д.). После этого рассчиты-

вается средний оценочный балл изученных показателей для образца (варианта):

$$B_{\text{ср.}} = (B_1 + B_2 + B_3 \dots + B_n) / N, \quad (2)$$

где $B_{\text{ср.}}$ — средний оценочный балл показателей, N — число показателей.

Интегральный показатель эколого-биологического состояния почвы рассчитывают аналогично формуле (1):

$$\text{ИПЭБСП} = (B_{\text{ср.}} / B_{\text{ср. max}}) \times 100\%, \quad (3)$$

где $B_{\text{ср.}}$ — средний оценочный балл всех показателей, $B_{\text{ср. max}}$ — максимальный оценочный балл всех показателей.

При диагностике загрязнений за 100 % принимается значение каждого из показателей в незагрязненной почве и по отношению к нему в процентах выражается значение этого же показателя в загрязненной почве.

При антропогенном воздействии на почву среднее значение выбранных показателей, в большинстве случаев, снижается, в то время как отдельные показатели биологической активности почвы могут увеличиваться. Таким образом, *снижение интегрального показателя эколого-биологического состояния почвы, как правило, находится в прямой зависимости от степени воздействия антропогенного фактора.*

При расчете интегрального показателя эколого-биологического состояния почвы должны использоваться не любые показатели биологической активности почв, а наиболее информативные. Именно они должны составлять основу интегрального показателя. Окончательное формирование набора показателей, составляющих интегральный показатель, требует дальнейшей разработки. В перспективе, набор показателей и методики их определения должны быть стандартизированы. *При этом показатели свойств почвы, входящие в интегральный показатель, могут различаться в зависимости от того, действие какого антропогенного фактора исследуется и нормируется.*

1.3.4. ПРОФИЛЬНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Профильно-генетический метод предусматривает оценку биологической активности не только верхних горизонтов почв, как это до сих пор, к сожалению, очень часто практикуется в биологических исследованиях, а всего генетического профиля до материнской породы. Биологи увлекаются исследованием поверхностных или пахотных горизонтов, оставляя без внимания большую часть почвенного профиля. Почва же отнюдь не ограничивается поверхностным горизонтом. Это сложный набор генетических горизонтов или слоев различного генезиса и свойств, безусловно, имеющих свои биологические особенности, не совпадающие со свойствами наиболее биологически активного поверхностного горизонта. Пахотные

горизонты различных почв в разных природных зонах по своим характеристикам сравнительно уравниваются, приобретая свойства, необходимые для ведущих сельскохозяйственных культур. Поэтому профильное изучение биологии почв — актуальная задача, которая позволит раскрыть новые закономерности генезиса почв и формирования ее плодородия.

В нижних горизонтах почв биологическая активность резко падает, и ее снижение чаще всего зависит от содержания в генетических горизонтах органического вещества (τ около 0,8). Значения биологической активности часто не коррелируют с такими важнейшими абиотическими показателями, как содержание ила, поглощенных оснований, pH (Вальков и др., 1999).

Хорошие результаты дает пересчет биологической активности на весь почвенный профиль. Для этого производится расчет показателей биологической активности на 1 см^2 поверхности почвы вплоть до материнской породы (значение показателя биологической активности каждого из почвенных горизонтов умножается на его мощность и объемный вес). Затем полученные результаты для отдельных горизонтов суммируют и получают показатель биологической активности всего почвенного профиля.

1.3.5. СРАВНИТЕЛЬНО-ГЕОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Сравнительно-географический анализ позволяет сравнивать между собой биологическую активность различных почв и выявлять пространственные закономерности ее формирования в зависимости от географии факторов среды.

Оценка биологической активности почв близка к оценке уровня плодородия (Вальков и др., 1999). Таким образом, по изменению биологической активности почвы можно судить об изменении ее плодородия. Это дает возможность рекомендовать интегральный показатель биологической активности для широкого использования при мониторинге и биоиндикации почв, в том числе при изучении антропогенных воздействий.

1.3.6. УЧЕТ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ И ВРЕМЕННОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ

Биологические свойства почвы характеризуются очень высокой пространственной и временной вариабельностью. Поэтому, при их исследовании важен правильный пространственный отбор почвенных и других образцов для лабораторных исследований и обязательна одновременность их взятия. При определении различных показателей биологической активности почв необходимо соблюдение требуемого количества полевых и ана-

литических повторностей и обязательное проведение математического анализа на степень достоверности полученных результатов (глава 9).

Статистическая обработка должна включать определение показателей вариации, проведение дисперсионного и корреляционного анализов, анализ пространственной структуры и др. (Доспехов, 1979; Лакин, 1980; Дмитриев, 1995; Джогман и др., 1999 и др.).

Дисперсионный анализ необходим для оценки достоверности влияния загрязнения на исследуемые показатели. В целях удобства интерпретации результатов дисперсионного анализа по его данным рекомендуется вычислять наименьшую существенную разность (НСР) (Доспехов, 1979).

Корреляционный анализ применяется для изучения тесноты и формы связи между концентрацией в почве загрязняющего вещества и исследуемыми показателями, а также между различными показателями эколого-биологического состояния почвы (приложение).

Результаты дисперсионного и корреляционного анализов также используются при исследовании взаимосвязи и взаимообусловленности происходящих в почве процессов.

Для анализа пространственной структуры территории с целью оценки возможности распространения полученных результатов на всю исследуемую территорию используются геостатистические методы (Джогман и др., 1999).

1.3.7. ЕДИНООБРАЗИЕ МЕТОДИКИ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Единообразие методики и методов исследования подразумевает необходимость выработки, по возможности, единой методики исследования биологических свойств почв, включая правила отбора образцов (в частности сроков отбора), выбор показателей и использование однотипных лабораторных методов определения показателей биологической активности.

К сожалению, отсутствие в настоящее время единой методики изучения биологических свойств почв очень часто делает весьма затруднительным сравнение данных, полученных разными исследователями. Данная проблема требует тщательной проработки.

1.4. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ

При сравнении результатов исследований влияния загрязнения на свойства почв, полученных разными исследователями, часто наблюдаются

значительные различия и противоречия. Одной из причин является использование разных методик исследования и методов определения показателей состояния почв. Для возможности сравнения результатов биомониторинга и биодиагностики почв необходимо стремиться к унификации и стандартизации подходов, методик и методов проведения подобных исследований (Галстян, 1978; Микробиологический мониторинг ..., 1991; Перечень ПДК ..., 1991; РД 52.18.595-96, 1997; Аннотированный перечень ..., 1998; Контроль химических ..., 1998; Перечень основных ..., 1998; Пузаченко, 1998; Санитарные нормы ..., 1998; Хоружая, 1998; Державин и др., 1999; Муравьев, 1999; Муравьев и др., 2000; Колесников и др., 2000b; Охрана природы. Почвы. Сборник ГОСТов, 2000; Яковлев, 2000; Мониторинг и методы ..., 2001; Фомин, Фомин, 2001).

В целях биомониторинга и биодиагностики почв возможно использование большого количества показателей. Среди них предпочтительными являются следующие: численность в почве бактерий (в том числе спорообразующих и бактерий рода *Azotobacter*), актиномицетов, микромицетов, «дыхание» почвы, целлюлозолитическую активность, интенсивность накопления свободных аминокислот, скорость разложения мочевины, активность каталазы, инвертазы, уреазы, фосфатазы и других ферментов, содержание в почве аммиачного и нитратного азота, подвижных соединений фосфора, гумуса, углеводов, качественный состав гумуса, фитотоксичность почвы, pH, Eh и др.

Лабораторно-аналитические исследования должны быть выполнены с использованием общепринятых в биологии и почвоведении методов (Практикум по микробиологии, 1976; Практикум по почвоведению, 1986; Гельцер, 1986; Практикум по агрохимии, 1989; Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991; Казеев, Колесников, 1998a, 1998b и др.).

Показатели экологических и биологических свойств почв и методы их определения, рекомендуемые при проведении биологического мониторинга почв, представлены в таблице 1.

1. Показатели экологических и биологических свойств почв и методы их определения

Показатель	Метод
Численность бактерий	Люминесцентное микроскопирование по Звягинцеву и Кожевину
Численность сапротрофных бактерий	Посев на МПА
Численность актиномицетов	Посев на КАА
Численность микромицетов	Посев на подкисленную среду Чапека
Численность спорообразующих бактерий	Посев на МПА из предварительно пастеризованной суспензии
Численность <i>Azotobacter</i>	Метод комочков обрастания на среде Эшби
Структура комплекса почвенных микромицетов	По радиальной скорости роста колоний микроскопических грибов
Интенсивность выделения из почвы CO_2	По Макарову в модификации Галстяна
Полевое «дыхание» почвы	По Карпачевскому, Киселевой
Целлюлозолитическая способность почвы	По разложению полотна
Интенсивность накопления свободных аминокислот	По количеству аминокислот на полотне
Скорость разложения в почве мочевины	Экспресс-метод по Аристовской и Чугуновой
Активность каталазы	По Галстяну
Активность дегидрогеназы	По Галстяну
Активность ферриредуктазы	По Галстяну
Активность инвертазы	По Галстяну в модификации Хазиева
Активность уреазы	По Галстяну
Активность фосфатазы	По Галстяну в модификации Хазиева
Общий гумус	По методу Тюрина в модификации Никитина
Содержание углеводов	По методу Дюбуа в модификации Артемьева
Качественный состав гумуса	По методу Тюрина в модификации Пономаревой и Плотниковой
Содержание в почве аммиачного азота	Метод с использованием реактива Нesslerа
Содержание в почве нитратного азота	По методу Грандваль-Ляжу
Содержание в почве подвижных соединений фосфора	По методу Мачигина
Фитотоксичность почвы	По изменению показателей прорастания семян (всхожесть, энергия прорастания, дружность прорастания, скорость прорастания) и интенсивности начального роста проростков (длина корней, длина зеленых проростков, масса корней, масса зеленых проростков)
pH почвы	Потенциометрический метод
Eh почвы	Потенциометрический метод

1.5. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ И ПОЛЕВЫХ МОДЕЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Модельные лабораторные опыты имеют ряд преимуществ по сравнению с полевыми исследованиями. Во-первых, возможность поддерживать постоянную, одинаковую во всех опытах влажность и температуру почвы, в то время как в полевых условиях результаты опыта сильно зависят от погодных условий, что часто не позволяет добиться сопоставимых результатов. Во-вторых, возможность обеспечить перемешивание почвы до полной однородности во всех сосудах, что позволяет избежать расхождений в свойствах почвы, которые часто встречаются на разных делянках. И, наконец, возможность исследования различных загрязняющих веществ отдельно и в заранее заданных концентрациях. Таким образом, выяснение многих вопросов о влиянии загрязняющих веществ на протекающие в почве процессы возможно только посредством модельных опытов.

Планирование, закладку и проведение модельных экспериментов необходимо осуществлять в соответствии с общепринятыми методиками проведения вегетационных опытов (Методы полевых и вегетационных опытов с удобрениями и гербицидами, 1967; Журбицкий, 1968; Агрохимические методы исследования почв, 1975).

При проведении модельных опытов в качестве вегетационных сосудов могут быть использованы различные емкости (например, стеклянные банки) с дренажом и трубкой для полива. Масса почвы в вегетационном сосуде в пересчете на воздушно-сухую почву должна составлять не менее 1 кг. Набивку сосудов необходимо осуществлять в соответствии с общепринятыми методиками.

Компостирование проводят при температуре +20-25 °С и влажности почвы 60 % от полной влагоемкости. Полив осуществляется по мере необходимости поверхностно и через трубку.

Помимо лабораторных модельных экспериментов рекомендуется проведение микроделяночных полевых опытов для исследования процессов в естественных условиях. Делянки должны быть заложены на типичных участках. Рекомендуемый размер делянок — 1 м² и более. При исследовании влияния загрязнения почвы на состояние растений размер делянок должен быть увеличен.

Модельные опыты рекомендуется проводить в трехкратной повторности.

Для изучения динамики биологических процессов образцы почвы для лабораторных анализов следует отбирать через различные промежутки времени от момента загрязнения, например, через 1, 3, 7, 15, 30, 45, 180,

360 суток. В зависимости от целей исследования образцы почвы можно брать чаще или реже.

Частные вопросы моделирования решаются в зависимости от особенностей исследуемого вида антропогенного воздействия. Например, в работе С.И. Колесникова с соавт. (2000а) подробно рассмотрена методика моделирования загрязнения почвы тяжелыми металлами. При моделировании этого явления необходимо решение таких вопросов как выбор металлов, их концентраций в почве, формы химического соединения, способов внесения металлов в почву, сроков отбора образцов на анализы, изучение совместного воздействия элементов и др.

От правильного планирования, закладки и проведения эксперимента зависят все полученные в дальнейшем результаты.

1.6. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ АНТРОПОГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Обязательной составной частью мониторинговых исследований (помимо наблюдения и оценки) является прогноз состояния наблюдаемого объекта.

Важным вопросом мониторинга почв является вопрос о возможности распространения результатов, полученных на типичном участке при проведении экспедиционного исследования, модельного лабораторного или полевого опыта, на прилегающие территории. Этот вопрос является особенно актуальным при исследовании биологических свойств почв, отличающихся значительной вариабельностью.

Для решения данного вопроса необходим анализ пространственной структуры исследуемой территории. При помощи геостатистических методов можно проанализировать закономерности варьирования биологических свойств почвы в пространстве. Для этого образцы почвы для анализов отбираются с шагом 50 см на отрезке 50 м. В образцах определяется, например, каталазная активность почвы. По данным каталазной активности строится полувариограмма (Джонгман и др., 1999). Использование полувариограммы позволяет объективно проанализировать изменения исследуемого признака в пространстве, в частности, оценить однородность территории. Для этого необходимо методом максимального правдоподобия подобрать математическую модель соответствующую полученной полувариограмме (Джонгман и др., 1999).

Исследуемая территория может быть признана однородной в следующем случае: полученная полувариограмма каталазной активности может быть описана как модель с нулевым радиусом корреляции или 100% эффектом самородка (Джонгман и др., 1999)

$$\gamma(h) = c_0,$$

где γ — полувариограмма; h — шаг; c_0 — дисперсия, вызванная «эффектом самородка». Эта модель описывает ситуацию когда в принятом масштабе никакая структура данных не выявляется, то есть наблюдающаяся вариация является бесструктурной или «шумом». В этом случае можно констатировать тот факт, что исследуемая территория может быть признана однородной по отношению к каталазной активности при шаге измерений 50 см. Поскольку активность каталазы является характерным показателем биологических процессов в почве (Казеев, Колесников, 2002), то полученные выводы можно распространить на биологические свойства почвы в целом.

Авторские исследования показывают что, если исследуемая территория является достаточно однородной по растительности, рельефу, морфологии почвы, то она может быть признана однородной и по биологическим свойствам почвы. Поэтому, прогноз экологических последствий того или иного вида воздействия на почву, основанный на биологических показателях, может быть распространен на всю исследуемую территорию.

1.7. НОРМИРОВАНИЕ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ ПО СТЕПЕНИ НАРУШЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ПОЧВЫ

В результате нерациональной хозяйственной деятельности почва часто деградирует или даже полностью разрушается. Нами предложен интегральный эколого-биологический показатель состояния почвы, определяемый на основе наиболее информативных показателей биологической активности почвы, который можно использовать при оценке степени деградации почвы, ее нормировании (Колесников, Казеев, Вальков, 2001).

Рассмотрим возможность нормирования изменения свойств на примере загрязнения ее тяжелыми металлами (ТМ). Основываясь на результатах оригинальных исследований и анализе литературного материала по влиянию ТМ на свойства почв, с определенной долей обобщения можно констатировать следующее. При загрязнении почв ТМ нарушение информационных биогеоценотических функций происходит уже при содержании ТМ в почве до 1 ПДК, химических, физико-химических, биохимических и целостных биогеоценотических функций — 1-10 ПДК, физических функций — более 10 ПДК. Приведенные количественные придержки в наибольшей степени справедливы для черноземов. Но они варьируют в зависимости от генетических свойств почв, определяющих перевод ТМ в неподвижные нетоксичные формы.

Тот факт, что разные экологические функции почвы нарушаются при различной концентрации металла в почве, может лежать в основе экологического нормирования загрязнения почв ТМ.

Большинство предпринимаемых попыток нормирования загрязнения почв ТМ сводились к тому, чтобы определить предельно допустимую концентрацию металла в почве. Однако в силу объективных причин, таких как полифункциональность и гетерогенность почвы, разнообразие ее типов, разнородность химических соединений загрязняющих веществ, явления синергизма и антагонизма между атомами элементов, способность живых организмов к адаптации, а почвы к самовосстановлению и др., использование ПДК не всегда представляется оправданным. Перечисленные факторы требуют создания бесконечного множества ПДК загрязняющих веществ в почве для каждого конкретного случая, что нереально. Поэтому в ряде случаев целесообразнее нормировать загрязнение не по концентрации вещества в почве, а по реакции почвы на загрязнение.

Если мы хотим сохранить полноценное выполнение почвой своих экологических функций, т.е. рассматриваем почву как компонент биогеноса, а почвенный покров — как компонент биосферы, то нормирование загрязнения следует проводить по степени нарушения экологических функций почвы. Такое нормирование будет поистине экологическим.

Согласно ГОСТу 17.4.3.06–86, классификацию почв по степени загрязнения проводят по предельно допустимым количествам химических веществ в почвах и их фоновому содержанию. По степени загрязнения почвы делят на сильно-, средне- и слабозагрязненные. Если проводить экологическое нормирование загрязнения, поставив главной целью сохранение экологических функций почвы, то по ряду вышеизложенных причин целесообразнее использовать не ПДК загрязняющего вещества в почве, а интегральный показатель эколого-биологического состояния почвы. При снижении значений интегрального показателя в той или иной степени происходит нарушение определенных экологических функций почвы.

Предлагается следующая классификация почв по степени загрязнения ТМ на основе интегрального показателя эколого-биологического состояния почвы (табл. 2).

Таким образом, в качестве показателя степени нарушения экологических функций почвы можно использовать интегральный эколого-биологический показатель состояния почвы, рассчитанный на основе набора наиболее информативных показателей биологической активности почвы.

Каждый из деградационных процессов сопровождается снижением плодородия, нарушением экологических функций почвы, уменьшением биологической активности почвы, а значит, и снижением значений инте-

грального эколого-биологического показателя. Поэтому, последний может быть использован при определении экологических последствий деградационных процессов.

2.Классификация почв по степени загрязнения на основе интегрального показателя эколого-биологического состояния почвы

Почвы	Степень снижения интегрального показателя	Нарушаемые экологические функции*	Содержание в почве ТМ**
Не загрязненные	Не происходит	–	Фон
Слабозагрязненные	< 10 %	Информационные	Фон – 1 ПДК
Среднезагрязненные	10–25 %	Химические, физико-химические, биохимические; целостные	1–10 ПДК
Сильнозагрязненные	> 25 %	Физические	> 10 ПДК

*Классификация экологических функций по Е.Д. Никитину (1999).

**Для черноземов.

В таблице 3 дана шкала оценки степени деградации почв на основе интегрального эколого-биологического показателя ее состояния почвы.

3.Оценка степени деградации почв на основе интегрального эколого-биологического показателя

Степень деградации почвы	Степень снижения интегрального показателя	Нарушаемые экологические функции
Не происходит	Не происходит	–
Слабая	< 10 %	Информационные
Средняя	10–25 %	Химические, физико-химические, биохимические; целостные
Сильная	> 25 %	Физические

Предлагаемый подход оценки экологических последствий деградации почв на основе нарушения ее экологических функций, а также классификацию почв по степени деградации можно использовать при проведении следующих научных и природоохранных мероприятий:

- при биоиндикации и биодиагностике деградационных изменений в почве;
- при биомониторинге состояния почв, а также естественных и антропогенно нарушенных экосистем в целом;
- при оценке воздействия на окружающую среду;

- при экологическом нормировании загрязнения почв и других деградационных процессов;
- при разработке методов санации загрязненных почв;
- при определении предельно допустимой антропогенной нагрузки на территорию;
- при создании экологических карт (районирования, фактологических и прогнозных);
- при прогнозировании экологических последствий определенной хозяйственной деятельности на данной территории;
- при оценке риска катастроф;
- при проведении экологической экспертизы, паспортизации, сертификации территории или хозяйственного объекта и т.д.

1.8. ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ В МОНИТОРИНГЕ И ДИАГНОСТИКЕ ПОЧВ

Для выявления негативных последствий антропогенного воздействия используют мониторинг почвенного покрова. К сожалению, в предложенном длинном списке показателей мониторинга почвенного плодородия (Державин, Фрид, Янишевский, 1999) нет ни одного биологического (биохимического) показателя за исключением содержания гумуса, хотя неоднократно говорится о необходимости мониторинга биологических свойств. Такое положение недопустимо, так как деградационные явления, прежде всего, затрагивают биологические объекты, снижая биологическую активность (БА) и, в конечном счете, плодородие. Поэтому использование методов биологической диагностики, позволяет определить негативные последствия антропогенного воздействия на ранних стадиях. Особенно это касается диагностики разных загрязнений, методы определения которых дороги и требуют определения на сложных приборах. Кроме того, до сих пор нет четких ПДК многих загрязнителей (тяжелые металлы, пестициды и др.) для разных почв.

Биологические индикаторы обладают рядом преимуществ по сравнению с другими. Во-первых, это высокая чувствительность и отзывчивость на внешние воздействия, во-вторых, они позволяют проследить за негативными процессами на ранних стадиях процесса, в третьих, только по ним можно судить о воздействиях, не подвергающих существенному изменению вещественный состав почв (радиоактивное и биоцидное загрязнение). К существенным недостаткам можно отнести большую пространственную и временную вариабельность.

В настоящее время разработан большой набор биологических показателей, определяющих способность почвы обеспечивать растения факторами жизни, то есть определяющих потенциальное плодородие почв, и коррелирующих с урожайностью.

Оценка методов определения биологических свойств почв (главным образом микробиологических) была сделана Д.Г. Звягинцевым (1978) (рис. 1). Он определил понятие биологической активности, рассмотрел существующие методы определения, разделил их на потенциальные и актуальные, создал шкалы БА. Д.Г. Звягинцев констатировал существенные недостатки методов определения БА. Относительная чувствительность на внешние воздействия приведенных на рисунке методов определения БА обладают большими пространственными и временными колебаниями. Даже самый устойчивый показатель – общая численность бактерий – колеблется по сезонам в 2-4 раза (Звягинцев, 1978) и даже больше (Гайдамакина, 1975).

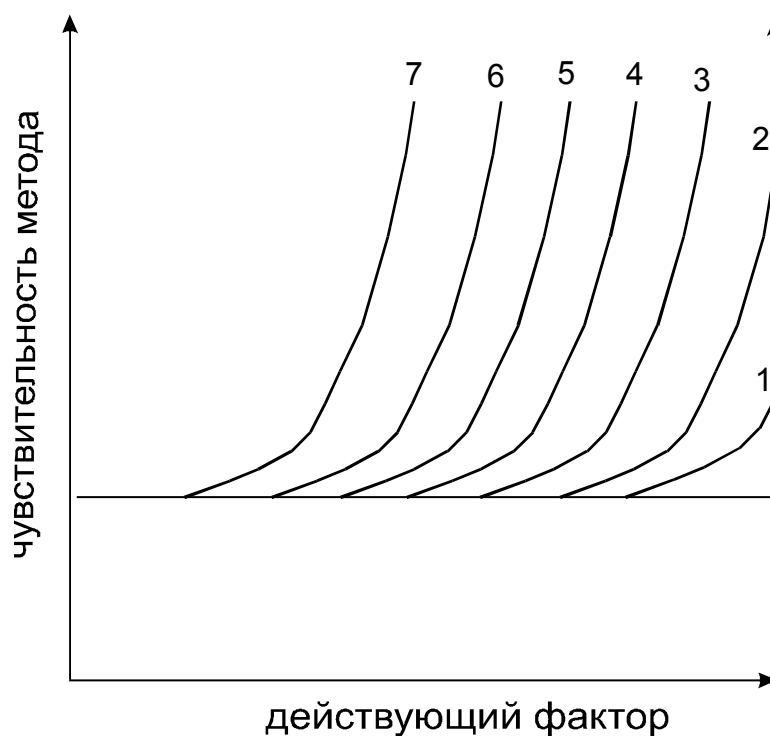


Рис.1. Относительная чувствительность различных методов в зависимости от величины действующего фактора (Звягинцев, 1978): 1 – прямой подсчет общего числа бактерий; 2 – определение ферментативной активности; 3 – определение длины грибного мицелия прямым микроскопическим методом; 4 – подсчет количества микроорганизмов методом посева; 5 – определение численности видовых популяций; 6 – определение интенсивности азотфиксации ацетиленовым методом; 7 – чувствительность хемотропии

Среди методов исследования биологических свойств почв выделяют микробиологические, зоологические, геоботанические, биохимические и др.

Несмотря на очевидные достоинства (доступность, наглядность, наличие чувствительных видов-индикаторов многих свойств почвы и т.д.) зоологические и геоботанические методы диагностики и индикации почв в настоящее время на большей части освоенной территории применяются ограниченно. На пахотных землях зоологические и геоботанические методы в биодиагностике малоприменимы.

Среди биохимических методов чаще всего применяют ферментативную активность. Известно, что активность почвенных ферментов может служить диагностическим показателем почвенного плодородия и его изменения в результате антропогенного воздействия. Применению ферментативной активности в качестве диагностического показателя способствуют высокая чувствительность к внешним воздействиям, простота определения, низкая ошибка опыта. По активности различных ферментов можно диагностировать большой ряд биохимических процессов в почвах: минерализация, гумусообразование, нитрификация, азотфиксация и т.д.

Использование ферментативной активности при биодиагностике дает более объективные данные, чем микробиологическая активность.

Интенсивность продуцирования почвой углекислого газа также часто называют интегральным показателем биологической активности. Различные почвы отличаются неодинаковой интенсивностью дыхания. Это делает возможным биодиагностику почв по интенсивности выделения углекислого газа. Так как биологические процессы тесно связаны с климатическими факторами, отмечается сезонность интенсивности “дыхания” почв. Почвы с щелочной реакцией в результате химического связывания меньше выделяют в атмосферу углекислый газ, чем кислые почвы.

Однако “дыхание” почв нельзя принять при рассмотрении типовых, подтиповых особенностей почв в качестве независимой переменной, т.к. интенсивность “дыхания” относится к лабильным современным признакам. В то же время “дыхание” в годовом цикле связано с суммарной биологической активностью и является четким и выразительным показателем измерения скоростей процессов в сезонной динамике, при изменении погодных условий, при загрязнении почв, применении пестицидов и т.д.

Применение микробиологических методов при биодиагностике чрезвычайно затруднено большой трудоемкостью и специфичностью. Для микробиологической диагностики почв рекомендуются применение сукцессионного метода, метода инициации, метода мультисубстратного тестирования и ряд других. Численность почвенной микрофлоры вообще подвержена очень значительным пространственным и временным измене-

ниям (иногда на несколько порядков). Даже в почвах контрастных биогеоценозов (пустыни и болота) общая численность бактерий в отдельных образцах колеблется случайным образом в широких пределах 10^2 - 10^{10} и не зависит от географического района, типа биотопа, и времени взятия образца (Добровольская, Чернов, Звягинцев, 1997). Резкие колебания количественного и качественного состава микрофлоры почвы в зависимости от физических и химических свойств почвы, ее положения, освещения, влагоемкости, времен года и от целого ряда метеорологических и климатических факторов описывал В.Л. Омелянский еще в 1924 г.

Поэтому микробиологи рекомендуют 10 кратную (Марфенина, 1994) и даже 25 кратную (Звягинцев, 1978) повторность анализа. В то же время антропогенное воздействие, выражаемое, например, в загрязнении низкими дозами тяжелых металлов, иногда вызывает значительное повышение общей численности микроорганизмов (Марфенина, 1994; Колесников и др., 1999). Для диагностики антропогенного воздействия рекомендуется определение качественного состава микрофлоры, что мало применимо в массовых анализах и, кроме того, под силу лишь немногим узким специалистам микробиологам. Кроме того, в последнее время появились работы, ставящие под сомнение применение в мониторинге и диагностике и качественного состава микрофлоры. «Для бактерий список организмов в ландшафте определяется, прежде всего, количеством затраченного труда на идентификацию и представляется заведомо бесплодной задачей, поскольку большинство видов – космополиты, а сравнение с другими ландшафтами потребует многократного увеличения объема работы без надежды на осмысленное заключение» (Заварзин, 1994). «Из-за методических особенностей учета и невозможности визуального контроля при таксономическом анализе всегда будут оставаться сомнения в полноте таксономических списков» (Добровольская и др., 1997). В результате даже микробиологи сомневаются в высокой эффективности широкого использования качественного состава микрофлоры в мониторинге почв (Добровольская и др., 1997; Звягинцев и др., 1999; Добровольская и др., 2001).

Исходя из вышесказанного, мы рекомендуем при диагностике антропогенного воздействия на почвы замену сложных, трудоемких и недостаточно точных микробиологических методов более точными (ошибка определения 5-8%) и простыми в исполнении биохимическими, а именно определением ферментативной активности почв.

Для дальнейшего совершенствования применения биологических методов в диагностике и мониторинге почв авторами была сделана сравнительная оценка традиционных и широко распространенных показателей биологических свойств почв. В отличие от оценки Д.Г. Звягинцева (1978),

кроме чувствительности оценивались и другие категории анализов биологических показателей.

В таблице 4 проведена оценка биологических показателей, применяемых в целях диагностики и мониторинга почв. Приведенные методы относятся к разным дисциплинам науки (зоология, альгология, микробиология, биохимия, почвоведение) и поэтому, чаще всего, применяются по отдельности. Практически все методы, приведенные в таблицах, опробованы авторами для мониторинга биологического состояния практически всех почв Юга России (более 20 типов и подтипов) и диагностики антропогенного воздействия на них. Приведенная оценка субъективна, однако она дает общее представление о методах биодиагностики с учетом некоторых категорий показателей (чувствительность, информативность, производительность, точность, квалификация и др.). Приведенная оценка проведена на основании собственного опыта авторов и на литературных отзывах. Традиционные методы определения биологических свойств оценивались по нескольким категориям. По каждой категории методы оценивались по десятибалльной системе. Затем выводилась средняя оценка по всем категориям. Чем выше балл, тем больше метод пригоден для диагностики и мониторинга почв.

В целом методы исследования биологического состояния почв получили 6,1 балл из 10 возможных. Такая высокая оценка связана с высокой чувствительностью и информативностью методов биодиагностики, доступностью и достаточно высокой точностью. Несколько хуже обстоят дела с пространственным и временным варьированием показателей, которые несколько понижают общую оценку показателей.

Как показывают результаты оценки, наиболее приемлемы для диагностики и индикации биохимические показатели. Усредняя оценки по различным категориям, эти методы получили 7-8 баллов из 10 возможных. Максимальный средний балл получили методы исследования ферментативной активности почв — 8,8 балла. Высокую оценку получил показатель содержания гумуса, в значительной мере определяющий почвенное плодородие. Однако при некоторых воздействиях этот показатель ввиду своей большой консервативности малоприменим. Особенно это касается различных химических загрязнений, переуплотнения, подтопления почв, в диагностике которых информативность этого показателя приближается к нулю. Методы оценки биогенности почвы — заселенности разными организмами — чувствительны и достаточно информативны, однако, в силу ряда причин (высокое пространственное и временное варьирование, трудности в определении качественного состава и др.) они менее пригодны. В среднем они набрали лишь 3-5 баллов.

Несмотря на высокую эффективность применения некоторых биологических показателей, лучшие результаты в диагностике различных антропогенных воздействий дает все-таки комплексная оценка биологических свойств почв с использованием методики определения интегрального показателя БА (Казеев, 1996; Вальков, Казеев, Колесников, 1999; Колесников, Казеев, Вальков, 2000).

Аналогичная оценка была проведена для оценки изученности тех же методов оценки БА основных почв Юга России. Использовались собственные данные и доступные литературные источники. В таблице 5 приведена оценка отдельных показателей БА и общая оценка изученности биологии почв. Сразу приходится признать, что почвы Юга России исследованы слабо. Усредненная по всем почвам Юга России оценка изученности биологических свойств почв равна всего лишь 3,2 баллам из 10 возможных. Среди отдельных показателей относительно неплохо исследованы гумус и урожайность — 5-6 баллов. Совсем плохо дело обстоит с изученностью таких показателей как альгофлора, качественный состав биоты. Это неслучайно и не говорит о том, что эти исследования вообще на Юге России не проводятся. Они проводились и проводятся биологами, но, чаще всего, в отрыве от приуроченности к определенному типу почв. Например, многочисленные данные почвенных зоологов, посвященные почвенной фауне, не содержат сведений о типе почв, в лучшем случае приводятся лишь ландшафтная характеристика местообитаний. Почвоведы вопросами исследования качественного состава биоты владеют слабо, ввиду недостаточной квалификации по данным вопросам. Выход состоит в тесном сотрудничестве исследователей разных областей.

Среди разных почв неплохо обстоят дела с исследованием черноземов, к которым традиционно уделяется много внимания, ввиду их особой роли в сельскохозяйственном производстве и огромными площадями распространения. Некоторые же типы почв вообще являются «белым пятном» для почвенных биологов. Практически не исследовано биологическое состояние желтоземов, коричневых, горно-луговых и дерново-карбонатных почв. В основном это связано со слабым сельскохозяйственным освоением этих почв (бурые полупустынные), их незначительной площадью (желтоземы, коричневые) или удаленностью от исследователей (горно-луговые, дерново-карбонатные).

ГЛАВА 2. ПОЛЕВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВ

В полевых условиях изучают и определяют почвы и дают им названия по внешним, так называемым морфологическим признакам, которые отражают внутренние процессы, происходящие в почвах, их происхождение (генезис) и историю развития.

Н.М. Сибирцев считал, что по морфологическим (внешним) признакам можно определить почву так же, как определяется минерал, растение или животное. Поэтому в полевых условиях особенно важно правильно описать почву, отметить все ее признаки. *Ошибки, допущенные в поле при закладке, описании разреза и отборе образцов, затем невозможно исправить никакими самыми точными и сложными анализами в лаборатории.*

2.1. ТИПЫ ПОЧВЕННЫХ РАЗРЕЗОВ

Для изучения и определения почв в природе, установления границ между различными почвами, взятия образцов для анализов закладывают специальные ямы, которые принято называть почвенными разрезами. Они бывают трех типов: полные (основные) разрезы, полуямы (контрольные), прикопки (поверхностные). На карте обозначаются: полные разрезы — крестиком (+), полуямы — кружком (0), прикопки — точкой (•).

Полные, или основные, разрезы (рис. 2) делают с таким расчетом, чтобы были видны все почвенные горизонты и частично верхняя часть неизменной или малоизменной материнской породы. Их закладывают в наиболее типичных, характерных местах. Они служат для детального изучения морфолого-генетических признаков почв и отбора образцов по генетическим горизонтам для физико-химических, биологических и других анализов, определения окраски, структуры и т.д. Глубина основных почвенных разрезов сильно варьирует в зависимости от мощности почв и целей исследований. В степной зоне юга России глубина основных разрезов — около 1,5 м, на сверхмощных черноземах Краснодарского края до 3,0 м. Обычно в практике полевых почвенных исследований и картирования почв почвенные разрезы закладывают на глубину 1,5-2 м. При почвенно-мелиоративных и почвенно-грунтовых исследованиях основные разрезы делают глубиной не менее 2 м, часто с дополнительным бурением до грунтовой воды. При исследовании горных и переувлажненных почв глубина разреза часто не превышает 1 м.

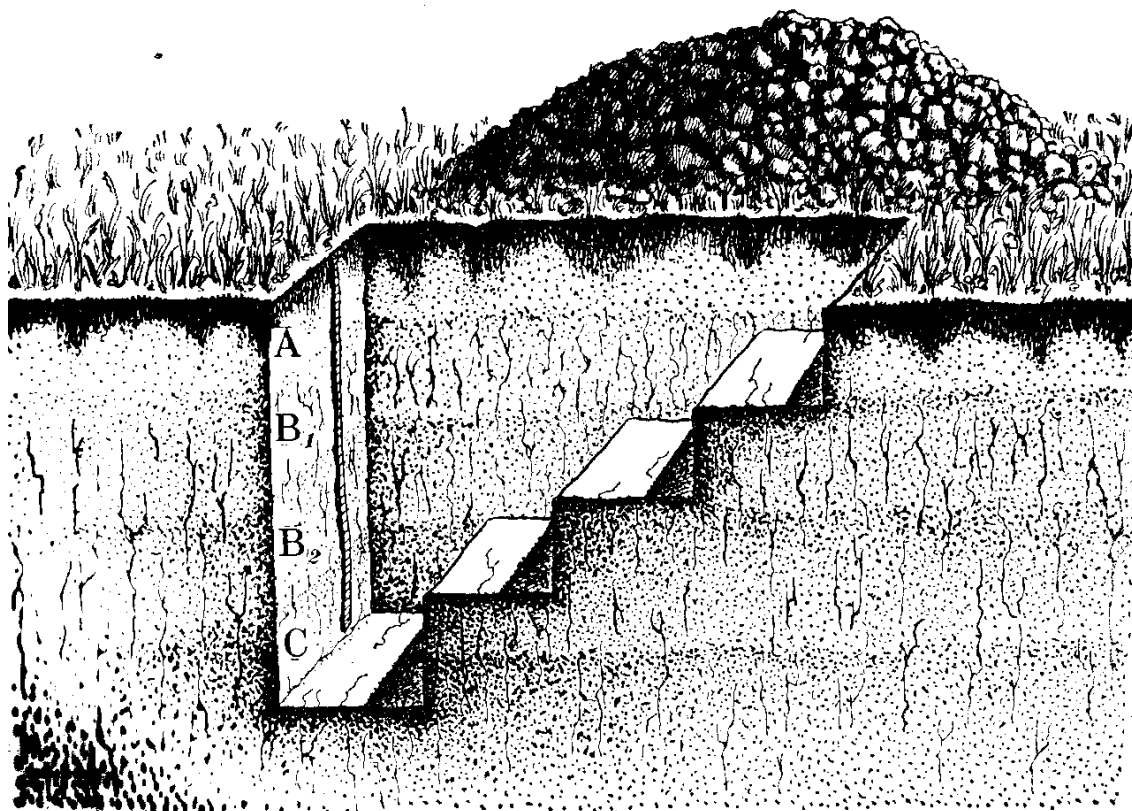


Рис. 2. Полнопрофильный почвенный разрез

Полуямы, или контрольные разрезы, закладывают на меньшую глубину — от 75 до 125 см, обычно до начала материнской породы. Они служат для дополнительного (контрольного) изучения основной части почвенного профиля — мощности гумусовых и других горизонтов, глубины вскипания и залегания солей, степени выщелоченности, оподзоленности, солонцеватости, солончаковости и др.

Прикопки, или мелкие, поверхностные разрезы, глубиною менее 75 см, служат главным образом для уточнения почвенных границ выявленных полными разрезами и полуямами.

Все почвенные разрезы (полные, полуямы и прикопки), заложенные на обследованной территории и описанной в почвенном дневнике, должны иметь единую нумерацию.

2.2. ЗАЛОЖЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ РАЗРЕЗОВ

Выбор мест для заложения почвенных разрезов, их правильное распределение на обследуемой территории — дело очень ответственное, и к нему нужно относиться очень внимательно.

Прежде всего, исследователь должен самым тщательным образом осмотреть и проверить степень однородности рельефа и растительности

той части местности, для характеристики почвенного покрова которой намечается почвенный разрез. ***Разрез необходимо закладывать в наиболее характерном, типичном месте обследуемой территории.*** Почвенные разрезы не должны закладываться вблизи дорог, рядом с канавами, свалками, отстойниками на нетипичных для данной территории элементах микрорельефа (понижения, кочки).

На выбранном для почвенного разреза месте копают яму размером 0,8х1,5х2,0 м так, чтобы три стенки ее были отвесны, т.е. вертикальны, а четвертая — со ступеньками. Передняя «лицевая» стенка, которая предназначена для изучения почвенного разреза, должна быть обращена к солнцу. Почву из ямы необходимо выбрасывать на длинные боковые стороны, но ни в коем случае не в сторону «лицевой» стенки, так как это приводит к ее «загрязнению» и даже к разрушению верхней части стенки почвенного разреза. Копая ямы, полезно отложить недалеко от разреза по одному образцу почв из каждого горизонта для дополнительного просмотра и изучения окраски, структуры новообразований и других признаков почв. Когда яма готова, необходимо, в первую очередь, определить характер почвообразующей породы, ее гранулометрический состав, засоление, степень увлажнения и взять образец материнской породы для последующего изучения или анализа, так как в дальнейшем при препарировании нижняя часть «лицевой» стенки и дно ямы будут не только засорены, но и частично засыпаны осыпающейся почвенной массой из верхних горизонтов. После этого «лицевую» стенку гладко очищают лопатой и одну (правую) половину стенки препарируют стамеской или маленькой лопаткой, для того чтобы лучше рассмотреть морфолого-генетические признаки почв, а вторую (левую) половину стенки оставляют в гладко зачищенном виде для сравнения и контроля. Затем необходимо приступить к изучению морфолого-генетических признаков почв и описанию почвенного разреза.

2.3. ОПИСАНИЕ ПОЧВЕННЫХ РАЗРЕЗОВ

Известно, что в поле можно изучать, и определять свойства почв, давать им названия по внешним, так называемым морфолого-генетическим, признакам, ибо эти признаки отражают внутренние свойства почвы, ее жизнь. По морфолого-генетическим признакам можно читать историю развития почв, выяснить ее генезис и до некоторой степени установить агрономическую ценность почв. Поэтому при изучении почв в поле и морфологическом описании почвенного разреза очень важно правильно «прочитать» почвенный разрез.

Для описания почвенных разрезов рекомендуются различные формы полевых почвенных дневников или журналов в плотном переплете. Ниже дается примерная форма ведения дневника.

Техника и последовательность работ при изучении и описании почвенного разреза и ведении дневника следующие.

1. Записать номер, дату и географическое положение разреза, отметить характер рельефа, точно указать, на каком элементе рельефа сделан разрез, описать угодье и его состояние; растительность (состав, густота и состояние). состояние поверхности (заболоченность, кочковатость, трещиноватость, засоленность, каменистость и другие характерные особенности); дать агрономическую оценку почв с учетом данных о сельскохозяйственной ценности почвы; отметить материнские и подстилающие породы и глубину грунтовых вод, если они обнаружены. Определить местоположение разреза и его привязку. Ознакомление с рельефом, растительностью, ее состоянием и другими характерными особенностями участка, на котором сделан разрез, проводится в тот промежуток времени, который необходим для копки предназначенного к изучению разреза, т. е. около 1 ч.

2. Определить глубину и характер вскипания почвы от 10 % раствора соляной кислоты. Для этого на свежепрепарированной лицевой стенке разреза закрепляют клеенчатый сантиметр так, чтобы ноль совпал с поверхностью почвы, и последовательно сверху донизу капают из маленькой пипетки или пластикового пузырька на почву соляную кислоту, которая при наличии карбонатов кальция дает «вскипание» различной интенсивности (слабое, среднее, сильное или бурное). Сведения о глубине и характере вскипания сразу же записываются в почвенный дневник. В той части стенки, где определялась глубина и характер вскипания от соляной кислоты, образцы почв для анализа брать нельзя.

3. Определить мощность каждого горизонта и подгоризонта почв с последующим подробным изучением их морфолого-генетических признаков: гранулометрического состава, физических свойств и других особенностей (окраска, структура, влажность, плотность, скважность, новообразования, включения, корневая система, характер перехода одного горизонта в другой). Сделать соответствующие записи в почвенном дневнике.

4. В некоторых случаях для более полной характеристики почв (засоленные, переувлажненные и др.) произвести некоторые простые химические анализы (определение pH, хлористых и сернокислых солей, наличия железа, соды и др.); определить некоторые физические свойства (влажность, плотность и др.), не требующие сложного оборудования.

5. Дать полевое определение почвы, установить ее ценность. В названии почв необходимо отразить тип, подтип, вид, разновидность и мате-

ринскую породу, например: чернозем обыкновенный среднемощный тяжелосуглинистый на лессах. Наметить примерные границы ее распространения на изучаемой территории и, наконец, взять почвенные образцы для анализов, а при необходимости и монолит. Почвенный разрез после его изучения, описания и отбора образцов должен быть зарыт (закопан).

2.4. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ПОЧВ

Почвы обладают внешними, так называемым морфологическим признакам, которые отражают внутренние процессы, происходящие в почвах, их происхождение (генезис) и историю развития.

Морфологические признаки — внешние признаки почвы, по которым ее можно отличить от горной породы или одну почву от другой, а также приблизительно судить о направлении и степени выраженности почвообразовательного процесса. Главные морфологические признаки почвы: строение почвенного профиля, мощность почвы и ее отдельных горизонтов, окраска, структура, гранулометрический состав, сложение, новообразования и включения.

Строение почвенного профиля

Общий вид почвы со всеми почвенными горизонтами называется строением почвы. Совокупность генетических горизонтов образует генетический профиль почвы. По С. А. Захарову, строение почвы — это результат генезиса почвы, постепенного развития ее из материнской породы, которая дифференцируется на горизонты в процессе почвообразования. Почвенный профиль специфичен для каждого типа почвообразования.

Генетические почвенные горизонты — это однородные, обычно параллельные поверхности слои почвы, составляющие почвенный профиль и различающиеся между собой по морфологическим признакам.

Наиболее распространенным в нашей стране является использование следующих символов генетических горизонтов почв:

Горизонт A_0 — лесная подстилка или степной войлок. Представляет собой опад растений на различных стадиях разложения — от свежего до полностью разложившегося. Это самая верхняя часть почвенного профиля. Встречается только в естественных почвах.

Горизонт А — гумусовый горизонт. Чаще всего наиболее темноокрашенный горизонт в верхней части почвенного профиля, в котором происходит накопление органического вещества в форме гумуса, тесно связанного с минеральной частью почвы. Цвет этого горизонта варьируется от черного, бурого, коричневого до светло-серого, что зависит от состава и количества гумуса. Мощность гумусового горизонта колеблется от нескольких сантиметров до 1,5 м и более.

Горизонт Т — торфяной горизонт. Содержание органического вещества — более 70% со степенью разложенности менее 50%. Поверхностный органогенный горизонт с содержанием органического вещества от 30 до 70%, состоящий из разложенных органических остатков (степень разложения — больше 50%) и гумуса с примесью минеральных компонентов, называют перегнойным горизонтом.

Горизонт А_д — дерновый. Горизонт, в котором живых корней растений более 50 %.

Горизонт А_п или *А_{пах}* — пахотный. Горизонт, измененный продолжительной сельскохозяйственной обработкой, сформированный из различных почвенных горизонтов на глубину вспашки — обычно 25-30 см. Встречается только в пахотных почвах.

Горизонт А₁ — минеральный гумусово-аккумулятивный. Встречается в почвах, где происходит разрушение алюмосиликатов и образование подвижных органо-минеральных веществ. Верхний темноокрашенный горизонт, содержащий наибольшее количество органического вещества.

Горизонт А₂ — элювиальный (подзолистый или осолоделый). Формируется под влиянием кислотного или щелочного разрушения минеральной части. Это сильно осветленный, бесструктурный или слоеватый рыхлый горизонт, обедненный гумусом и другими соединениями, а также илистыми частицами за счет вымывания их в нижележащие слои и относительно обогащенный остаточным кремнеземом.

Горизонт В — переходный или иллювиальный. В первом случае (черноземный тип почвообразования) в этом горизонте не наблюдается существенных перемещений веществ в почвенной толще, горизонт В является переходным слоем к почвообразующей породе, характеризуется постепенным ослаблением процессов аккумуляции гумуса, разложения первичных минералов. Во втором случае (подзолистый тип почвообразования) горизонт В располагается под элювиальным горизонтом и представляет собой бурый, охристо-бурый, красновато-бурый, уплотненный и утяжеленный, хорошо оструктуренный горизонт, характеризующийся накоплением глины, окислов железа, алюминия и других коллоидных веществ за счет вымывания их из вышележащих горизонтов.

Горизонт G — глеевый. Характерен для почв с постоянно избыточным увлажнением (болотных, тундровых, аллювиальных и др.), которое вызывает восстановительные процессы в почве и придает горизонту характерные черты — сизую, серовато-голубую или грязно-зеленую окраску, наличие ржавых и охристых пятен, слитость, вязкость и т.д.

Горизонт С — материнская (почвообразующая) горная порода. Из этой породы сформировалась данная почва. На этой глубине порода уже

не затронута специфическими процессами почвообразования (аккумуляцией гумуса, элювиированием и т.д.).

Горизонт Д — подстилающая горная порода. Эта порода залегает ниже материнской (почвообразующей) и отличается от нее по своим свойствам (главным образом по литологии). Встречается только в случае перекрывания горных пород.

Кроме указанных горизонтов выделяются переходные горизонты, для которых применяются двойные обозначения, например A_1A_2 — горизонт, прокрашенный гумусом и имеющий признаки оподзоленности; A_2B — горизонт, имеющий черты подзолистого горизонта (A_2) и иллювиального (B); BC — переходный горизонт от переходного к материнской породе и т.д. Второстепенные признаки обозначаются индексом с дополнительной малой буквой, например B_{Ca} — переходный горизонт с видимыми вторичными выделениями карбонатов в виде налетов, прожилок, псевдомицелия, белоглазки, редких конкреций; B_g — иллювиальный горизонт с пятнами оглеения, B_t — метаморфический горизонт, характеризующийся аккумуляцией глины без заметных следов ее перемещения и др. То есть, индексы при обозначении генетических горизонтов ставятся в зависимости от степени выраженности того или иного процесса, протекающего в данном горизонте.

Типы строения почвенного профиля

По характеру соотношения генетических горизонтов выделяют ряд типов почвенных профилей. Тип профиля определяется типом почвообразования, возрастом почвы, нарушением природными или антропогенными педотурбациями. Различают простое и сложное строение почвенного профиля.

Простое строение почвенного профиля включает пять типов.

Примитивный профиль имеют молодые почвы, когда почвообразованием затронута лишь поверхностная часть породы. Мощность такого профиля составляет несколько сантиметров и он слабо дифференцирован на горизонты.

Неполноразвитый профиль свойственен почвам, формирующимся на массивно-кристаллических плотных породах или крутых склонах. Мощность профиля — несколько десятков сантиметров. При этом представлен полный набор генетических горизонтов, присущих данному типу почвообразования, но с небольшой их мощностью. Такие профили часто имеют горные почвы.

Нормальный профиль характерен для зрелых почв, формирующихся на рыхлых породах в равнинных условиях. Почвы имеют полный набор генетических горизонтов, свойственных данному типу почвообразования.

Слабодифференцированный профиль присущ почвам, развивающимся на породах, бедных легко выветривающимися минералами (кварцевые пески, древние ферралитные коры выветривания). Генетические горизонты слабо выражены, выделяются с трудом и очень постепенно сменяют друг друга.

Нарушенный (эродированный) профиль имеют эродированные почвы, верхняя часть профиля которых уничтожена эрозией.

Сложное строение почвенного профиля также включает пять типов.

Реликтовый профиль содержит различные по генезису погребенные горизонты (иногда целые профили) или горизонты, характерные для предшествующих фаз почвообразования.

Многочленный профиль свойствен почвам, формирующимся на многочисленных породах при их смене в пределах почвенной толщи.

Полициклический профиль формируется в условиях периодического отложения почвообразующего материала (речного аллювия, вулканического пепла, золых наносов).

Нарушенный (перевернутый) профиль образуется при перемещении нижних горизонтов на поверхность почвы. Причины могут быть как антропогенные (например, при плантажной вспашке), так и природные (ветровал в лесу, деятельность землероев).

Мозаичный профиль образуется при большой пространственной неоднородности сочетания генетических горизонтов.

С другой стороны, почвенные профили разделяют по характеру распределения веществ.

Аккумулятивный профиль имеют почвы с максимальным накоплением тех или иных веществ с поверхности и снижением их содержания с глубиной (например, распределение гумуса). При этом кривая распределения вещества может быть вогнутой (регрессивно-аккумулятивный профиль), выпуклой (прогрессивно-аккумулятивный) и прямой (равномерно-аккумулятивный).

Элювиальный профиль характеризуется минимумом вещества на поверхности и увеличением его содержания с глубиной (например, распределение карбоната кальция). Кривая распределения вещества может быть вогнутой (регрессивно-элювиальный профиль), выпуклой (прогрессивно-элювиальный) и прямой (равномерно-элювиальный).

Элювиально-иллювиальный профиль наблюдается при минимуме вещества в верхней части и максимуме в средней или нижней.

Грунтово-аккумулятивный профиль отличается накоплением веществ из грунтовых вод в нижней и средней части профиля.

Недифференцированный профиль характеризуется равномерным содержанием вещества по всей почвенной толще.

Мощность почвы и ее отдельных горизонтов

Мощность почвы — это толщина ее от поверхности вглубь до слабо затронутой почвообразовательными процессами материнской породы. У разных почв мощность неодинакова, от 40-50 см до 150-200 см и более.

Мощность почвенного горизонта — это толщина горизонта от поверхности почвы или вышележащего горизонта до нижележащего горизонта. Границы почвенных горизонтов и подгоризонтов устанавливают по совокупности всех признаков (цвет, структура, сложение, плотность и др.).

Характер перехода между горизонтами почвы

Граница между почвенными горизонтами характеризуется по двум признакам. По форме она может быть *ровной, волнистой, карманной, языковатой, затечной, размытой, пильчатой, полисадной*. По степени выраженности обычно различают три типа переходов: *резкий переход* — смена одного горизонта другим происходит на протяжении 2-3 см; *ясный переход* — смена горизонтов происходит на протяжении 5 см; *постепенный переход* — очень постепенная смена горизонтов на протяжении более 5 см.

Окраска почвы

Цвет почвы наиболее доступный для наблюдения морфологический признак. Он широко используется в почвоведении для присвоения названий почвам (чернозем, краснозем, желтозем, серозем и др.).

Окраска почв зависит от ее химического состава, условий почвообразования, влажности. Гумусовые вещества придают почве черную, темно-серую и серую окраску; соединения железа (III) — красную, оранжевую и желтую, а соединения железа (II) — сизую и голубоватую окраску; кремнезем, карбонат кальция, каолинит, а также гипс и легкорастворимые соли — белую и белесую окраски. Различное сочетание указанных групп веществ определяет большое разнообразие почвенных цветов и оттенков.

Верхние горизонты окрашены гумусом в темные цвета. Чем большее количество гумуса содержит почва, тем темнее окрашен горизонт. Наличие железа и марганца придает почве бурые, охристые, красные тона. Белесые, белые тона предполагают наличие процессов оподзоливания (вымывания продуктов разложения минеральной части почв), осолодения, засоления, окарбонирования, т.е. присутствие в почве кремнезема, каолина, углекислого кальция и магния, гипса и других солей.

Почвы редко бывают окрашены в какой-либо один чистый цвет. Обычно окраска почв довольно сложная и состоит из нескольких цветов (например, серо-бурая, белесовато-сизая, красновато-коричневая и т.д.), причем название преобладающего цвета ставится на последнем месте.

Для определения окраски почвенного горизонта необходимо: а) установить преобладающий цвет; б) определить насыщенность этого цвета (темно-, светлоокрашенная); в) отметить оттенки основного цвета.

При определении окраски почвы в полевых условиях необходимо учитывать влажность почвы и степень освещенности почвенного разреза. Влажная почва имеет более темную окраску, чем воздушно-сухая. В тени почва выглядит темнее, чем на солнце.

Влажность почвы

Влажность не является устойчивым признаком какой-либо почвы или почвенного горизонта. Она зависит от многих факторов: метеорологических условий, уровня грунтовых вод, гранулометрического состава почвы, характера растительности и т.д. Например, при одинаковом содержании влаги в почве песчаные (легкие) горизонты будут казаться влажнее глинистых (тяжелых).

При описании почвенного разреза используют пять степеней влажности почв: 1) *сухая почва* пылит, присутствие влаги в ней на ощупь не ощущается, не холодит руку; влажность почвы близка к гигроскопической (влажность в воздушно-сухом состоянии); 2) *влажноватая почва* холодит руку, не пылит, при подсыхании немного светлеет; 3) *влажная почва* — на ощупь явно ощущается влага; почва увлажняет фильтровальную бумагу, при подсыхании значительно светлеет и сохраняет форму, приданную почве при сжатии рукой; 4) *сырая почва* при сжимании в руке превращается в тестообразную массу, а вода смачивает руку, но не сочится между пальцами; 5) *мокрая почва* — при сжимании в руке из почвы выделяется вода, которая сочится между пальцами; почвенная масса обнаруживает текучесть.

Степень влажности влияет на выраженность других морфологических признаков почвы, что необходимо учитывать при описании почвенного разреза. Например, влажная почва имеет более темный цвет, чем сухая. Кроме того, степень влажности оказывает влияние на сложение, структуру почвы и т.д.

Гранулометрический состав

Твердая фаза почв и почвообразующих пород состоит из частиц различной величины — механических элементов. В зависимости от размера механических элементов выделяют две большие фракции: *физический песок* ($>0,01$ мм) и *физическая глина* ($<0,01$ мм).

Гранулометрический состав — это относительное содержание в почве или породе фракций механических элементов. В основу классификации почв по гранулометрическому составу положено соотношение в ней физического песка и физической глины. По гранулометрическому составу

почва бывает: песчаная (рыхло-песчаная, связно-песчаная), супесчаная, суглинистая (легкосуглинистая, среднесуглинистая, тяжелосуглинистая), глинистая (легкоглинистая, среднеглинистая, тяжелоглинистая). Песчаные и супесчаные почвы легко поддаются обработке и называются *легкими*, а тяжелосуглинистые и глинистые почвы — *тяжелыми*.

В полевых условиях возможно определение гранулометрического состава визуально и на ощупь. Наиболее удобен «мокрый» способ определения гранулометрического состава (рис. 3).

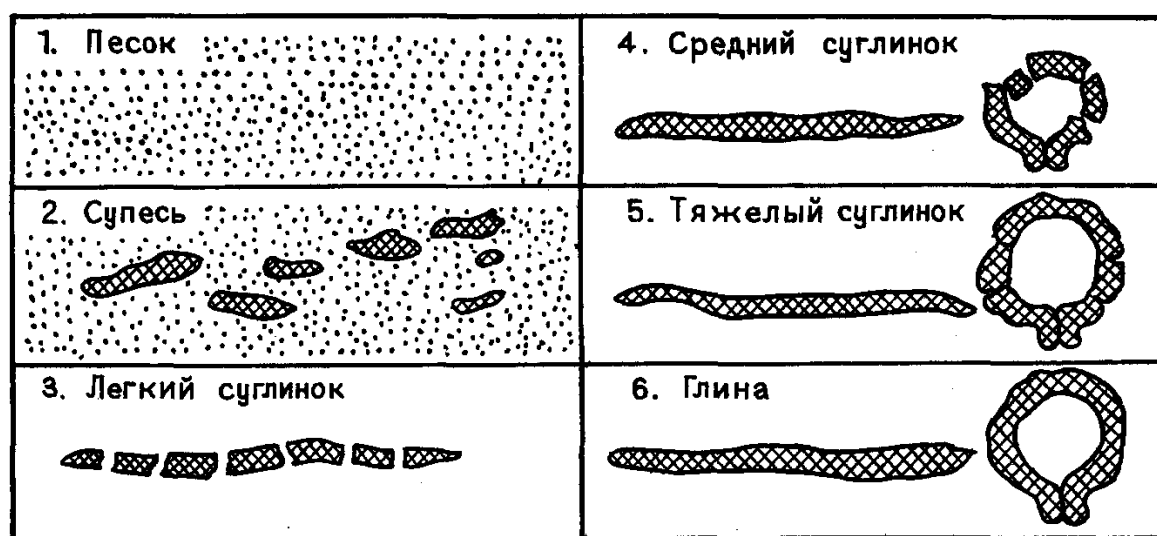


Рис. 3. «Мокрый» способ определения гранулометрического состава (по Н.А. Качинскому): 1) «шнур» не образуется; 2) зачатки «шнура»; 3) «шнур» дробится при раскатывании; 4) «шнур» сплошной, кольцо распадается при свертывании; 5) «шнур» сплошной, кольцо с трещинами; 6) «шнур» сплошной, кольцо стойкое.

Структура

Почва может быть структурной и бесструктурной. *Структура почвы* — взаимное расположение структурных отдельных (агрегатов) определенной формы и размеров. Агрегаты состоят из соединенных между собой частиц (механических элементов).

Различают три основных типа структуры (рис. 4, табл. 6), каждый из которых в зависимости от характера ребер, граней подразделяются на роды, а в зависимости от размера на виды.

Сложение почвы

Сложение почвы — взаимное расположение и соотношение структурных отдельных и пор в почве. Это внешнее выражение плотности и пористости почвы. Сложение почвы зависит от ее структуры, гранулометрического и химического состава и от влажности почвенных горизонтов.

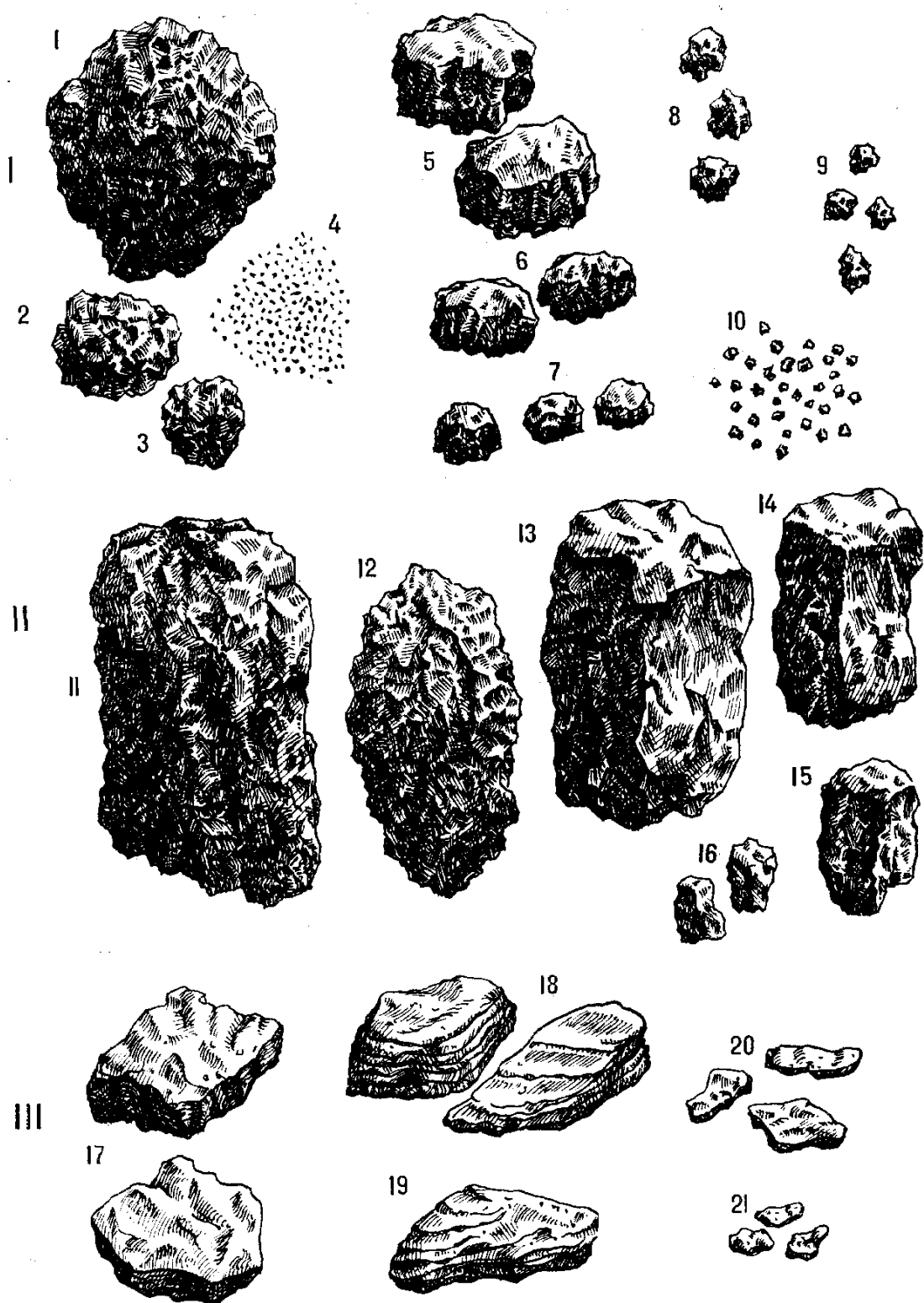


Рис. 4. Типичные структурные элементы почв (по С.А.Захарову).

I тип: 1) крупнокомковатая, 2) среднекомковатая, 3) мелкокомковатая, 4) пылеватая, 5) крупноореховатая, 6) ореховатая, 7) мелкоореховатая, 8) крупнозернистая, 9) зернистая, 10) порошистая. II тип: 11) столбчатая, 12) столбовидная, 13) крупнопризматическая, 14) призматическая, 15) мелкопризматическая, 16) тонкопризматическая. III тип: 17) сланцевая, 18) пластинчатая, 19) листовая, 20) грубочешуйчатая, 21) мелкочешуйчатая.

6.Классификация структурных отдельностей почв (С.А. Захаров)

Типы	Роды	Виды	Размеры
I. Кубовидный (равномерное развитие структуры по трем взаимно перпендикулярным осям)	А. Грани и ребра выражены плохо, агрегаты большей частью сложны и плохо оформлены:		
	1) глыбистая	Крупноглыбистая	Ребро куба > 10 см
	2) комковатая	Мелкоглыбистая	10-5 см
		Крупнокомковатая	5-3 см
		Комковатая	3-1 см
		Мелкокомковатая	1-0,5 см
	3) пылеватая	Пылеватая	< 0,5 мм
	Б. Грани и ребра хорошо выражены, агрегаты ясно оформлены:		
	4) ореховатая	Круппоореховатая	> 10 мм
		Ореховатая	10-7 мм
		Мелкоореховатая	7-5 мм
	5) зернистая	Крупнозернистая.	5-3 мм
		Зернистая (крупитчатая)	3-1 мм
		Мелкозернистая (порошистая)	1-0,5мм
II. Призмовидный (развитие структуры главным образом по вертикальной оси)	А. Грани и ребра плохо выражены, агрегаты сложны и мало оформлены:		
	6) столбовидная	Крупностолбовидная	Диаметр > 5 см
		Столбовидная	5-3 см
		Мелкостолбовидная	< 3 см
	Б. Грани и ребра хорошо выражены:		
	7) столбчатая	Круппостолбчатая	> 5 см
		Столбчатая	5-3 см
		Мелкостолбчатая	<3 см
	8) призматическая	Крупнопризматическая	>5 см
		Призматическая	5-3 см
		Мелкопризматическая	3-1 см
		Карандашная	< 1 см
III. Плитовидный (развитие структуры по горизонтальным осям)	9) плитчатая	Сланцеватая	Толщина > 5 мм
		Плитчатая	5-3 мм
		Пластинчатая	3-1 мм
		Листоватая	< 1 мм
	10) чешуйчатая	Скорлуповатая	>3 мм
		Грубочешуйчатая	3-1 мм
		Мелкочешуйчатая	<1 мм

По плотности в сухом состоянии сложение бывает слитое, плотное, рыхлое и рассыпчатое.

Слитое (очень плотное) сложение — лопата или нож при сильном ударе входят в почву на незначительную глубину, не более 1 см; характерно для слитых черноземов, иллювиальных горизонтов солонцов.

Плотное сложение — лопата или нож при большом усилии входят в почву на глубину 4-5 см и почва с трудом разламывается руками; типично для иллювиальных горизонтов суглинистых и глинистых почв.

Рыхлое сложение — лопата или нож легко входят в почву, почва легко разламывается руками, почва хорошо оструктурена, но структурные агрегаты слабо сцементированы между собой; наблюдается в хорошо оструктуренных гумусовых горизонтах.

Рассыпчатое сложение — почва обладает сыпучестью, отдельные частицы не сцементированы между собой; характерно для пахотных горизонтов супесчаных и песчаных почв.

Пористость почвы характеризуется формой и размерами пор внутри структурных отдельностей или между ними. По пористости различают следующие типы сложения почв:

1. По расположению пор внутри структурных отдельностей: *тонкопористое* — почвенная масса пронизана порами диаметром менее 1 мм; *пористое* — почвенная масса пронизана порами в 1-3 мм; *губчатое* — в почве много пустот от 3 до 5 мм; *ноздреватое* (или *дырчатое*) — почвенная масса содержит полости от 5 до 10 мм; *ячеистое* — пустоты крупнее 10 мм; *трубчатое* — почва пронизана каналами, прорытыми крупными землероями.

2. По расположению пор между структурными отдельностями в сухом состоянии: *тонкотрециноватое* — полости шириной менее 3 мм; *трециноватое* — полости размером 3-10 мм; *щелеватое* — полости шириной более 10 мм.

Сложение имеет большое практическое значение, так как оно характеризует почву с точки зрения трудности ее обработки. Давно установлено, что глинистые и тяжелосуглинистые (тяжелые) почвы требуют значительно больше усилий при обработке, чем среднесуглинистые и песчаные (легкие). Также от сложения зависят водно-физические свойства почвы, легкость проникновения воды и корней растений в почву.

Новообразования

К почвенным новообразованиям относятся те выделения и скопления различных веществ, которые создаются в почвенной толще в процессе почвообразования. Различают новообразования химического и биологического происхождения.

Новообразований химического происхождения делят по форме и по химическому составу.

По форме химические новообразования разделяют на следующие группы: 1) *выцветы и налеты* — химические вещества, которые выступают на поверхности почвы или на стенке разреза в виде тончайшей пленочки (например, растворимые соли); 2) *корочки, примазки, потеки* — вещества, которые, выступая на поверхности почвы или по стенкам трещин, образуют слой небольшой толщины; 3) *прожилки и трубочки* — вещества, заполняющие ходы червей или корней, поры и трещины почвы; 4) *конкреции и стяжения* — скопления различных веществ более или менее округлой формы; 5) *прослойки* — вещества, накапливающиеся в больших количествах, пропитывая отдельные слои почвы.

По составу химические новообразования подразделяют на следующие группы.

1. *Скопления легкорастворимых солей* (NaCl , CaCl_2 , MgCl_2 , Na_2SO_4 и т.п.). Белого цвета. Встречаются в засоленных почвах и породах, чаще в условиях сухой полупустынной и пустынной степи. Наиболее характерные формы скопления — налеты и выцветы, корочки и примазки, крупинки и отдельные кристаллы солей.

2. *Скопления гипса* (CaSO_4). Белого цвета. Отмечаются в тех же почвах, что и легкорастворимые соли в форме выцветов, налетов, прожилок. А также в глубоких горизонтах черноземов южных и каштановых почв в виде особых сростков, называемых «земляными сердцами», которые чаще всего располагаются в подпочвенных горизонтах в лессовидных породах.

3. *Скопления карбоната кальция* (CaCO_3). Белого и грязно-белого цвета. Залегают в форме карбонатной плесени, карбонатных трубочек, «белоглазки» и др. Новообразования углекислой извести встречаются в почвах почти всех зон, но наиболее типичные формы образуются в черноземах и каштановых почвах, где повсеместно можно встретить в горизонте С «белоглазку» — бесформенные белые плотные пятна извести величиной 1-2 см.

4. *Скопления окислов и гидратов окислов железа, марганца и фосфорной кислоты*. Красно-бурые, ржаво-охристые, розовые, желтые и др. Образуют налеты, пленки, выцветы, примазки, пятна, трубочки, конкреции и т.д. Эти образования наиболее характерны для почв дерново-подзолистой зоны и влажных субтропиков, а в условиях избыточного увлажнения нередко встречаются и в почвах других зон.

5. *Закисные соединения железа*. Встречаются в виде сизоватых или сизовато-серых пленок, пятен, корочек. Они образуются в условиях избыточного увлажнения почв при анаэробных процессах, поэтому встречаются, главным образом, в болотных и заболоченных почвах.

6. *Скопления кремнекислоты*. Встречаются в виде кремнеземистой присыпки (белесый налет), прожилок и пятен (скопления кремнезема округлой формы). Эти образования характерны, главным образом, для почв подзолистого типа почвообразования и солодей.

7. *Выделения и скопления органических веществ*. Черного или тесно-серого цвета. Образуют гумусовые потеки и корочки, которые покрывают поверхность структурных отдельностей и стенки трещин, или гумусовые пятна, карманы, языки, связанные с проникновением перегнойных веществ по трещинам в нижележащие горизонты.

Новообразования биологического происхождения делят по происхождению на следующие группы: 1) *червороины (червоточины)* — извилистые ходы и каналы червей; 2) *капролиты* — зернистые клубочки экскрементов червей, представляющие собой кусочки земли, прошедшие через пищеварительный аппарат червей и пропитанные их выделениями; 3) *котовины* — пустые или заполненные ходы роющих животных (сусликов, сурков, кротов и др.); 4) *корневины* — сгнившие крупные корни растений; 5) *дендриты* — узоры мелких корешков на поверхности структурных отдельностей.

Перечисленные новообразования химического и биологического происхождения дают возможность судить о генезисе и плодородии почв. Поэтому определять эти новообразования при обследовании почв весьма полезно.

Включения

Включения — присутствующие в почве тела органического и неорганического происхождения, образование которых не связано с почвообразовательным процессом.

По происхождению включения можно разделить на четыре группы. *Литоморфы* — обломки почвообразующей породы, рассеянные в почве (камни, валуны, галька). *Криоморфы* — различные формы льда, связанные с сезонной или вечной мерзлотой (конкреции, линзы, прожилки). *Биоморфы* — включения, образование которых связано с деятельностью живых организмов: 1) остатки корней, стеблей, стволов растений; 2) кости животных; 3) раковины моллюсков; 4) окаменелости — окремнелые, обызвесткованные, загипсованные или ожелезненные остатки растений. *Антропоморфы* — предметы, связанные с деятельностью человека (кусочки кирпича, стекла, металлические предметы, черепки). К последним относятся археологические находки, позволяющие судить о возрасте почв.

Микроморфология почв

Помимо макроморфологических признаков почвы, различимых невооруженным глазом, почва обладает микроморфологическими признаками, исследовать которые можно только при помощи микроскопа.

В почвенной микроморфологии пользуются следующими понятиями. *Матрица почвы* — каркас почвы, состоящий из твердых частиц (или их микроагрегатов) с порами между ними. Матрица почвы включает скелет, плазму и поры. *Скелет почвы* — частицы крупнее 2 мкм, относительно устойчивые и нелегко перемещаемые во время почвообразовательных процессов (минеральные зерна, устойчивые кремневые и органические компоненты крупнее коллоидного размера). *Плазма почвы* — частицы менее 2 мкм, легко перемещаемые в процессе почвообразования (глинистые минералы, свободные полутонкие окислы, гумус). *Микросложение почвы* — пространственное соотношение матрицы (скелета, плазмы и пор), а также микроновообразований в почве. Для изучения микросложения почв готовят почвенные шлифы — образцы почвы с ненарушенным сложением, которые исследуют под поляризационным микроскопом. В зависимости от соотношения и взаимного расположения в пространстве скелета, плазмы и пор выделяют следующие типы микростроения почвы: песчаное, плазменно-песчаное, песчано-пылеватое, песчано-плазменное, плазменно-пылеватое, пылевато-плазменное, плазменное.

2.5. ПОЛЕВЫЕ АНАЛИЗЫ

Для более подробной и полной характеристики морфолого-генетических признаков почв очень желательно произвести некоторые простые химические испытания. Кроме определения глубины вскипания почв от 10 % соляной кислоты, необходимы:

1. Качественное определение хлористых и серноокислых солей, что даст возможность судить о наличии их в почвах (определяется при подозрении на засоление почв — в солончаках, солонцах и орошаемых почвах). Для определения наличия в почве хлоридов и сульфатов кладут в стакан, а еще лучше в большую пробирку, маленький кусочек почвы (2,5-5,0 г) и заливают дистиллированной водой 10-15 мл (отношение 1:3), энергично взбалтывают 3 мин, а затем отстаивают в течение 10 мин. После отстаивания полученную прозрачную или хорошо осветленную водную вытяжку разливают в 2-3 маленькие чистые пробирки, в которых и производят качественное испытание на присутствие хлористых и серноокислых солей.

Для установления наличия хлористых солей — CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl (хлоридов) — в одну из маленьких пробирок с водной вытяжкой прибав-

ляют несколько капель 10% раствора азотнокислого серебра (AgNO_3), подкисленного азотной кислотой. Появление помутнения указывает на присутствие сотых долей процента Cl , а выпадение хлопьевидного осадка говорит о десятых долях процента.

Наличие в почве сернокислых солей — Na_2SO_4 , CaSO_4 , MgSO_4 (сульфатов) — обнаруживается путем прибавления в одну из пробирок с чистой водной вытяжкой нескольких капель 10 % раствора хлористого бария (BaCl_2). Появление мути или осадка указывает на присутствие солей серной кислоты.

Наличие в почве нормальной соды (Na_2CO_3) являющейся наиболее вредной для развития культурных растений, можно определить путем прибавления к водной вытяжке нескольких капель спиртового раствора фенолфталеина. Появление малиновой окраски в результате щелочной реакции раствора карбоната натрия указывает на присутствие соды.

2. Качественная реакция на закись железа в переувлажненных, заболоченных и болотных почвах. Для этого на свежий излом почвы наносят 2-3 капли 10 % соляной кислоты, затем туда же приливают 2-3 капли насыщенного раствора красной кровяной соли (первая проба). Рядом на том же срезе делают аналогичную пробу только одним раствором красной кровяной соли (вторая проба). Появление голубовато-синего окрашивания свидетельствует о наличии в почве закиси железа.

3. Определение величины рН в почвах (определяется в ненасыщенных почвах). Для этого пользуются универсальной индикаторной бумагой или другими методами определения рН в полевых условиях.

Эти определения довольно просты, не требуют сложного оборудования и вместе с тем помогают исследователю лучше познать изучаемые почвы, установить наличие засоленных почв, характер и даже степень их засоления, определить величину рН и др.

2.6. ОТБОР ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ

Образцы почв берутся только после того, как закончится работа по описанию разреза, определению полевого названия почвы и занесения всех данных в полевой журнал.

Образцы почв берутся из полных (основных) разрезов, иногда из полум и прикопок. Из одного полного разреза глубиной около 2 м следует взять от 4 до 6 и больше образцов. К отбору образцов надо отнестись со всей серьезностью и брать их не механически, через произвольно выбранные промежутки, а строго по генетическим горизонтам и подгорizontам. При специальных исследованиях или в случае нетипичных или малознакомых почв, применяется способ отбора образцов сплошной колонкой без

пропусков по всей толще почвенного разреза до материнской породы включительно, вверху профиля через каждые 5-10 см, внизу через 20 см. Выемка образцов почвы, во избежание засорения стенки почвенного разреза, производится обязательно снизу вверх по почвенному профилю, т. е. сначала берут образцы из гор. С, далее из гор. В и, наконец, из гор. А. Мощность слоя, из которого отбирается образец — 10 см. Масса образца зависит от количества предполагаемых анализов — от 0,2 до 1 кг (для биодиагностики обычно достаточно 200 г). Если мощность горизонтов менее 10 см, что часто бывает в горных условиях, то образцы почвы берутся на всю толщу горизонта, несколько отступая от его верхней и нижней границ, с таким расчетом, чтобы не захватить переходной части почвы от одного горизонта к другому. Лучшим местом для взятия почвенного образца является средняя часть горизонта. При большой мощности горизонта (более 50 см желательно взять не один, а несколько образцов. **Из пахотного горизонта берется один образец на всю его мощность.**

После определения количества образцов необходимо до взятия образцов записать в полевой журнал глубину взятия образца и оформить этикетки для каждого образца по схеме:

Область <i>Ростовская</i>	
Район <i>Мясниковский</i>	
ОПХ РГУ «Недвиговка»	
№ разреза <i>99/1</i>	
Угодье <i>залежь</i>	
Горизонт <i>А</i>	
Глубина, см <i>15-25</i>	
Дата	Подпись

Одновременно с отбором образцов для лабораторных исследований при проведении биологических исследований необходимо определение температуры и влажности почвы по горизонтам. Температура определяется специальными термометрами (Савинова) в почвенном разрезе (температуры почвы) и на поверхности почвы в тени (температура воздуха). Отбор образцов для определения влажности почвы производится в алюминиевые бюксы.

ГЛАВА 3. ГЕОБОТАНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фитоценоз в системе компонентов биогеоценоза и их связях играет центральную роль. Он определяет пространственные границы биогеоценоза, его структуру и облик, внутренний климат, состав, обилие и распределение животных, микроорганизмов, особенности и интенсивность материально-энергетического обмена всей системы биогеоценоза. В связи с этим подробное изучение фитоценоза является обязательной частью любого биоценологического исследования.

О состоянии почв и ландшафтов в целом в первую очередь судят по состоянию растительности и флоры исследуемой территории. Высшие растения тесно связаны с абиотическими компонентами окружающей среды. При слабоизменяющихся условиях освещенности и температуры воздуха на местности характер растительности и флоры определяют почвенные свойства. Причем эту связь легко проследить без сложной аппаратуры и анализов, используя визуальные наблюдения. По видам-индикаторам легко судить о многих свойствах почвы. Среди растений общеизвестны индикаторы различных условий увлажнения, реакции среды, уровня плодородия, плотности, засоленности, солонцеватости и т.д.

Существенные выводы можно заключить и по характеру растительности, используя такие показатели, как состояние растительности, проективное покрытие, высота покрова, ярусность и т.д.

Такой ответственный этап исследований как выбор места заложения почвенных разрезов и отбор образцов не может решаться, не учитывая характеристики фитоценоза. Особенно удобно пользоваться перечисленными показателями в естественных природных условиях. В условиях агроценозов, где естественный растительный покров уничтожен, можно пользоваться только показаниями состояния агрокультуры. К недостаткам, ограничивающим применение фитоиндикации можно отнести и значительные годовые и сезонные колебания развития растительности, особенно в травянистых сообществах. Однако фитоиндикация привлекает своей простотой и наглядностью, легко доступна и широко применяется, например, при диагностике процессов гидроморфизма. Пятна тростника и другой влаголюбивой растительности легко маркируют зоны длительного подтопления почв в условиях агроценозов. Кроме того, в каштаново-солонцовой сухостепной зоне пятна солонцов также диагностируются по характеру растительности и видам индикаторам.

3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСТЕНИЙ

При геоботаническом изучении фитоценозов (растительных сообществ) могут встретиться незнакомые растения, поэтому нужно уметь их определять. Основным самым полным руководством по определению растений является многотомное издание «Флора СССР». В нем описано около 20 тыс. видов, встречающихся на всей территории бывшего СССР, указаны их ареалы, подвиды и местообитания. Для того чтобы пользоваться этим изданием, нужно иметь достаточно обширные познания в морфологии и систематике растений. Проще пользоваться определителями растений, разработанными для республик, краев, областей, регионов.

Определение растений строится по принципу дихотомических ключей. Обычно в определителях присутствуют ключи (таблицы) для определения семейств, родов, видов. Каждый ключ состоит из ступеней, имеющих очередную нумерацию. Каждая ступень таблицы состоит из двух частей — тезы (положения), обозначенной порядковым номером ступени с левой стороны, и антитезы (противоположения), обозначенной нулем в одних определителях, минусом — в других. Иногда имеется несколько антитез, в этом случае их обозначают буквами: a, b, c и т.д. Теза и антитеза содержат противоположные признаки, из которых только один может подойти определяемому растению. Справа, в конце тезы и антитезы, поставлены цифры, указывающие, на какую ступень следует переходить дальше, после того как установлено, теза или антитеза подходит данному растению. Таким путем переходят к новым ступеням до тех пор, пока в конце текста, подходящего по описанным признакам к определяемому растению, не будет стоять название семейства (в таблице для определения семейств). Выяснив семейство, находят в определителе по указанной странице таблицу для определения родов этого семейства. Выяснив род, находят таблицу для определения вида и определяют вид растения.

Оборудование. Гербарий хозяйственных групп и семейств растений, лупы, микроскопы, предметные стекла, препаровальные иглы, готовые препараты, таблицы строения семейств и видов, определители растений, определительные карточки.

3.2. УЧЕТ ЗАПАСОВ НАДЗЕМНОЙ И ПОДЗЕМНОЙ БИОМАССЫ

Под биомассой фитоценоза или фитомассой понимается весовое количество органического вещества, заключенного в живых растениях сообщества на площади 1 га в сыром, воздушном и абсолютно сухом состоя-

ниях. В этом показателе отражается главная биогеоценотическая деятельность фитоценоза.

Определение запаса надземной фитомассы в травяном фитоценозе производится на учетных площадках 1 м² в 10-кратной повторности в соответствии с полевого отбора образцов. Взвешивание в трех состояниях (сыром, воздушно-сухом и абсолютно сухом) и разводка на фракции осуществляется в лабораторных условиях. Полученные результаты заносятся в таблицы, статистически обрабатываются и графически оформляются.

Запас подземной фитомассы учитывается траншейным методом. Корни отделяют сухой разборкой и взвешивают в воздушно-сухом и абсолютно-сухом состоянии. Обработка полученных результатов проводится по тому же плану, что и в случае надземной фитомассы.

3.3. ЭКОЛОГО-ФЛОРИСТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ (СИСТЕМА БРАУН-БЛАНКЕ)

Эколого-флористическая классификация основана на дедуктивно-индуктивном подходе, при котором главную роль играет процесс установления синтаксонов «снизу» путем группирования сообществ по сходству флористического состава, отражающего экологические условия и стадию сукцессии.

Синтаксоны эколого-флористической классификации устанавливаются на основе диагностических видов, среди которых различают характерные, дифференцирующие и константные.

Характерные виды встречаются только в одном синтаксоне или встречаются в этом синтаксоне чаще, чем в других (т.е. центрированы в нем).

Дифференцирующие виды диагностируют границы своего ареала и входят в состав нескольких синтаксонов.

Константные виды, встречаются с высоким постоянством и часто с высоким обилием, но проходят через этот синтаксон «транзитом». Виды, константные для низших единиц (ассоциации или союза), могут быть дифференцирующими или характерными для высших единиц — порядка или класса. Различия трех групп диагностических видов показаны на рис. 5. Впрочем, различия характерных и дифференцирующих видов весьма условны, и потому очень часто их рассматривают как единую группу диагностических видов (но в этом случае к ней не относят константные виды).

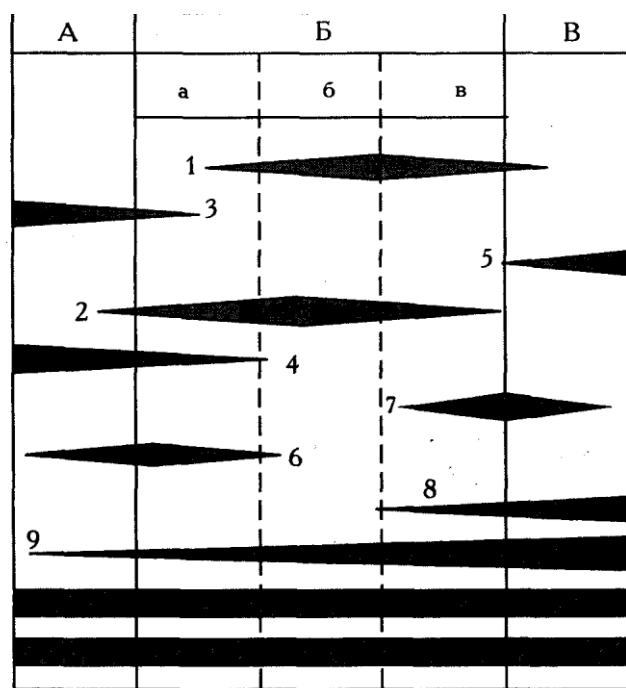


Рис. 5. Схема, показывающая основные варианты диагностических видов в системе Браун-Бланке: А, Б, В — ассоциации; а, б, в — субассоциации; 1, 2 — характерные виды ассоциации Б; 3, 4 — характерные виды ассоциации А; 5 — характерный вид ассоциации В; 4, 6 — дифференциальные виды субассоциации а; 7, 8 — дифференциальные виды субассоциации в; субассоциация б выделяется по критерию отсутствия дифференциальных видов субассоциаций а и в; 9, 10, 11 — константные виды, которые могут быть характерными для классификационных единиц более высокого ранга

Методика описания и классификация растительности методом Бран-Бланке. Рекогносцировкой ознакомительное исследование, когда знакомятся с основными единицами растительности и формируют представление об общем синтаксономическом разнообразии района исследований. Для этого нужно хорошо знать растительность и так построить поездку, чтобы в ее ходе охватить все основные классы растительности.

Аналитический этап наиболее сложен, так как для выполнения геоботанических описаний необходимо хорошо знать флору. В технике геоботанических описаний важно полное выявление флористического состава на описываемой площадке. Любое неизвестное растение должно быть взято в «справочный гербарий» для последующего определения.

Последовательность действий при выполнении геоботанического описания следующая.

Выбор места описания. Пробные площадки для геоботанических описаний закладываются в однородных (гомогенных) участках раститель-

ности, представляющих ранее намеченные в ходе рекогносцировки совокупности: опознаваемые на глаз варианты сухих и влажных лесов, лугов, участки пашни, рудеральные группировки и т.д. Описывать все подряд нецелесообразно, так как при этом усложняются последующие этапы классификации. Если ставится более простая задача и разнообразие описываемых сообществ ограничено, то можно описывать любой гомогенный участок растительности.

Выбор размера и формы описываемого участка растительности. Как правило, используются пробные площадки квадратной формы. Для лесов они имеют размер 20х40 м или 25х25 м, для лугов — 5х5 м или 10х10 м. Растительность, фитоценозы которой имеют меньшие размеры или представлены узкими полосами (прибрежно-водная растительность вдоль берега реки или озера, заросли рудеральных растений на буртах земли, вдоль заборов или между плитами покрытия городских площадей и т.д.), можно описывать без заложения пробных площадок в «естественных границах». Это может быть полоса прибрежно-водного сообщества длиной 10-15 м, однородное пятно рудеральной растительности, несколько «просветов» между плитами покрытия городской площади и т.д.

Следует стремиться к тому, чтобы описываемая площадь была не меньше минимального ареала. На практике при описании растительности, имеющей комплексный характер, приходится использовать площади и меньшего размера. Единственное требование, которое нельзя нарушать при определении размера участка, — требование гомогенности растительности. Описываемая площадка (или пятно растительности в естественных границах) должна быть однородна на глаз, т.е. расположена в однородном местообитании (это необязательно ровное место, но и участок склона, в пределах которого не произошло смены доминантов и существенного изменения флористического состава).

Составление описания. Геоботанические описания составляются на специальных бланках. Их можно выполнять и по определенной форме.

Каждое описание в качестве обязательных элементов содержит указание даты, автора, местоположения (топографической привязки) и местообитания. Для древесной растительности отдельно описываются ее ярусы и их подразделения.

Иногда при геоботаническом описании указывают высоту отдельных растений и фенологическое состояние видов, но это не обязательно. Важным параметром фитоценоза является покрытие — в сложном травостое покрытие указывается по ярусам, причем сумма покрытия за счет ярусного перекрытия может превышать 100 %.

В описаниях использована шкала обилия Браун-Бланке, которая имеет следующее содержание:

- г — вид чрезвычайно редок, покрытие незначительное;
- + — вид редок и имеет малое проективное покрытие;
- 1 — особей вида много, но покрытие невелико или особи разрежены, но покрытие большое;
- 2 — число особей вида велико, проективное покрытие 5-25%;
- 3 — число особей вида любое, проективное покрытие 25-50%;
- 4 — число особей вида любое, проективное покрытие 50-75%;
- 5 — число особей вида любое, проективное покрытие более 75%.

Пример описания травяного фитоценоза

№

Автор описания.

Дата описания.

Местоположение.

Местообитание.

Почва.

Площадь описания.

Проективное покрытие травяного яруса.

Проективное покрытие мохового яруса.

Средняя высота травяного яруса.

Максимальная высота травяного яруса.

Задернение.

Число видов.

Далее приводится список видов растений с указанием их обилия.

3.4. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ШКАЛЫ Л.Г. РАМЕНСКОГО

Прямое изучение экологических условий путем экспериментов требует больших затрат средств и времени. Такие наблюдения ведутся в основном на научных стационарах. Природные сенокосы и пастбища занимают обширные территории и экологически чрезвычайно разнообразны. В этих условиях требуется методика, позволяющая быстро и достаточно точно определять экологические условия местообитания без больших затрат средств.

Единицами измерений условий местообитания явились ступени экологического ряда, или градации условий, установленные по самой растительности. Эти градации даются в виде шкал Л. Г. Раменского по каждому фактору отдельно.

Разработаны экологические шкалы по увлажнению, переменности увлажнения, активному богатству и засолению почвы, аллювиальности, а также пастбищной дигрессии (изменение растительности под влиянием выпаса животных); кроме того, для горных районов разработана шкала

высотности, или суровости, климата. Во всех экологических шкалах за основу взята реакция растений на изменение условий при совместном их существовании в растительных группировках. Эта реакция находит свое выражение в изменении обилия каждого растения по мере нарастания или уменьшения показателей фактора.

В результате были составлены экологические формулы для видов растений, в которых даны амплитуды ступеней шкалы определенного фактора для основных классов обилия растений. Эти формулы характеризуют экологическую приуроченность растений при совместном их произрастании в сообществе. Вместе с тем на основе экологических формул видов можно определить экологические условия каждого участка по его растительности.

Реакция растений на среду. Изучение реакции видов на свет, увлажнение, питание и пр. дает возможность установить для каждого вида растений характерные амплитуды и зоны условий, в различной мере благоприятных для прохождения ими жизненного цикла и его отдельных стадий. При этом выявляется оптимальная зона условий (совокупности водного, питательного и других режимов), в пределах которой растение успешно проходит стадии жизни, достигая полного или более или менее пышного развития, образуя большую вегетативную массу и обильно плодонося. В этом случае растение имеет высокую жизненность, оно наиболее устойчиво и легко переносит всякие эпизодические невзгоды (кратковременную засуху, сильные ветры и т.п.). Вокруг зоны оптимальных режимов условий располагается зона менее благоприятных условий, зона средней жизненности: урожайность растений снижена и сильнее колеблется при наступлении временных неблагоприятных условий, все же растения здесь проходят полный цикл, вегетируют и плодоносят. Далее от зоны средней жизненности простирается зона подавленной жизненности, обусловленной суровыми условиями среды для данного вида. Основные жизненные процессы при этом подавлены, цикл жизни может быть полным при карликовом росте, или же растение только вегетирует, не плодонося. В этой зоне растения неустойчивы и легко гибнут при невзгодах. В еще более суровых условиях жизнь растения исключена, это зона его смерти или скрытой жизни в виде семян, спор, спящих почек.

Наличие и высокое обилие одного из растений в какой-либо растительной группировке в известной мере характеризует населяемое растительной группировкой местообитание, но лишь в грубом приближении и без определенных границ. Причина этого заключается в широкой экологической пластичности большинства видов, в их больших экологических амплитудах (широкая норма реакции). Кроме того, высокое обилие вида может быть обусловлено различными факторами. Например, типчак может

господствовать в зоне сухой степи, в луговой степи и даже на сухих лугах. Поэтому при определении экологических условий местообитания необходимо учитывать обилие не только доминантов, но и их спутников. Так, у типчака при большом обилии спутники разные в луговой степи, в сухой степи и др. Спутники дают возможность подразделить сообщества с господством типчака на разные варианты степей и лугов.

В экологических условиях, в которых данное растение не становится преобладающим, присутствие этого вида является более четким показателем экологических условий.

Индикатором условий местообитания может быть и отсутствие видов растений (например, на такырах, солончаках). Для суровых условий характерна экологическая скудость.

Следовательно, обоснованное, правильное суждение об условиях среды и состоянии сообщества можно высказать лишь на основе учета всего состава сообщества. Экологический анализ состава растительных сообществ (фитоценозов) позволяет дать содержательную сравнительную оценку условий местообитания, текущего состояния угодья с выявлением реликтовых признаков (оставшихся от предыдущих стадий) и тенденций дальнейшего развития отдельных фитоценозов и растительного покрова в целом.

Экологическая шкала увлажнения. Шкала увлажнения охватывает все различия в водном довольствии растений, наблюдаемые на территории нашей страны. Эти различия находят наглядное отражение в природных зонах, а также внутри зон на водораздельных (плакорных) местообитаниях, в понижениях, поймах. В каждой зоне встречаются все ступени увлажнения, начиная от ступеней увлажнения их водораздельных пространств до избыточного увлажнения болот, мелководий, водоемов. Характеристика ступеней увлажнения дается по группам.

Ступени 1-17. Пустынное увлажнение, условия крайнего недостатка влаги в почве, с изреженной растительностью из ксерофитов, солянок, эфемеров и эфемероидов. Эти условия характерны для такыров, светлых сероземов, пустынных серо-бурых и полупустынных бурых почв. Богарное (неполивное) земледелие невозможно.

Ступени 18-30. Полупустынное (пустынно-степное) увлажнение, близкое к пустынному. Почвы — светло-каштановые, бурые полупустынные, серо-бурые пустынные, сероземы. Господствуют полыни и сухолюбивые злаки (типчак, житняки, ковыли). Кроме полупустыни эти условия встречаются в сухой степи на склонах и солонцах, а в зоне пустыни — в более влажных местах. Богарное земледелие неустойчиво и малопродуктивно.

Ступени 31-39. Сухостепное увлажнение. Почвы — темно-каштановые и южные черноземы. Господствуют типчак, ковыль Лессинга, полынь австрийская. Эти условия встречаются в более южных сухих районах — по увлажненным местам, а в северных — по сухим (южные склоны, солонцы). Увлажнение достаточно для богарного земледелия при условии применения приемов накопления и сохранения влаги.

Ступени 40-46. Увлажнение среднестепное, соответствующее условиям настоящих крупноковыльных степей. Почвы — черноземы обыкновенные и южные. Южнее это увлажнение встречается по понижениям, а в лесостепи — по южным склонам. Широко развито полеводство, недовольно часты засухи (через 2-3 года).

Ступени 47-52. Увлажнение влажностепное или лугово-степное. Оно характерно для луговых степей и остепненных лугов лесостепной зоны и сухих сосновых и дубовых лесов. Почвы — оподзоленные, выщелоченные и типичные черноземы, серые лесные. Земледелие обычно вполне обеспечено влагой, засухи бывают через 5-7 лет.

Ступени 53-63. Увлажнение сухих и свежих лугов и лесов. Почвы — луговые, дерновые, подзолистые, коричневые, бурые лесные и др. Соответствует дренированным местообитаниям лесной зоны. Земледелие обеспечено влагой, но в сухие годы ощущается ее недостаток.

Ступени 64-76. Влажнолуговое увлажнение. Почвы неоглеенные и слабооглеенные. На лугах преобладают лучшие луговые злаки и клевера. Особенно характерно это увлажнение для южной тайги. Полевые культуры в некоторые годы страдают от избытка влаги.

Ступени 77-88. Сыролуговое увлажнение. Характерно для сырых лугов и лесов, а также более сухих торфяников верховых болот.

Почвы — болотно-подзолистые, оглеенные, торфяные. Требуется осушение.

Ступени 89-93. Болотно-луговое увлажнение. Характерно для болотистых лугов и лесов и слабообводненных болот. В лесной зоне оно наблюдается на слабодренированных равнинах, террасах и в поймах рек, а южнее — на лиманах и пр.

Ступени 94-103. Болотное увлажнение, характерно для средне- и сильнообводненных болот.

Ступени 104-109. Местообитания сплавин и прибрежно-водной растительности.

Ступени 110-120. Местообитания водной растительности.

Экологическая шкала активного богатства и засоленности почв. Под термином *активное богатство почвы* понимают ее обеспеченность элементами питания растений в подвижной и усвояемой растениями форме (растворимые соли, адсорбированные коллоидами основания, лег-

коминерализуемые соединения азота и пр.). При благоприятных условиях температуры, аэрации и влажности активное богатство отражает плодородие почвы. В конкретных местообитаниях высокое богатство почвы всегда сочетается с достаточной концентрацией почвенного раствора, с преобладанием в нем ионов кальция. В природе наблюдается непрерывный ряд градаций от резко выщелоченных, кислых и бесплодных почв к довольно богатым и богатым, а затем к почвам, в различной степени засоленным. Выделяют следующие ступени богатства и засоленности почвы.

1-3. Особо бедные почвы и торф верховых болот (олиготрофные). Реакция почв кислая (рН 4,0-4,5, а для торфа до 3,0). Минеральные почвы нередко выщелоченные, часто песчаные. Характерны для бедных суходолов лесной зоны (с кошачьей лапкой, белоусом), сосновых боров на песках, сфагновых верховых болот.

4-6. Бедные почвы и торф (олигомезотрофные). Почвы выщелоченные, рН 5,0-5,5. Местообитания тощих суходольных лугов (с белоусом), сосновых боров, верховых и переходных болот.

7-9. Небогатые почвы (мезотрофные). Реакция почвы слабокислая. Подзолистые, дерново-подзолистые, торфяно-глеевые и другие почвы. Суходольные луга, еловые и смешанные леса, более бедные низинные луга и болота повышенной зольности (8-12 %).

10-13. Довольно богатые почвы, мезоевтрофные, рН 6,0-7,5. Почвы луговые, серые лесные, черноземы. Пойменные и низинные луга и болота, степи и дубравы.

14-16. Богатые почвы, евтрофные, рН 7,0-7,5. Мощные, обыкновенные и южные черноземы и др. Степи, полупустыни, пустыни, пойменные луга, дубравы, низинные болота.

17-19. Слабосолончаковатые почвы, рН 7,5-8,3. Они характерны для низин и долин рек с луговыми почвами; равнин и низин степей, полупустынь и пустынь. Имеется немного ионов SO_4^{2-} и Cl^- . К луговым травам примешиваются относительно солелюбивые виды растений: ситник Жерарда, астра солончаковая, клевер пустоягодник, овсяница тростникововидная, кермек Гмелина.

20-21. Среднесолончаковатые почвы, рН 7,5-8,3. Чаще это луговые солончаковатые почвы с заметным содержанием солей в верхнем полуметровом слое: SO_4^{2-} — 0,1-0,3 %, Cl^- — 0,05-0,1 %. Солелюбивые виды (ситник Жерарда и др.) образуют значительную примесь в травостое.

22-23. Сильносолончаковые почвы (солончаки). Луговые солончаки, рН до 9,1. Имеется солей: SO_4^{2-} — 0,1-0,3%, Cl^- — до 0,3 %. Преобладают относительно солелюбивые растения, к ним примешиваются собственно солончаковые формы растений: солерос, сарсазан, сведа и др.

24-28. Резкосолончаковатые почвы (солончаки). В верхнем полуметровом слое и непосредственно с поверхности содержится несколько процентов солей. В составе травостоя преобладают солевыносливые растения (солерос, сведы, сарсазан, ажрек, кермек кустарничковый, соляноколосник прикаспийский и др.), в примеси встречаются относительно солелюбивые растения.

29-30. Злостно солончаковые почвы (злостные солончаки, шоры). Накопление солей с поверхности достигает таких размеров, что галофитная (солянковая) растительность сильно изреживается или полностью отсутствует. Поверхность почвы покрыта солевой коркой разной толщины.

Шкала пастбищной дигрессии. Влияние выпаса на растительность и почву ощущается в больших масштабах и различных проявлениях. При выпасе животных происходит угнетение поедаемых растений в результате отчуждения их надземных частей, а иногда и вырывания с корнем. Поедание видов растений избирательно и зависит от потребностей выпасаемых животных, а также от интенсивности, длительности и сезона использования угодья. Большое значение имеют повреждение, вытаптывание растений. Виды растений имеют неодинаковую выносливость к вытаптыванию. Исключительно выносливы овсяница красная и клевер ползучий.

Почвы в результате выпаса сильно уплотняются (влажные) и распыляются (сухие), разрушается дернина. Переувлажненные почвы в результате выпаса могут заболачиваться. На пастбищах почва обогащается экскрементами животных.

Воздействие выпаса приводит к неблагоприятным сменам растительного покрова, именуемым *пастбищной дигрессией*. Пути дигрессии неодинаковы и зависят от соотношения перечисленных ранее факторов. Различают следующие ступени пастбищной дигрессии.

1-2. Влияние выпаса отсутствует или оно очень слабое. Это луга, на которые выпас не оказал заметного влияния, а сенокосение также слабо изменило травостой. Характерны высокие травостои, в которых верховые злаки сенокосного типа делят господство с крупным и широколистным разнотравьем. Разнотравье представлено растениями семейств Гераниевые, Сельдерейные (Зонтичные), Астровые (Сложноцветные), Розовые, Лютиковые. Стадия — исходный сенокос.

3-4. Слабое влияние выпаса, сенокосная стадия. Выпас и раннее сенокосение угнетают разнотравье и дают перевес верховым злакам: тимopheевке, овсянице луговой, кострецу безостому, бекмании, лисохвосту луговому.

5. Умеренное влияние выпаса, полупастбищная стадия. Коренное разнотравье почти выпадает, появляются и разрастаются пастбищные сорняки. Низовые злаки начинают вытеснять верховые сенокосные злаки.

6-7. Сильное влияние выпаса, пастбищная стадия. Господствуют низовые пастбищные злаки (мятлик луговой, овсяница красная, полевица белая) и низкие, стелющиеся бобовые (клевер ползучий, пустягодник). Обилие многолетних сорняков: одуванчик, кульбаба осенняя, лапчатка гусиная, лютики и др.

8. Полусбой. Верховые злаки более или менее полно выпали, сорные многолетники разрослись и теснят пастбищные злаки, травостой редет, и в него внедряются сбоевые сорные однолетники — гречишка птичья (спорыш), мятлик однолетний, пастушья сумка и др. Нередко разрастаются татарник, чертополох.

9. Сбой. Травостой сильно изрежен и образован преимущественно спорышем и другими сбоевыми однолетниками.

10. Абсолютный сбой. Почва оголена, имеются единичные растения.

Обработка геоботанических описаний по экологическим шкалам. В экологических шкалах даны ступени, в которых встречаются виды растений при разной степени их обилия.

Для обилия растений приняты следующие градации. Растения встречаются массово ($> 8\%$) — *m*, обильно ($2,5-8,0\%$) — *c*, умеренно ($0,3-2,5\%$) — *n*, мало ($0,1-0,2\%$) — *p*, единично ($< 0,1\%$) — *s*.

ГЛАВА 4. ЗООЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВ

4.1. УЧЕТ КРУПНЫХ ПОЧВЕННЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

При учете более крупных объектов, легко обнаруживаемых невооруженным глазом, таких, как дождевые черви, многоножки, личинки хрущей, шелконов, жуужелиц и т.д., наиболее универсальным и доступным способом учета является метод почвенных раскопок с ручной разборкой выбранной земли.

При раскопках во влажный период года и в более влажных районах оптимальная площадь пробы $0,25 \text{ м}^2$ (50x50 см), а в сухие периоды года, особенно в аридных местностях, где почвенные беспозвоночные могут мигрировать на значительную глубину, приходится увеличивать пробы до 1 или даже 2 м^2 (1x1 или 1x2 м), так как вырыть пробу с отвесными стенками на большую глубину при малой площади пробы невозможно.

Определение численности почвенных беспозвоночных производится в пересчете на 1 м^2 и определяется количеством животных в столбе почвы площадью 1 м^2 на всю глубину их встречаемости. Определять число обитающих в почве беспозвоночных на единицу объема или веса, как это делают в отношении бактерий микробиологи, нецелесообразно, так как в зависимости от степени увлажнения и температуры почвы, почвенные животные либо концентрируются в поверхностных горизонтах (в теплые сезоны при влажной почве), либо частично уходят вглубь (в сухое время года и на зимовку). При достаточной влажности почвы глубина пробы может не превышать 30-50 см, а в сухих местностях в летнее время пробы приходится брать на глубину 1 м или даже более, особенно на песчаных почвах. Самым простым и доступным способом извлечения беспозвоночных из проб почвы является ручная разборка. В начале намечается площадь пробы. Затем собирают всех беспозвоночных с поверхности почвы и тщательно перебирают войлок и подстилку, учитывая всех встреченных животных. Найденных в подстилке беспозвоночных собирают, подсчитывают, фиксируют и записывают отдельно от собранных в собственно почве.

Затем, после удаления подстилки, приступают к выкапыванию почвы с площади пробы лопатой, лучше с незакругленными краями. Выбираемые на мешковину, клеенку или лист фанеры, разложенные рядом с пробой небольшие порции земли тщательно перебирают руками, причем более крупные комья приходится разбивать, а дернину и корешки — разрывать. Всю землю из пробы, порцию за порцией, перетирают на весу между ладонями, внимательно рассматривая всю сыпавшуюся на подстилку

землю и собирая падающих при этом и легко обнаруживаемых животных. Их собирают (отдельно из каждой пробы) в пробирки или баночки с небольшим количеством земли. Дождевых червей берут отдельно в матерчатые мешочки с землей (удобны мешочки, применяемые для сбора образцов почвы почвоведом). Хищных жуков и их личинок лучше помещать в отдельные пробирки, изолировав друг от друга и от других собранных объектов. Мелких и нежных насекомых, многоножек и других, лучше там же на месте помещать в пробирки со спиртом с добавкой формалина или в 4%-ный раствор формалина. Крупных насекомых помещают в морилки с ваткой пропитанной эфиром или хлороформом. Всех найденных в пробе животных там же в полевых условиях записывают в дневник, с той точностью определения, какая доступна руководителю учета, или под условными названиями. В дневнике дается и возможно более полная характеристика, как всего обследуемого участка, так и места взятия данной пробы. В пробирки, в мешочки с червями и т.д. вкладывают этикетку, в которой отмечен номер пробы.

Если раскопки проводятся послойно, на этикетке числителем отмечается номер пробы, а в знаменателе — номер слоя; при этом материал собирают отдельно из каждого слоя. Фиксацию более крупных собранных беспозвоночных производят в конце работы в камеральных условиях, о чем будет сказано далее.

Наиболее благоприятная влажность почвы для учета почвенной фауны, обеспечивающая наиболее полную выборку почвенных животных и наибольшую производительность работы такая, при которой горсть почвы, зажатой в кулак, образует ком, сохраняющий свою форму, но рассыпающийся от легкого удара. При таком состоянии поверхностного слоя почвы почвенные беспозвоночные держатся неглубоко, а почва легко перетирается и просеивается.

Для изучения корреляций с распределением корневых систем целесообразно проводить послойные раскопки, позволяющие выявить глубину нахождения основных представителей почвенной фауны. При этом образцы почвы (после разборки и удаления подстилки) следует брать слоями в 10 см мощностью, отдельно собирая и записывая животных из каждого слоя.

После взятия пробы следует провести измерение и записать мощность отдельных генетических горизонтов и степень влажности (глазомерно) каждого из них в тех случаях, когда попутно не определяется влажность почвы.

Для установления глубины, на которую следует брать пробу, особенно в летнее время и при изучении вертикальных миграций почвенных животных, первых образец необходимо взять глубже, углубляя яму на 20-

30 см глубже максимальной глубины встречаемости дождевых червей и многоножек, выявленной при взятии первой пробы.

Во многих случаях очень полезно параллельно с определением глубины взятия пробы устанавливать связь распределения почвенной фауны с почвенно-генетическими горизонтами. При дальнейшей работе на данном участке, если связь установлена, послойный учет целесообразно и удобно вести по этим горизонтам.

При маршрутных обследованиях пробы в пределах каждой выделенной почвенной разности располагаются так, чтобы каждая проба находилась в середине типичной части территории, описываемой в дневнике. В горных местностях маршрут проводится перпендикулярно имеющейся в данном районе поясности растительности.

В каждом подлежащем обследованию однородном сообществе рекомендуется брать не менее четырех проб по 0,25 м².

На площадках, выделенных для стационарных исследований, рекомендуется брать не менее 12 таких проб для каждого варианта, располагая пробы по сетке.

При сравнении заселенности граничащих территорий с растительностью разного типа пробы следует располагать параллельно границе участков.

Если на участке ясно выражена микрокомплексность растительного покрова, то одну часть проб необходимо брать в одних условиях, а другую — в других. Так, в типчаково-ковыльной степи часть проб следует взять на участках с преобладанием типчака; а часть — с преобладанием ковыля; в лесу с несомкнутыми кронами часть проб берется под кронами, а часть — в просветах и т. д.

Собранный и зафиксированный материал подлежит систематической обработке для определения видовой принадлежности с использованием специальных определителей.

Кроме описанного метода раскопок существуют и другие методы учета почвенной мезофауны, среди которых следует отметить **метод при- манок, учет после обработки плугом и др.**

Для учета дождевых червей в почве используют также **метод полива поверхности почвы раздражающими покровами червей жидкостями** (0,14-0,5% раствор формалина). В результате черви выползают на поверхность.

Для учета напочвенных животных, особенно имаго жуков (жужелиц, чернотелок, мертвоедов и др.) используют стандартный метод **ловчих линий**. Для этого выставляют двумя параллельными рядами линии ловушек Барбера (5-10 ловушек в линии с расстоянием между ловушками несколько метров (до 10 м). В качестве ловушек используют стеклянные (жестя-

ные, пластиковые сосуды емкостью около 0,5 л с фиксатором (чаще всего 4% раствор формалина). Необходимо тщательное установление ловушек. Они должны быть установлены на типичных участках, на 0,5 см выше поверхности почвы. Для защиты от дождя в жарких районах от Солнца, над ловушками устанавливают на высоте 4-5 см крышки. На дно банок помещают немного почвы. Ловушки устанавливают на 10 суток. Результаты выражают в единицах динамической плотности уловистостью на 10 ловушек/суток. Доминантами при этом считаются виды, численность которых составляет более 5%, субдоминантами — 2-5% от общего числа собранных особей.

4.2. УЧЕТ МЕЛКИХ ПОЧВЕННЫХ ЧЛЕНИСТОНОГИХ

Так как численность особей мелких членистоногих в почве нередко достигает нескольких тысяч и десятков тысяч на 1 м², вероятность их встречи в пробах сравнительно небольшого объема достаточно велика. Поэтому взятие даже немногих проб небольшой площади (и объема) дает результаты удовлетворительной достоверности в отношении доминирующих на обследуемом участке групп мелких беспозвоночных.

Обычно исследуются пробы, вырезаемые специальной стальной (обычно кубической) формой со сторонами 10x10x10 или 5x5x5 см, вдавливаемой или вбиваемой заостренными нижними краями в почву. Можно также вырезать соответствующий монолит ножом, что обеспечивает несколько меньшую точность. Можно брать пробы меньшей площади, вырезаемые бурами. На почвах с обильным включением щебенки можно осторожно наполнять почвой сосуд определенной емкости, объем которого соответствует данному объему пробы.

Вырезанный монолит рекомендуется брать 5 см толщиной; при послойном взятии проб сначала вырезается монолит поверхностного слоя почвы, затем лопатой зачищается поверхность следующего слоя и из него вырезается следующий монолит и т.д.

Извлечение мелких членистоногих на пробы осуществляется при помощи электора.

Принцип действия электора заключается в использовании таксисов, заставляющих почвенных животных выходить из анализируемого образца почвы. Поэтому метод “автоматической выборки” в электорах применим только в отношении более подвижных объектов; численность неподвижных стадий (яиц, куколок) методами автоматического сбора учесть нельзя. Плохо извлекаются из проб этим методом различные мелкие черви.

При извлечении из проб мелких членистоногих используют их чувствительность к высушиванию. Мелкие почвенные беспозвоночные не выно-

сят снижения влажности воздуха в почве ниже 100%, и при одностороннем подсушивании (сверху) пробы почвы мигрируют в более влажные слои (вниз).

В естественных условиях подсыханию подвергается верхний горизонт почвы, и избегающие высыхания почвенные беспозвоночные мигрируют в более глубокие слои почвы. Поэтому при подсушивании почвенной пробы ее обитатели проявляют ясно выраженный положительный геотаксис.

Проба доставляется к эклектору возможно скорее, желательно с сохранением естественной влажности (завернутая в клеенку или пергаментную бумагу, в ненарушенном состоянии). Монолит помещается осторожно на сито, вставленное в конусовидную воронку (жестяную, из гладкого картона или чертежной бумаги). Под нижнее отверстие воронки подставляются (прикрепляется) склянка (пенициллиновый флакон) с 2-3%-ным формалином или 70%-ным спиртом.

При подсушивании пробы (которую желательно помещать на сито по возможности в ненарушенном состоянии с сохранением естественного направления в ней слоев) помещаемой над ней лампочкой или на солнце находящиеся в пробе животные передвигаются вниз. Мелкие беспозвоночные проваливаются сквозь сито, попадают в воронку и по гладким крутым стенкам воронки скатываются в склянку, подставленную под воронку.

Необходимо следить, чтобы температура поверхности пробы не поднималась выше 35-40°C.

Имеются и другие типы эклекторов, например походная установка.

После окончания просушки пробы фиксирующая жидкость с находящимися в ней беспозвоночными процеживаются через складчатый фильтр, разграфленный графитным карандашом на квадратики (для удобства подсчета).

После процеживания фильтр расправляется на чашке Петри и под бинокулярной лупой подсчитываются все мелкие членистоногие по видам, используя специальные определители. С фильтра мелких насекомых переносят в спирт при помощи препаровальной иглы, заостренной деревянной палочки или мягкой кисточки.

В более влажную погоду для общего учета численности мелких членистоногих можно ограничиться анализом слоя 10 см толщины и удвоить полученные цифры. При учете же в сухой период года или при учете в целях точного выяснения послойного распределения их в почве необходимо выкопать яму, а затем из свежезачищенной стенки ее на разных исследуемых глубинах вырезаются монолиты почвы определенного объема.

Мелких членистоногих (клещей, ногохвосток и др.) лучше всего хранить в пробирках с 70%-ным спиртом, затыкаемых ватными пробками и помещенных в общую банку со спиртом данной концентрации.

Учет других групп микрофауны почвы (нематод, простейших, рако-винных амёб и др.) проводят с применением методов, описанных в специальной литературе.

4.3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ ПОЧВЕННО-ЗООЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Одна из важнейших методических трудностей почвенно-зоологических исследований – полнота учета видового состава исследуемых групп в данном биотопе или районе (Чернов, 1975).

Полнота учета видового состава достигается либо увеличением числа проб, либо более рациональным их размещением.

Основные экологические характеристики биоты (Чернов, 1975):

- качественный состав таксонов и экологических групп;
- количественные характеристики – встречаемость и обилие;
- трофо-энергетические характеристики.

Встречаемость занимает промежуточное положение между качественными и количественными характеристиками. Встречаемость определяется как число проб, где встречен данный вид (независимо от количества особей в пробе), к общему числу проб. Обычно встречаемость используется как показатель распределения по площади – гомогенного, спорадического, локального. Для этого встречаемость сопоставляется с численностью. Если численность в отдельных пробах высока, а встречаемость мала, то вид в пределах биотопа распределен скоплениями.

Коэффициент агрегации (λ):

$$\lambda = \sigma / \sqrt{M}$$

При λ близком к нулю – равномерное распределение особей по площади, при $\lambda=1$ – случайное.

Невысокая численность при высокой встречаемости предполагает гомогенное распределение. Встречаемость сильно зависит от размера пробы.

Из показателей обилия наиболее важен показатель массы организмов. При определении массы необходимо быстрое взвешивание.

Значимость определяется, прежде всего, по показателям метоболизма.

При индикации и диагностике с использованием почвенно-зоологических исследований часто используются некоторыми показателями разнообразия.

Коэффициент фаунистического сходства Жаккара:

$$K_s = C / (A + B - C),$$

где C – число видов, общих для двух сравниваемых группировок; A – число видов в первой группировке; B – то же, во второй.

Формула Серенсена при тех же обозначениях имеет вид:

$$K_s = 2C / (A + B)$$

Эти коэффициенты можно выражать как в долях, так и в процентах. Формула Жаккара более строгая, так как получаемые с ее помощью коэффициенты соответствуют реальному сходству, тогда как формула Серенсена дает относительные величины.

Индекс сходства по обилию получается как отношение удвоенной суммы минимальных значений (из каждой двух) общих видов к суммарному обилию всех видов в обоих сообществах, т.е.

$$K_n = 2 \sum c_{\min} / (a + b)$$

Коэффициент Б.А. Вайнштейна (биогеоценологического сходства):

$$K_w = K_n * K_f / 100$$

где K_f – коэффициент сходства Жаккара.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ

5.1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

5.1.1. ОТБОР ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

К отбору почвенных образцов следует относиться с большим вниманием, т.к. все последующие данные, часто полученные в результате очень сложных и трудоемких лабораторных исследований, будут зависеть от того, насколько правильно были собраны образцы. При взятии образцов следует учитывать чрезвычайную макро-, мезо- и микрогенность почв по всем свойствам и, в первую очередь, по биологическим.

В связи со значительной вариабельностью биологических признаков необходимо соблюдать достаточную повторность почвенных проб. С пробной площади можно брать 3-5 индивидуальных образцов и анализировать их отдельно. В этом случае получаются данные о пространственном варьировании свойств почвы. Для получения представления о среднем значении исследуемых показателей следует анализировать тщательно отобранный средний почвенный образец, который составляется смешиванием 3-7 индивидуальных проб массой по 100-200 г.

Образцы почвы отбирают в матерчатые мешочки, пергаментные или полиэтиленовые пакеты. Полиэтиленовые пакеты защищают почвы от высыхания, но при долгом хранении вызывают изменения в газовом составе почвы, поэтому они должны быть либо неплотно закрыты, либо регулярно проветриваться. При исследовании пашни пробы берут с глубины всего пахотного горизонта, при изучении свойств всего почвенного профиля — по генетическим горизонтам (снизу вверх). Разрез должен быть вырыт **непосредственно** перед взятием образцов. Использование старых открытых разрезов или разрезов периодически откапываемых и закапываемых допустимо только при условии зачистки лицевой стенки разреза не менее, чем на 50 см. Образцы берут по всей толще горизонта, что особенно необходимо для последующего пересчета результатов на столбик почвы с площадью поверхности 1 см². Для черноземов с их мощными гумусовыми горизонтами и постепенными переходами между ними образцы отбирают десятисантиметровым слоем как это общепринято в почвоведении из середины горизонта. При специальных исследованиях или при сложности

дифференциации почвы на генетические горизонты иногда применяют отбор проб сплошной колонкой через каждые 10 см.

Инструменты можно не стерилизовать. Достаточно перед отбором пробы их несколько раз погрузить в почву того варианта, который предстоит анализировать.

Микробиологические исследования должны быть сделаны в день взятия образцов, т.к. при хранении влажных образцов состав микроорганизмов в них сильно изменяется. При невозможности проведения анализа за 24 часа прибегают к высушиванию образцов или хранению образцов при низкой температуре (в холодильнике). Согласно литературным данным, в сухих образцах обнаруживается гораздо меньше микроорганизмов, чем во влажных, и сильно искажаются соотношения между их отдельными группами. Наши исследования по количественному учету микрофлоры свидетельствуют о не очень значительных изменениях при высушивании почвы. Кроме того, для исследования качественного состава микрофлоры часто рекомендуют высушивание как средство возвращения микрофлоры к начальным стадиям сукцессии при дальнейшем ее увлажнении. Образцы почвы сушатся на воздухе в защищенном от солнечных лучей месте. К рекомендованному в некоторых литературных источниках замораживанию образцов, в частности при помощи сухого льда, лучше не прибегать, так как оно тоже может исказить результаты определения численности, повышая десорбцию микроорганизмов.

Биохимические показатели рекомендуется определять в свежевысушенной почве (Галстян, 1978).

5.1.2. ПОДГОТОВКА ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для более полного выявления количественного и качественного состава микрофлоры анализируемые почвенные образцы подвергают специальной обработке. Обычно применяемое 10-минутное перемешивание почвенной суспензии в колбе с водой является очень несовершенным методом предварительной подготовки почв. По данным Д.Г. Звягинцева этот метод дает заниженные в несколько раз результаты, особенно в случае исследования сухих и хорошо оструктуренных почв. Наиболее эффективными оказываются механические воздействия (растирание почвы, увлажненной до состояния пасты), обработка на пропеллерной мешалке (микроизмельчитель тканей, миксер), обработка звуком низкой частоты и мощности.

Перед подсчетом микроорганизмов **прямыми микроскопическими методами** рекомендуется применять обработку почвенной суспензии в

отношении 1:10 (10 г почвы на 90 мл воды) на ультразвуковой установке УЗДН-1 (3 мин, сила тока 0,40 А, частота 15 кГц). Для определения почвенных микромицетов методами посева данный способ неприменим вследствие повреждения достаточно крупных клеток грибов ультразвуком.

При исследовании микрофлоры **методом посева** рекомендуется использование микроизмельчителя тканей (РТ-2). Обрабатывается почвенная суспензия (1 г почвы на 100 мл стерильной водопроводной воды). Время обработки 5 мин при 5000 об./мин.

В обоих случаях при отсутствии специального оборудования рекомендуется использовать растирание почвы, увлажненной до пастообразного состояния (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991). Для этого берут 1 г (а лучше 10 г) почвы, увлажняют ее до состояния пасты и растирают резиновым пестиком или пальцем в резиновой перчатке в фарфоровой чашке или ступке в течение 5 мин. Важно, чтобы почва не была слишком увлажнена или недоувлажнена. Именно в состоянии пасты она подвергается наилучшему диспергированию. Затем растертую почву количественно переносят в колбу с небольшими порциями воды, общее количество которой не должно превышать 100 мл.

Учет мицелиальных организмов грибов и актиномицетов на питательных средах имеет более условный характер по сравнению с учетом бактерий, так как в этих случаях величина зародыша, давшего колонию, является более неопределенной. Это может быть и спора, и гифа, и скопление гиф. Предварительная обработка дает возможность разбить гифы на куски примерно одинаковой величины, и хотя размер учитываемых зачатков продолжает различаться в несколько раз, но он уже не различается в десятки раз, как это было до диспергирования почвы.

5.2. ИЗУЧЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДАМИ ПРЯМОЙ МИКРОСКОПИИ

Прямые микроскопические методы дают возможность определять общее количество отдельных групп микроорганизмов. Однако даже и при применении прямых микроскопических методов можно подсчитать только количество бактерий. Особые микроскопические методы необходимо применять для подсчетов грибов и совершенно специфические — для подсчета почвенных водорослей и беспозвоночных животных. Таким образом, когда определяется общее количество микроорганизмов в почве (точнее было бы говорить об определении общего количества бактерий), то из полученных данных можно определить только биомассу бактерий, а не общую биомассу почвенных микроорганизмов.

Следует учитывать, что общее количество микроорганизмов (и их биомасса) характеризует только потенциальный запас микроорганизмов в почве, но эти цифры еще не говорят о том, какая часть микроорганизмов находится в активном, а какая часть в покоящемся состоянии.

Общее содержание (пул) микроорганизмов в почве — величина консервативная и малоподвижная, поэтому определение его мало пригодно для установления влияния различных факторов на микрофлору почв (например, влияния пестицидов, удобрений и т.д.). Прямые методы определяют в 100-1000 раз больше бактерий, чем посев на питательные среды, даже универсальные.

5.2.1. МЕТОД ВИНОГРАДСКОГО

Часто для прямого микроскопического изучения почвы применяют метод С.Н. Виноградского, причем обычно пользуются модификацией этого метода, предложенной О.Г. Шульгиной. Тщательно отобранную среднюю пробу подготовленной для анализа почвы массой 5 г помещают в 250-миллилитровую колбу, содержащую 45 мл воды. Вода не должна содержать клеток микроорганизмов. В течение 30 сек. дают осесть наиболее крупным почвенным частицам и затем пипеткой с точно вымеренной величиной капли наносят одну каплю на поверхность чистого обезжиренного предметного стекла. Одновременно с каплей суспензии на стекло наносят каплю 0,1% очищенного от микробных клеток агара. На стекле предварительно отмечают прямоугольник площадью 8 см², ширина которого равна ширине стекла. Нанесенную взвесь при помощи покровного стекла помешивают и равномерно распределяют по поверхности всего прямоугольника. Препарат подсушивают, фиксируют над пламенем газовой горелки 95% этиловым спиртом или парами осмия и окрашивают карболовым эритрозином (по 5 г карболовой кислоты и эритрозина на 100 мл воды). Окрашивание в зависимости от качества краски продолжается от 1 ч. до суток. Во время окрашивания препараты не должны высыхать, для чего их помещают в эксикатор, кристаллизатор или погружают в маленькие стаканчики с краской. Краску смывают, последовательно погружая стекла в 4-5 стаканов с водой. Препараты высушивают и помещают под микроскоп (масляная иммерсия, 90 X). Необходимо приготовить несколько повторных стекол.

Расчет количества клеток в 1 г воздушно-сухой или абсолютно сухой почвы проводят по формуле:

$$M = A \cdot 8 \cdot 10^9 (P + 100) / B \cdot V \cdot G,$$

где M — количество клеток в 1 г почвы; A — общее количество учтенных на стекле клеток; B — площадь поля зрения (мкм²), определяется при по-

мощи объект-микрометра; В — объем нанесенной суспензии (мл); г — количество просчитанных полей зрения; Р — влажность почвы (%).

После проведения количественного учета микроорганизмов следует вычислить величину биомассы микроорганизмов в почве.

Люминесцентно-микроскопические наблюдения отличаются большей определенностью по сравнению с методом Виноградского, и разные исследователи учитывают примерно одно и то же количество бактерий.

5.2.2. ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД

Одним из наиболее совершенных методов выявления, изучения и количественного учета микроорганизмов в их естественной среде обитания является люминесцентная микроскопия в падающем свете. Метод сводится к тому, что приготовленные из почвенной суспензии препараты окрашиваются специальным красителем (флуорохромом) — акридиновым оранжевым. При использовании данного метода достигается более уверенный подсчет бактерий в почве по сравнению с методом Виноградского. Яркие зеленые клетки хорошо заметны на темном или красном фоне почвенных частиц и препарата, причем микроскопия в отраженном свете позволяет учитывать и адсорбированные клетки, которые, как правило, не видны в проходящем свете (метод Виноградского). В нашей стране метод применяется в модификации Звягинцева и Кожевина (Методы, 1991)

ХОД АНАЛИЗА.

1. Почвенную суспензию (1:10) сразу же после предварительной подготовки (см. выше) переносят в мерный цилиндр на 100 мл. После 2-минутного отстаивания пипеткой отбирают 2 мл суспензии из средней фракции (с отметкой на цилиндре 50 мл) и переносят в колбу с 18 мл воды.
2. Перед приготовлением препаратов колбу энергично встряхивают и суспензию наносят на обезжиренное предметное стекло (0,01 мл на препарат) и равномерно распределяют петлей на площади 4 см² (квадрат 2х2 см). При данной площади на каждом стекле можно приготовить 3 препарата. Рекомендуется предварительно начертить расположение препаратов в натуральную величину на бумаге, на которую в дальнейшем кладут предметные стекла для приготовления препаратов.
3. Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре. Затем, после фиксации легким нагреванием на пламени спиртовки, препараты окрашивают водным раствором акридинового оранжевого (разведение 1 : 10000; 2-4 мин).

4. Избыток флуорохрома удаляют в процессе промывки, для чего стекла погружают на 10 мин в стакан или кювету с водопроводной водой. Окрашенные препараты высушивают при комнатной температуре.
5. Для микроскопии на препарат наносят каплю воды и покрывают обезжиренным покровным стеклом. Правильно приготовленный препарат не содержит пузырьков воздуха. Лишнюю воду удаляют фильтровальной бумагой. Препараты просматривают на люминесцентном микроскопе МЛ-1; МЛ-4; ЛЮМАМ-1; ЛЮМАМ-ИЗ (светофильтры ЖС-19, ЖС-18, объектив Х90 Л, окуляры Х4 или Х5).

Количество микробных клеток, содержащихся в 1 г почвы, вычисляют по формуле:

$$M = 4 \cdot a \cdot n \cdot 10^{10} / p$$

где М — количество клеток в 1 г почвы; а — среднее число клеток в поле зрения; р — площадь поля зрения (мкм^2); n — показатель разведения. В данном случае $n=100$, что приемлемо для верхних горизонтов почв основных типов, однако степень разведения может быть изменена в зависимости от численности микроорганизмов в конкретном образце. Желательно подобрать разведение таким образом, чтобы среднее число клеток в поле зрения составляло 5-10. На этих же препаратах в 50 полях зрения ведется подсчет длины актиномицетного мицелия с помощью окулярной линейки.

Препараты для количественного учета спор и мицелия грибов готовят так же, как и для бактерий. Для подсчета рекомендуется из каждого почвенного образца готовить 3 препарата и на каждом препарате подсчитывать споры и мицелий грибов в 50 полях зрения, измерение длины мицелия проводят с помощью окулярной линейки.

Окраску спор и мицелия грибов производят калькофлором белым. Этот краситель связывается преимущественно с хитином и целлюлозой клеточных стенок грибов, поэтому мицелий и споры легко выявляются по четко очерченной ярко-зеленой люминесценции. Разведение калькофлора белого, используемого для окраски, — 1 : 10 000, время для окрашивания 15 мин.

Для подсчета бактерий рекомендуется из каждого почвенного образца готовить два препарата и на каждом препарате подсчитывать клетки в 5 полях зрения. При подсчете клеток бактерий крайне важно не выбирать поля для подсчета, а переходить к новому полю зрения, поворачивая микроскоп столика на определенную величину. Следует избегать подсчитывать микроорганизмы в близко расположенных полях зрения из-за возможной корреляции между числом бактерий в них. Эти замечания справедливы только при количественном учете и, конечно, при других целях исследования становятся не обязательными.

Следует выделить моменты, от которых зависит успех метода. Одно из основных требований — применение тщательно обезжиренных стекол. Новые и использованные стекла предварительно кипятят в растворе стирального порошка, промывают и держат до употребления в свежей хромовой смеси (не менее 3-4 сут), в спирте или смеси Никитина (эфир : спирт, 1:1). Очень эффективным и проверенным авторами является способ натирания стекол сухим хозяйственным мылом с удалением последнего чистой сухой тканью.

Рекомендуется также готовить сразу большое количество основного 0,1% раствора акридинового оранжевого в дистиллированной воде, которым и пользоваться в течение всей серии опытов. Основной раствор красителя следует хранить при 4°C в посуде из темного стекла с притертой пробкой. Рабочие растворы акридина оранжевого (1:10000) не хранят. При микроскопии применяется специальное нелюминесцирующее иммерсионное масло, которое при необходимости можно заменить аптечным парафиновым или вазелиновым маслом. Предварительно следует убедиться, что заменитель не люминесцирует.

В работе (Полянская, Головченко, Звягинцев, 1998) описывается метод определения жизнеспособности выявляемых в почве спор и мицелия. Для этого готовятся по стандартной методике препараты. Для сохранения жизнеспособности грибов приготовленные препараты до высыхания мазков помещают во влажную камеру и инкубируют при 28°C и 100% влажности в течении около 48 часов (время инкубирования устанавливают экспериментально). После инкубирования препараты высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают калькофлором белым. Контролем служат препараты, фиксированные и окрашенные сразу после приготовления мазков.

5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ПОСЕВА НА ПЛОТНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Метод посева на твердые питательные среды широко распространен в почвенной микробиологии. Он дает возможность довольно просто выделять чистые культуры микроорганизмов, что повышает его ценность. Выделенные чистые культуры могут подвергаться идентификации и дальнейшему всестороннему изучению их физиологии и биохимии, образования ими физиологически активных веществ, их действие на другие микроорганизмы, растения и т.д. При этом удастся использовать один метод для изучения разных групп микроорганизмов — бактерий, актиномицетов и грибов.

В то же время чашечный метод имеет целый ряд недостатков. В частности, он позволяет выделить только одну узкую группу почвенных микроорганизмов. Общее количество микробов (особенно бактерий и грибов) возможно учесть только прямым микроскопированием.

Методические проблемы использования метода посева:

- значительные различия при разной предварительной подготовке образцов почв
- количество колоний микробов при приготовлении параллельных разведений навесок почвы уменьшается не пропорционально разбавлению, а в гораздо меньшей степени;
- невозможность полного учета всех микроорганизмов;
- сомнительность соответствия данных численности и состава микрофлоры, полученных посевом и микрофлоры нативной почвы;
- значительная разница в учете численности бактерий в воздушно-сухих образцах при подготовке разными методами (в 3-20 и даже в 1000 раз), особенно на оструктуренных почвах;
- при высыхании почвы клетки микроорганизмов не погибают, а переходят в адсорбированное состояние, поэтому их численность при определении с обычной обработкой снижается;
- после промораживания почвы в холодильнике при -5°C численность бактерий резко увеличивается за счет диспергирования почвы и др.

Сущность метода посева на твердые питательные среды состоит в нанесении почвенной суспензии, содержащей микроорганизмы, на поверхность твердой питательной среды (агар, кремнекислый гель). Попавшие на среду клетки образуют колонии, видимые невооруженным глазом. При количественном учете принимают, что каждая колония возникает в результате деления одной клетки.

Для качественной и количественной характеристика микрофлоры почв чаще всего используются следующие среды: МПА, КАА, Чапека, Эшби и т.д.

5.3.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕД

Универсальные среды — это среды для учета общей численности аэробных или факультативно-анаэробных сапротрофных бактерий, а также дифференцированного учета следующих групп бактерий: грамотрицательных неспороносных бактерий, спорообразующих и коринеподобных.

Мясо-пептонный агар (МПА) — для выделения аммонифицирующих бактерий: питательная среда выпускается в виде порошка. Количество порошка необходимое для приготовления среды написано на упаковке. Для лучшего застывания рекомендуется добавлять сухой агар (10 г/л).

Среда Добровольской и др. (1989) — для выявления разнообразия бактерий и актиномицетов (в г/500 мл дистиллированной воды): пептон — 1; глюкоза — 0,5; дрожжевой экстракт — 0,5; гидролизат казеина — 0,5; солодовый экстракт — 0,5 (сусло — 50 мл); глицерин — 2,5 мл, агар — 10. рН 7,0. Для подавления развития грибов используется нистатин (50 мг/л среды).

Крахмало-аммиачный агар (КАА) — для выделения актиномицетов и амилалитических бактерий (в г/500 мл дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; MgSO_4 — 0,5; NaCl — 0,5; CaCO_3 — 1,5; крахмал растворимый — 50; сухой агар — 10.

Среда Чапека — для выделения бактерий и актиномицетов (в г/500 мл дистиллированной воды): KCl — 0,25; MgSO_4 — 0,25; K_2HPO_4 — 0,5; FeSO_4 — 0,005 (на кончике скальпеля); NaNO_3 — 1; CaCO_3 — 1,5; глюкоза или сахароза — 10; сухой агар — 10. Для подавления бактерий и выявления грибов используется подкисленная среда Чапека. Для этого в литровую колбу с 500 мл чуть остывшей расплавленной средой Чапека, перед внесением в чашки Петри добавляют 2 мл молочной кислоты или 0,5 г лимонной кислоты. рН среды при этом должно быть на уровне 4,5-4,7 (контролируется с помощью индикаторной бумаги). Вместо подкисления среды при исследовании нейтральных и щелочных почв правильнее использовать подавление бактерий антибиотиками (стрептомицин, пеницилин).

Среда Эшби — для выделения олигонитрофильных микроорганизмов, в частности бактерий р. *Azotobacter* (в г/500 мл дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 0,1; MgSO_4 — 0,1; NaCl — 0,1; K_2SO_4 — 0,05; CaCO_3 — 2,5; маннит или сахароза — 10; сухой агар — 120.

Голодный агар: к 1 л водопроводной воды прибавляют 20 г агара. Иногда агар предварительно очищают промыванием или другими способами.

Почвенный агар Локхиды: K_2HPO_4 — 0,2 г; агар — 15 г; почвенный экстракт — 1 л. Почвенный экстракт готовят из сильноокультуренной удобренной почвы. Просеянную через 3-миллиметровое сито почву смешивают с равным по массе количеством дистиллированной воды. Смесь автоклавируют 1 ч. при 120 °С. Горячую отстоявшуюся суспензию фильтруют через бумажный фильтр при отсасывании. Нейтрализуют до рН 7,2.

Почвенный агар: к 900 мл водопроводной воды добавляют 100 мл вытяжки почвы и 15 г агара; среду стерилизуют 1 ч. при 120 °С.

Специальные среды — это среды для выделения и идентификации бактерий, принадлежащих к различным семействам или родам. Если при первичном выделении из биотопов на универсальные среды вырастает значительное количество бактерий, принадлежащих к различным родам, то при их изолировании в чистую культуру на ту же среду многие из них

не перевиваются. Следовательно, необходим подбор специальных для рода или семейства сред с целью изучения чистых культур бактерий и их дальнейшей идентификации. Если микробиолог преследует цель выделить бактерии определенного рода из разных субстратов, он должен воспользоваться как специальными средами, так и приемами селективного ингибирования посторонних группировок.

Для преимущественного выделения из почвы грамположительных спорообразующих бактерий почвенную суспензию пастеризуют прогреванием при 80°C в течение 10-15 мин. При этом вегетативные клетки погибают, а споры сохраняются.

Для подавления роста бацилл при учете стрептомицетов, нокардий, коринеформных бактерий и грамотрицательных бактерий Добровольская с соавт. (1989) рекомендует добавление в питательные среды красителя метилового красного (0,015%).

Элиминирование грамотрицательных бактерий и селективное выделение коринеподобных бактерий проводят прогреванием почвы перед посевом 1 час при 80 °С.

Для учета грамотрицательных бактерий, особенно чувствительных к высушиванию образца, используют свежие образцы почвы. Кроме того, их рекомендуют выделять на МПА с добавлением 2-7% глицерина (Скворцова, 1981).

5.3.2. ПОДГОТОВКА ПОСУДЫ И МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПОСЕВА

Для посева необходимо подготовить на каждый почвенный образец следующее:

1. Колбу на 200-250 мл со 100 мл стерильной воды. В случае исследования верхних органогенных горизонтов с содержанием несколько миллионов КОЕ (колониеобразующих единиц) микроорганизмов в 1 г, можно пользоваться нестерильной отстоянной водопроводной водой или дистиллятом. Опасения того, что дистиллированная вода стрессорно скажется на почвенной микрофлоре не оправданы, ввиду того, что при контакте с почвой она растворит некоторое количество солей.

2. Пробирки, содержащие по 9 мл стерильной воды, для приготовления разведений (количество необходимых пробирок определяется тем, какое последнее разведение необходимо приготовить для посева, обычно берут 3-4 пробирки).

3. Стерильные пипетки (желательно концевые) на 1 мл. Для каждого нового разведения нужна новая пипетка, кроме того, нужна пипетка для

нанесения суспензии на чашки Петри. При поверхностном посеве необходимо отбирать пипетки с одинаковой величиной капли.

4. Стерильные шпатели Дригальского (для поверхностного посева) по одному на каждое разведение, из которого будут делать посев. Для каждой среды нужен свой шпатель.

5. Стерильные чашки Петри. Для каждого разведения, из которого делается посев, для каждого образца и каждой новой среды требуется 3-5 повторных чашек.

6. Стерильные среды в колбах. Удобно использовать колбы на 1 л. Колбы заполняют средой до половины от объема.

Пробирки с водой и колбы с водой и средами закрываются ватными пробками, накрываются бумажными колпачками и стерилизуются в автоклаве в течение 20 мин. при температуре 120 °С и давлении 1 атм. Колбы со средами перед автоклавированием подписывают водостойким маркером или снабжаются флажками с надписью простым карандашом. Пипетки, шпатели и чашки Петри оборачиваются в бумагу и стерилизуются в сушильном шкафу 2 часа при температуре 160-180 °С. Для стерилизации пипеток удобно пользоваться специальными картонными или металлическими пеналами.

После предварительной подготовки почвы к микробиологическому посеву готовят разведения почвенной суспензии.

Обычно разведения проводят в стерильной водопроводной воде, пользуясь некоторым постоянным коэффициентом разведения чаще всего равным 10. Таким образом, получают серию разведений, в которых концентрации клеток образуют геометрическую прогрессию (рис. 6). В ходе одного опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, так как в этом случае при большом числе подсчетов уменьшается вероятность ошибки. Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исходной суспензии, взятый стерильной пипеткой, переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды — это 1-е разведение, 1:10. Полученную в 1-м разведении суспензию с помощью новой стерильной пипетки тщательно перемешивают, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру выполняют 3-5 раз, что обеспечивает перемешивание суспензии и уменьшает адсорбцию клеток на стенках пипетки. Затем этой же пипеткой берут 1 мл полученного разведения и переносят его во 2-ю пробирку — это 2-е разведение, 1:100. Таким же образом готовят и последующие разведения. Степень разведения определяется плотностью исходной суспензии микроорганизмов, которая зависит от группы учитываемых микроорганизмов, типа почвы, горизонта, сезона, влажности почвы, вида посева и т.д. Соответственно число разведений тем больше, чем

больше плотность исходной суспензии. Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать отдельную пипетку. Пренебрежение этой предосторожностью может привести к получению ошибочного результата, иногда в 100 и более раз превышающего истинный. Ошибка связана с адсорбцией микроорганизмов на стенках пипетки, в результате чего не все клетки удаляются из пипетки при каждом разведении. Часть клеток, оставшаяся на стенках пипетки, может затем попасть в одно из последующих разведений, что и явится причиной получения завышенного результата.

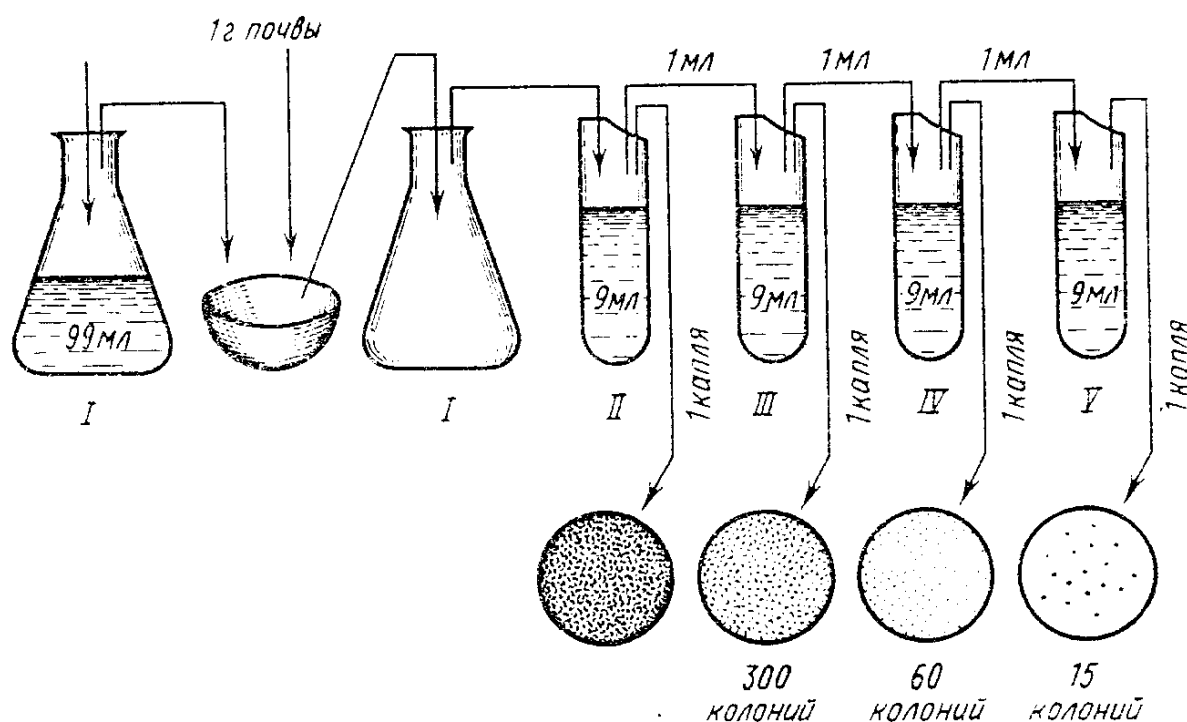


Рис. 6. Схема приготовления почвенной суспензии:

I-V — колба и пробирки для последовательных 10-кратных разведений

Ориентировочно можно сказать, что при определении количества бактерий и актиномицетов верхних горизонтов почвы глубинным посевом на МПА, КАА, среду Чапека используются разведения 10^{-4} - 10^{-6} , а количества микроскопических грибов на подкисленной среде Чапека — 10^{-2} - 10^{-4} . Для нижних горизонтов почв соответственно используются разведения на один порядок меньше.

В чашку Петри наливают расплавленную на электроплитке с асбестовой прокладкой, водяной бане или в сушильном шкафу агаризированную среду около 20 мл среды в каждую чашку. Меньшее количество среды (около 10 мл) способствует замедленному росту и меньшим размерам ко-

лоний, колонии при этом меньше зарастают. Однако при этом среды быстрее высыхают при длительном хранении.

При поверхностном посеве среды в чашки Петри разливают предварительно, затем после застывания среды чашки помещают в простерилизованный и нагретый до 80°C сушильный шкаф. Чашки подсушивают открытыми для удаления воды с крышек и появления муаровой поверхности на агаре, после чего их охлаждают до комнатной температуры и в тот же день проводят посев. Когда среда готова, на ее поверхность стерильной пипеткой наносят строго определенный объем (0,05-0,2 мл) соответствующего разведения. Этот объем распределяют стерильным стеклянным шпателем по поверхности агаризованной среды в первой чашке Петри. Затем тем же шпателем проводят по поверхности плотной среды во 2-й и 3-й чашках. Высевы на плотную среду производят обычно из 2-3 последних разведений. Из каждого разведения делают 2-4 параллельных высева. Посевы из разведений можно делать одной пипеткой, но начинать следует **обязательно** с большего разведения. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель. Засеянные чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

При глубинном посеве в чашку Петри вносят 1 мл почвенной суспензии, а затем около 10-20 мл расплавленной среды (45°C), после чего содержимое чашки легонько покачивают для равномерного смешивания. Важно приливать среду расплавленную, но не горячую. Допустимая температура среды определяется способностью щеки или тыльной стороны ладони выдержать контакт с колбой в течение 10 с. Крышку чашки Петри закрывают и тщательно смешивают питательную среду с посевным материалом легким вращательным движением чашки по поверхности стола, после чего чашки Петри оставляют на горизонтальной поверхности до застывания агара. Когда среда застынет, засеянные чашки Петри переворачивают и помещают в термостат.

Для определения количества клеток анаэробных микроорганизмов чашки Петри с плотной средой после того, как произведен посев, помещают в анаэростаты. Иногда для определения числа некоторых анаэробов плотную среду после засева оставляют в пробирках. Поверхность застывшей среды заливают парафином или той же стерильной средой. В этом случае для лучшего рассмотрения колоний микроорганизмов среды рекомендуется осветлять.

Засеянные чашки переворачивают вверх дном и помещают в простерилизованный термостат (обычно при температуре 28-30°C). Допустимо культивировать микробов при комнатной температуре (20-22°C). При этом колонии растут медленнее, имеют меньшие размеры и реже зарастают быстрорастущими организмами.

5.3.3. УЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

При подсчете колоний закрытые чашки Петри просматривают в проходящем свете и с внешней стороны водостойким маркером отмечают колонии. Наиболее точный подсчет получается, если на чашке развивается 50-200 колоний бактерий и актиномицетов и 30-50 колоний грибов.

Если число колоний на чашке превышает 150, то для их подсчета удобно пользоваться темным диском, в котором строго параллельно и на одинаковом расстоянии друг от друга вырезаны 5 полос (рис. 7). Диск накладывают на дно чашки Петри и подсчитывают колонии микроорганизмов, расположенные внутри полос. Подсчитывают и те колонии, большая часть которых попадает в полосу подсчета. При неравномерном расположении колоний их количество подсчитывают в двух взаимно перпендикулярных направлениях, для чего решетку следует повернуть под углом 90°.

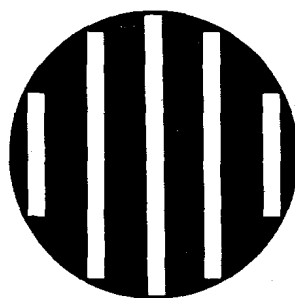


Рис. 7. Решетка для подсчета колоний микроорганизмов на чашках Петри

Число колоний на чашке вычисляют по формуле

$$n = aS,$$

где a — число выросших колоний на площади полос; S — площадь полос,

Учет бактерий на МПА проводят, начиная со 2 суток после посева ежедневно в течение 3-5 дней в зависимости от скорости роста.

Учет микрофлоры на КАА производят с 4 суток в течение 7-20 суток. Из общего числа микроорганизмов отдельно учитывают актиномицеты.

Учет грибов на кислой среде Чапека проводят на 3-5 сутки.

Во избежание зарастания чашек необходимо учитывать микроорганизмы дважды, а то и трижды.

Просчитав количество колоний на всех параллельных чашках, определяют среднее количество колоний на чашке и затем делают пересчет на 1 г воздушно-сухой или абсолютно сухой почвы по формуле:

$$a = \bar{b} \cdot v \cdot g / d,$$

где a — количество клеток в 1 г почвы; \bar{b} — среднее количество колоний на чашке; v — разведение, из которого сделан посев; g — количество капель в 1 мл суспензии (только при поверхностном посеве); d — масса воздушно-сухой или абсолютно сухой почвы, взятой для анализа.

Если посев производят из влажной почвы, нужно взять навеску почвы 5-10 г для определения влажности почвы, высушить ее, определить содержание воды в процентах и сделать пересчет количества микроорганизмов на 1 г воздушно-сухой почвы. В литературе встречается пересчет числа микроорганизмов на 1 г почвенного органического вещества или на 1 г азота, но, поскольку прямой связи между общим содержанием органического вещества или азота и развитием микроорганизмов нет, такие пересчеты делать вряд ли целесообразно.

5.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ КОМОЧКОВ ОБРАСТАНИЯ

При относительно низкой численности дрожжей в почве метод посева из разведений оказывается малоприменимым. В этом случае используют метод почвенных комочков. Для этого навеску почвы в 10-20 г увлажняют стерильной водой в фарфоровой чашечке до состояния густой пасты и раскладывают в виде 25-50 комочков по 0,05 или 0,1 г (размером примерно со спичечную головку) на 2-3 чашки Петри с заранее разлитой застывшей средой Эшби. Для удобства под чашку подкладывают трафарет с точками. Используют подкисленную при температуре не выше 40°C до pH 4,0 среду Эшби. При работе с нейтральными почвами лучше использовать стептомицин (80 мг/л). Среду наливают в чашки толстым слоем, чтобы она дольше не пересыхала. Инкубируют в течение 3-4 недель при комнатной температуре (18-22°). Учет проводят по числу комочков со слизистыми обрастаниями и выражают результаты в процентах. Так как комочки почвы могут обрастать и бактериями, дающими на этой среде слизистый рост, то учет необходимо проводить с микроскопическим контролем. Края слизистых обрастаний просматривают непосредственно на чашке с объективами микроскопа 8× или 10×. При увеличении в 100-120 раз крупные клетки липомицетов хорошо различимы. При подсчете обрастаний на комочках почвы смешанные бактериально-дрожжевые колонии учитывают как дрожжевые.

Важным показателем биологического состояния почвы служит численность (обилие) бактерий рода *Azotobacter*. Они учитываются аналогично выше описанной процедуре на неподкисленной среде Эшби. Колонии подсчитывают, в зависимости от температуры, через 5-10 дней комочки

почвы, образовавшие вокруг себя слизистые колонии, а затем определяют, какое отношение (в %) они составляют с общим числом комочков почвы (относительная оценка плотности населения учитываемых групп микроорганизмов в почве). Слизистые обрастания бактерий рода *Azotobacter* отличаются от дрожжей, образующих аналогичные обрастания микроскопированием и морфометрически, по коричневому цвету слизи, который появляется через 10-14 дней.

5.3.5. МЕТОДЫ РАСЧЕТА КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ БИОМАССЫ В ПОЧВЕ

Количество микроорганизмов обычно пересчитывают на 1 г воздушно-сухой почвы. Если посев проводят из воздушно-сухой почвы, то никаких пересчетов вообще не требуется. Если посев производят из влажной почвы, нужно взять навеску 5-10 г для определения влажности почвы, высушить ее, определить содержание воды в процентах и сделать пересчет количества микроорганизмов на 1 г воздушно-сухой почвы.

Расчет количества микроорганизмов на 1 г почвы не дает возможности вскрыть специфику количественного распределения микроорганизмов по почвенным типам. В этом случае пересчет необходимо вести на весь профиль почвы. Для этого производят пересчет на 1 см² поверхности почвы, учитывая количество микроорганизмов во всех генетических горизонтах, вплоть до почвообразующей породы (Звягинцев, 1978).

Расчет количества микроорганизмов в определенном слое почвы или генетическом горизонте следует проводить по формуле $M = a \cdot b \cdot d$, где M — количество микроорганизмов в данном горизонте в расчете на 1 см² поверхности этого горизонта; a — количество микроорганизмов в 1 г почвы; b — мощность генетического горизонта или слоя почвы (в см); d — объемная масса почвы, т.е. удельная масса почвы с ненарушенной структурой.

Затем следует суммировать количество микроорганизмов, определенное в разных горизонтах: $M_{\text{общ.}} = M_A + M_B + M_C$, где M_A , M_B , M_C — количество микроорганизмов в последовательных слоях или почвенных горизонтах.

По данным прямой микроскопии (но не метода учета на питательных средах!) рассчитывают биомассу бактерий, грибов, актиномицетов в 1 г почвы или на 1 га почвы. В последнем случае необходимо иметь данные по содержанию микроорганизмов в разных почвенных горизонтах.

При определении биомассы микроорганизмов следует исходить из следующих предпосылок. Средний размер почвенных бактерий равен 0,1 мкм³, средний диаметр гиф грибов равен 4 мкм, актиномицетов — 0,5 мкм, удельная масса (плотность) всех микроорганизмов равна 1,1 г/см³. Для бо-

лее точных определений нужно в каждой конкретной почве учитывать средний размер микроорганизмов.

Определяют живую биомассу, содержащую 80% воды, и биомассу сухого вещества, которая равна 1/5 от живой биомассы микроорганизмов.

Соотношение численности (или биомассы) бактерий, актиномицетов и грибов в почве представляет большой интерес и характеризует как особенности почвы, так и особенности ее состояния в данный момент времени.

5.3.6. СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИЙ В ПОЧВЕ ПО ДАННЫМ МИКРОСКОПИИ И ПОСЕВА

Параллельное применение методов прямой микроскопии и метода посева почвенной суспензии на плотные питательные среды дает возможность оценить сукцессионные процессы в микробной экосистеме. Для этого определяется отношение численности бактерий по данным микроскопии к численности по посеву:

$$k = M / P$$

где k — коэффициент, отражающий различия между численностью бактерий по микроскопии и по посеву; M — численность бактерий по данным микроскопии; P — численность бактерий по посеву.

Теоретически обосновано, что возрастание k может указывать на «зрелость» экосистемы, а низкие значения k — на «молодость» экосистемы. Вниз по профилю k значительно возрастает.

5.4. ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

5.4.1. ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЙ

Бактерии вместе с сине-зелеными водорослями относятся к прокариотам (доядерным) — самой древней форме жизни на Земле. Клетки прокариот не имеют обособленного ядра. Генетический материал (ДНК) прокариот находится прямо в цитоплазме и не окружен ядерной мембраной.

Максимальной численности бактерии достигают в органических средах и почве. В 1 мл парного молока содержится свыше 3 млрд. бактерий, в 1 г чернозема может находиться свыше 10 млрд. бактерий.

Ориентировочная величина видового разнообразия бактерий крайне неопределенна и составляет 10000-1000000 видов (Заварзин, 1994). Это следует из очевидных недостатков традиционного подхода, который оце-

нивает разнообразие многих свободноживущих форм бактерий лишь на групповом уровне: аммонификаторы, целлюлозолитические и т.д. Самым главным недостатком является неучитывание организмов, относящихся к некультивируемым.

Большинство бактерий относится к классу истинных бактерий (Eubacteriae). Это, как правило, безъядерные одноклеточные организмы. Размножаются простым делением. Некоторые обладают подвижностью. Клетка истинных бактерий имеет неэластичную оболочку. Бактерии имеют различную форму — круглую (кокки), палочковидную (бациллы), изогнутую. К палочковидным бактериям относятся бактерии рода *Bacillus* — подвижные и неподвижные бактерии, обладающие способностью образовывать споры внутри клеток при неблагоприятных условиях среды. Из неспороносных палочковидных бактерий в почве чаще всего встречаются представители родов *Pseudomonas* и *Bacterium*. К изогнутым палочковидным бактериям относятся вибрионы (р. *Vibrio*, р. *Spirillum*, р. *Spirochaetta*). Специфическими обитателями почв, не обнаруженные в других субстратах, являются олиготрофные представители *Pedomicroium*, *Metallogenium*, *Seliberua*, *Gallionella* (Аристовская, 1980).

Только прокариотные микроорганизмы способны к усвоению газообразного молекулярного азота. Благодаря азотфиксирующей деятельности бактерий в почву ежегодно поступает не менее 30-50 кг связанного азота, а в тропиках — до 100 кг (Умаров, 2001).

Бактерии способны очень быстро размножаться при поступлении свежего органического вещества. Неспороносные формы размножаются быстрее, чем бациллярные. Поэтому бациллы встречаются на более поздних этапах сукцессии. К тому же они обладают более мощным ферментативным аппаратом и могут питаться веществами, недоступными неспороносным бактериям. Большинство почвенных бактерий относится к сапрофитам.

Молодые, примитивные почвы богаче грамположительными бактериями, в том числе коринеморфными, чем более зрелые со сформировавшимся дифференцированным профилем, в котором доминируют грамотрицательные бактерии.

При анализе вертикального распределения бактериальных сообществ в биогеоценозах в ряду: филлоплана растений → подстилка → почвенные горизонты выявлена смена бактериальных ярусных доминантов по схеме: псевдомонады → бациллы → бактерии актиномицетной линии → олиготрофы (Добровольская, Лысак, Звягинцев, 1996). Подобная тенденция с некоторыми особенностями прослежена для всех типов зональных почв. Такая смена доминирующих групп бактерий была установлена при исследовании

довании этапов разложения растительных остатков и в модельных экспериментах.

Выделение из почв на МПА, среде Добровольской и др. средах бактерии дифференцированно учитываются по группам на основании культуральных особенностей (диаметр, форма, консистенция, рисунок колоний, пигменты внутриклеточные и внеклеточные), теста с 3%-ным КОН (для разделения на грамположительные и грамотрицательные) и микроскопии основных типов колоний.

На приведенных выше средах возможен рост, а, следовательно, и выделение многих родов бактерий (50-60). Однако часто бывают ситуации, когда учет той или иной группы бактерий бывает невозможен из-за доминирования в анализируемом субстрате быстро растущих или широко распространяющихся по чашке колоний, препятствующих росту медленно растущих форм бактерий. В таких случаях необходимо использовать приемы селективного ингибирования одних групп бактерий с целью учета других.

Методы и тесты родовой идентификации

Идентифицируемая культура должна быть чистой. Для получения чистой культуры проводят посев биомассы из колонии на подсушенную поверхность той агаризованной среды, на которой была выделена культура из субстрата.

Пигментация бактериальных культур. Внутриклеточные и внеклеточные пигменты — наиболее наглядный признак, позволяющий провести предварительную дифференциацию колоний на чашке. Внутриклеточные пигменты сообщают окраску самой колонии, внеклеточные — диффундируют в среду и окрашивают ее. Наиболее распространен среди бактерий желтый внутриклеточный пигмент. Он свойствен ряду таксономически различных бактерий: псевдомонадам, ксантобактеру, эрвиниям, флавобактериям, многим представителям коринеподобных бактерий. Оранжево-красные пигменты образуют бактерии группы *Flavobacterium* — *Cytophaga*, миксобактерии, коринеподобные бактерии родов *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*. Причем одни культуры способны образовывать оранжевый пигмент (каротиноидный) только на свету (скотохромогенные бактерии), другие — при изменении окислительно-восстановительных условий (пропионово-кислые бактерии), у третьих — наблюдается постепенное появление оранжевой окраски по мере развития культуры (бrevибактерии). Розово-красные оттенки пигментации свойственны бактериям родов *Serratia*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*. Коричневый или черный пигменты образуются многими видами бацилл и азотобактером (при старении культуры). Внутриклеточный фиолетовый пигмент ха-

рактен для культур рода *Chromobacterium* и одного из видов *Pseudomonas*.

Образование внеклеточных флюоресцирующих пигментов служит важным диагностическим признаком при разделении рода *Pseudomonas* на секции. Внеклеточные желто-зеленые флюоресцирующие пигменты могут также выделяться спириллами и азотобактером. Описание условий, в которых выявляются различные пигменты псевдомонад, дано в руководстве И.Н. Скворцовой (1981).

Форма, поверхность и консистенция колоний. Культуральные признаки имеют разную таксономическую значимость в разных группах бактерий. Так, в группе грамотрицательных атипичных бактерий форма, размер и консистенция колоний практически не отличаются у представителей разных родов и имеют, следовательно, низкую диагностическую ценность. В группе спорообразующих бактерий возможно провести предварительную дифференциацию даже на видовом уровне на основании формы и характера поверхности колонии (Скворцова, 1981). Колонии в виде башен из плотной слизи со складчатой поверхностью, характерные для представителей родов *Beijerinckia* и *Derxia*, сразу привлекают внимание исследователя. Специфические колонии образуют миксобактерии: либо плоские и тонкие с большим числом концентрических складок или радиальных линий, широко распространяющиеся по поверхности среды, либо складчатые, из плотной слизи, имеющие неправильную форму и растущие в виде языков или отдельных скоплений и струй. Колонии многих видов миксобактерии эродуют агар.

В группе коринеподобных бактерий диагностическую ценность имеет вращение колонии в агар благодаря образованию субстратного мицелия—роды *Promicromonospora* и *Nocardioidea*. Этим же бактериям свойственно образование воздушного мицелия на специфических средах. Следует отметить также в качестве общей закономерности, что колонии псевдомонад, как правило, плоские непрозрачные в проходящем свете, а большинство колоний коринеподобных бактерий непрозрачные (плотные), выпуклой формы, гладкие или слегка шероховатые.

Рост на плотной среде. Микроорганизмы, развиваясь на поверхности плотных сред, образуют характерные для данного вида колонии. Поэтому описание колоний — один из признаков, который необходим для идентификации исследуемого микроорганизма.

При описании колонии отмечают следующие признаки:

форму колонии (рис. 8) — округлая, амебовидная, ризоидная, неправильная и т. д.;

размеры — диаметр в мм; если размеры колонии не превышают 1 мм, то такие колонии называют точечными;

оптические свойства — прозрачная, полупрозрачная (просвечивает), непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая;

цвет — отмечают цвет колонии и выделяется или не выделяется пигмент в среду;

поверхность — гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая;

профиль (рис. 9) — плоский, выпуклый, кратерообразный, врастающий в агар и т. д.;

край колонии (рис. 10) — ровный, волнистый, лопастной, ризоидный и др.;

структуру колонии (рис. 11) — однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая;

консистенцию — маслянистая, тестообразная, вязкая, пленчатая;

способность к эмульгированию — равномерная или зернистая суспензия в воде, слабо или совсем не суспендируется в воде.

Край и структуру колонии определяют при малом увеличении микроскопа; чашку Петри в этом случае помещают на столик микроскопа крышкой вниз. Консистенцию колонии устанавливают прикосновением к ее поверхности микробиологической петлей.

При посеве клеток в толщу плотной питательной среды наряду с поверхностными колониями наблюдается образование глубинных и донных колоний. Глубинные колонии довольно однообразны и чаще всего имеют вид сплюснутых чечевичек. Лишь у немногих бактерий глубинные колонии напоминают клочки ваты из-за нитевидных выростов в толщу среды. Если микроорганизмы в процессе развития выделяют газы, образование глубинных колоний сопровождается разрывом плотной среды.

Еще менее характерны донные колонии, образующиеся при соприкосновении агаризованной среды с дном чашки Петри. Эти колонии обычно имеют вид довольно крупных, бесцветных прозрачных налетов.

Описание колонии часто дополняют описанием *роста микроорганизмов по штриху* на поверхности скошенной плотной питательной среды. Отмечают интенсивность роста по штриху: скудный, умеренный, обильный, — и его особенности: налет сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный в виде цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный. Характеризуют оптические свойства штриха, его цвет, поверхность и консистенцию.

При описании колонии и роста микроорганизмов по штриху обязательно указывают состав среды и возраст культуры, так как колонии одного и того же организма на различных средах могут отличаться рядом признаков.

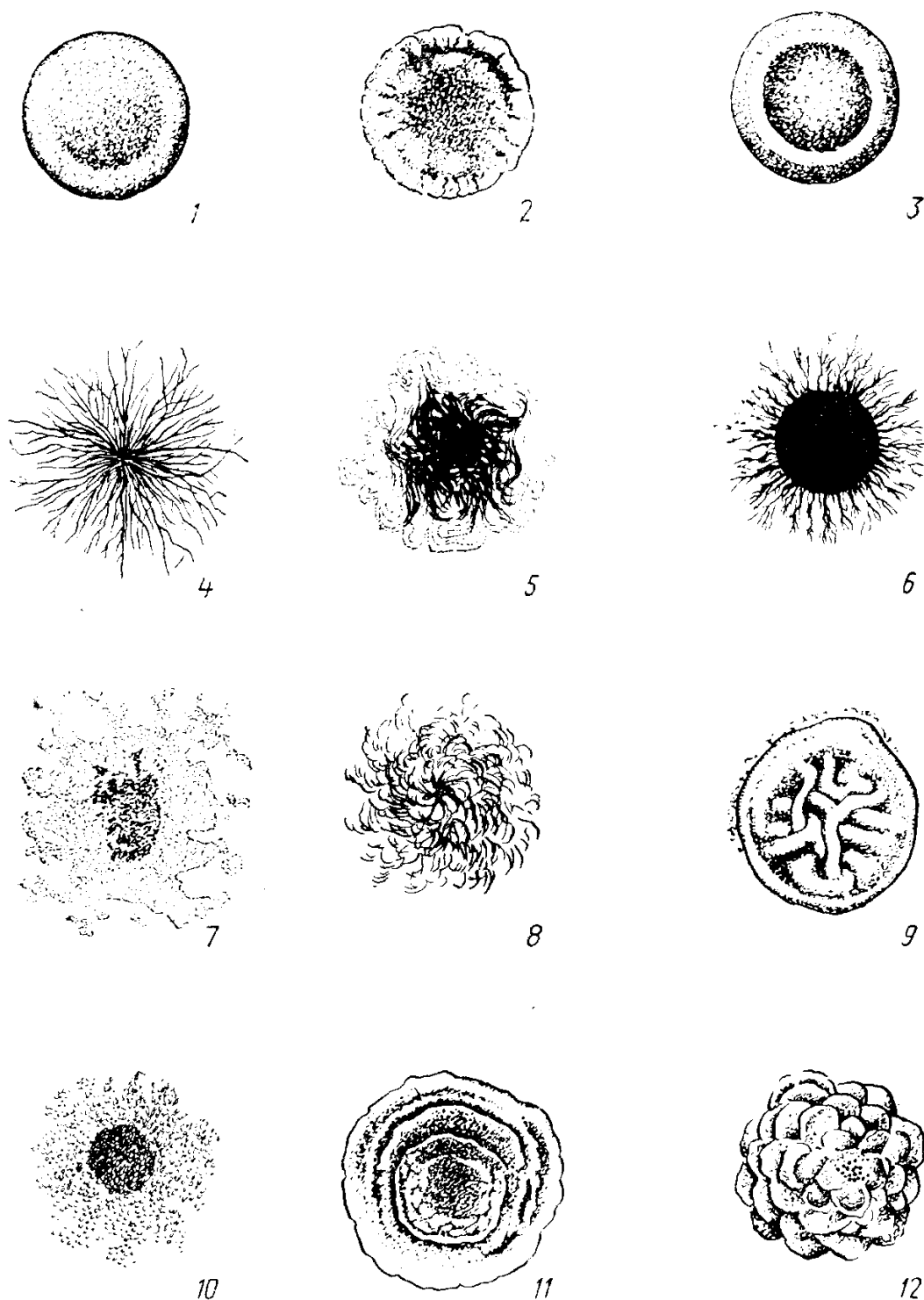


Рис. 8. Форма колоний: 1 — круглая; 2 — круглая с фестончатым краем; 3 — круглая с валиком по краю; 4 и 5 — ризоидные; 6 — с ризоидным краем; 7 — амёбовидная; 8 — нитевидная; 9 — складчатая; 10 — неправильная; 11 — концентрическая; 12 — сложная.

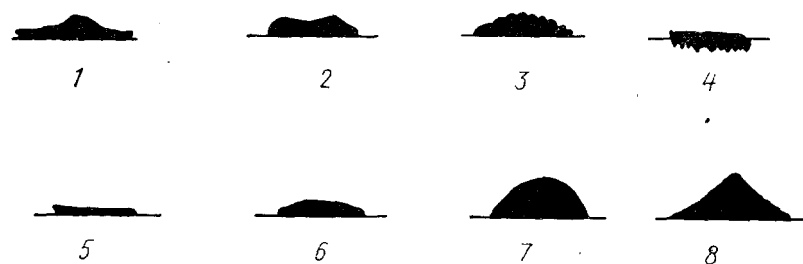


Рис. 9. Профиль колоний: 1 — изогнутый; 2 — кратерообразный; 3 — бугристый; 4 — врастающий в агар; 5 — плоский; 6 — выпуклый; 7 — каплевидный; 8 — конусовидный.

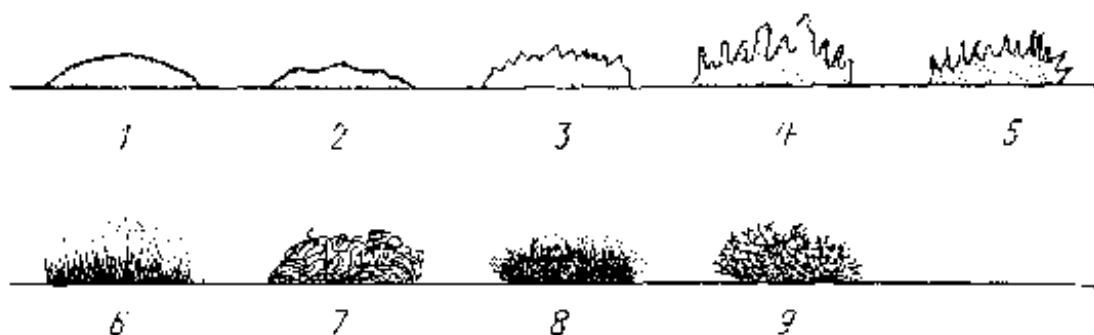


Рис. 10. Край колонии: 1 — гладкий; 2 — волнистый; 3 — зубчатый; 4 — лопастной; 5 — неправильный; 6 — реснитчатый; 7 — нитчатый; 8 — ворсинчатый; 9 — ветвистый.

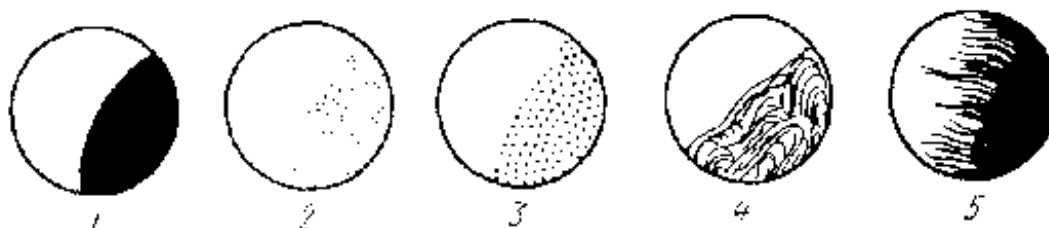


Рис. 11. Структура колонии: 1 — однородная; 2 — мелкозернистая; 3 — крупнозернистая; 4 — струйчатая; 5 — волокнистая.

В определителях обычно приведены описания колоний и роста микроорганизмов по штриху только на мясо-пептонном агаре или на мясо-пептонном агаре и мясо-пептонной желатине.

Рост в жидкой среде. Рост микроорганизмов в жидких питательных средах при стационарных условиях культивирования характеризуется большим единообразием по сравнению с ростом на плотных средах. Он сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Отмечая особенности роста в жидких средах, указывают, прежде всего, его интенсивность: скудный, умеренный или обильный. Помутнение среды может быть однородным, хлопьевидным или с шелковистой волнистостью. Если образуется пленка, указывают ее особенности: кольцеобразная или сплошная, тонкая или толстая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая, сухая или слизистая, всплывающая или опадающая. При образовании осадка характеризуют его свойства: скудный или обильный, рыхлый, плотный, хлопьевидный, зернистый или слизистый.

Обычно, для того чтобы охарактеризовать рост в жидкой среде, используют МПБ. Если изучаемый микроорганизм не растет в МПБ, то используют жидкую среду, которая обеспечивает хороший рост этого организма. Рост в МПБ и в жидких средах описывают, используя 4-7-суточные культуры, выращенные в стационарных условиях.

Морфологические признаки клеток бактерий

Размеры клеток определяют в адсорбированных на стекле препаратах при несильном оводнении, с помощью объективного микрометра. У кокков измеряют диаметр, у других форм — длину и ширину клетки. В окуляр микроскопа вставляют окулярную линейку, для чего вывинчивают линзу окуляра, помещают на его диафрагму окулярную линейку и вновь завинчивают. На столик микроскопа кладут препарат, фокусируют объект и определяют, скольким делениям линейки соответствуют длина и ширина клетки при данном увеличении микроскопа. Измеряют 10-20 клеток. Необходимо определить цену деления окулярного микрометра для данного увеличения микроскопа с помощью объективного микрометра.

Подвижность клеток определяют, используя молодую 12-24-часовую культуру, лучше всего в препарате “висячая капля”. Если клетки подвижны, то они перемещаются в поле зрения в разных направлениях в отличие от броуновского движения — пассивного перемещения клеток в токе воды в одном направлении. При добавлении к препарату 0,5%-ного водного раствора фенола собственное движение бактерий прекращается, броуновское — остается. По характеру движения можно предположительно судить о типе жгутикования.

Формы клеток (кокки, палочки, спирали, вибрионы и др.) должны быть описаны с учетом изменений в цикле развития. В одной и той же культуре можно обнаружить все возможные сочетания клеток.

У палочковидных клеток имеет диагностическое значение форма концов клетки — она может быть округлой, тупой, квадратной, заостренной. При видовой дифференциации бацилл форма концов клетки используется в качестве одного из таксономических признаков.

Дифференциация бактерий по Граму

Для разделения бактерий на грамположительные и грамотрицательные (что коррелирует с особенностями химического состава клеточной стенки этих двух групп бактерий) существует стандартная процедура окрашивания по Граму. С окраской по Граму коррелируют многие свойства бактерий. Например, грамположительные и грамотрицательные бактерии различаются по устойчивости к действию некоторых антибиотиков, лизоцима, кислотности среды.

Способность клеток окрашиваться по Граму зависит от их возраста. Клетки некоторых грамположительных бактерий, например первые генерации клеток *Bacillus subtilis*, после прорастания спор, ведут себя, как грамотрицательные. Известно также, что некоторые бактерии, будучи грамположительными в молодых культурах, в старых неодинаково интенсивно красятся по Граму. Поэтому красить по Граму всегда следует клетки молодых, чаще всего односуточных культур. Одновременно целесообразно окрашивать клетки микроорганизмов, отношение которых к окраске по Граму заранее известно.

На одном обезжиренном стекле делают мазки разных микроорганизмов: в центре — мазок клеток исследуемой культуры, слева и справа — контрольных микроорганизмов. Клетки одного из контрольных организмов (например, *Bac. mesentericus*) окрашиваются по Граму, а клетки другого (например, *Escherichia coli*) — не окрашиваются. Мазки должны быть тонкими, чтобы клетки равномерно распределялись по поверхности стекла и не образовывали скоплений, так как от толщины мазка зависят результаты окрашивания. Мазки высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. Фиксация химическими соединениями не рекомендуется.

1 способ. Мазки окрашивают в течение 1-2 мин карболовым генциановым фиолетовым, затем краситель сливают и, не промывая препарат водой, обрабатывают их 1-2 мин раствором Люголя до почернения. Сливают раствор Люголя и обрабатывают препарат для обесцвечивания 0,5-1,0 мин 96%-ным этиловым спиртом. При этом спирт наливают на мазки, слегка покачивая стекло, и меняют его несколько раз. Чтобы исключить излишнее обесцвечивание клеток, к спирту добавляют йод (2 мл 10%-ного спир-

тового раствора йода на 100 мл этанола). Затем препарат промывают водой и дополнительно окрашивают 1-2 мин водным фуксином. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные — красный цвет фуксина.

II способ (модификация Хукера). Мазки окрашивают 1 мин кристаллическим фиолетовым, быстро, в течение 3-4 сек. смывают краситель водой, излишек воды удаляют, а затем препарат окрашивают 1 мин раствором Люголя. После этого Люголь сливают, препарат промывают водой и так же, как и в первом случае, клетки обесцвечивают 96%-ным этиловым спиртом приблизительно в течение 30 с, нанося спирт на препарат по каплям, пока он не перестанет окрашиваться. Спирт смывают водой, и препарат обрабатывают раствором сафранина 30 с. Затем краситель смывают, препарат промывают водой, высушивают и исследуют с иммерсионной системой. При правильном режиме окрашивания грамположительные бактерии имеют синий, а грамотрицательные — красный цвет.

Дифференциация бактерий по Граму без окрашивания

Более быстрый и простой метод (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991) для дифференциации по Граму без окрашивания приводится ниже.

Клетки культур (лучше 1-2-суточные) помещают петлей в каплю 3%-ного КОН на предметное стекло, размещивают круговыми движениями и через 5—8 с петлю резко поднимают. Суспензия грамотрицательных бактерий становится вязкой и тянется за петлей, образуя мукоидные тяжи. Грамположительные бактерии равномерно распределяются в капле щелочи (как в воде). Реакция считается отрицательной, если образования слизистых тяжей не наблюдается в течение 60 с. Увеличение вязкости вызвано лизисом клеточных стенок грамотрицательных бактерий в растворе щелочи и освобождением ДНК.

Несмотря на высокий процент корреляции между грампринадлежностью известных культур и таковой, определенной вышеописанным методом, бывают исключения. Так, культуры целлюломонад и эрсковий, имеющие строение клеточной стенки, типичное для грамположительных бактерий, проявляют себя в тесте с КОН как грамотрицательные бактерии (образуют тяжи), в то время как грамотрицательные бактерии рода *Flavobacterium*, наоборот, не образуют вязкой массы подобно грамположительным бактериям. Вероятно, имеются и другие примеры исключений, поэтому метод дифференциации бактерий по Граму без окрашивания следует использовать лишь для предварительной диагностики либо подсчета

примерного соотношения колоний грамположительных и грамотрицательных бактерий на чашках.

5.4.2. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ

Согласно определителю Берджи (Bergey's manual determinative bacteriology, 1989) порядок Actinomycetales включает бактерии, имеющие тенденцию к образованию ветвящихся гиф, которые у некоторых родов развиваются в мицелий. Диаметр гиф варьируется в пределах 0,5-2,0 мкм, обычно 1,0 мкм. Актиномицеты широко распространены в природе. Представители порядка могут быть разделены на две группы — актиномицеты с окислительным метаболизмом, характерные для почвы и сопряженных с ней субстратов, и актиномицеты-бродильщики, обитающие преимущественно в теле человека и животных. Большинство актиномицетов — грамположительные аэробные бактерии.

Актиномицеты — особая группа бактерий. Мицелиальный план организации, присущий значительной части представителей порядка, определяет дифференциацию организмов, сложность жизненных циклов, биохимические и физиологические проявления, отличные от истинных бактерий. Экологическая стратегия актиномицетов подобна более сложно организованным мицелиальным организмам — эукариотам грибам. Тесно связана с актиномицетами группа коринеподобных бактерий.

Актиномицеты играют большую роль в процессах почвообразования и создания плодородия почв. Им приписывают различные функции в оздоровлении почв. Актиномицеты трансформируют и разрушают сложные органические соединения (целлюлозу, гумус, хитин, лигнин и др.), недоступные многим другим микроорганизмам. Почти все (или даже все) виды рода *Actinomyces* образуют специфические продукты жизнедеятельности, обладающие антибиотическими свойствами. Некоторые виды являются возбудителями заболеваний растений, животных и человека.

Виды рода *Actinomyces* (*Streptomyces*) имеют хорошо развитый мицелий, нити которого не септированы и не расчленяются с возрастом на палочки и кокки (рис. 12). Диаметр мицелия колеблется в пределах 0,5—1,5 мкм. На плотных агаризованных средах актиномицеты образуют плотные кожистые колонии различной структуры и внешнего строения — гладкие, бугристые, складчатые, бородавчатые, плоские, пленчато-морщинистые. Колонии срастаются с субстратом при помощи субстратного мицелия — нитей, отходящих от нижней поверхности колонии и развивающихся в толще среды. На поверхности колоний вырастает воздушный мицелий, на концах которого образуются спороносцы со спорами (рис. 13). Споры служат для размножения. Спороносцы бывают прямые или спирально за-

крученные. Спирали имеют разную длину и разное число завитков. Неспиральные спороносцы могут быть очень короткими в виде щетинок, удлиненными, волнистыми или длинными. Споры формируются одновременно на всем протяжении спороносца и бывают овальными, шаровидными, палочковидными, с округлыми или обрезанными краями. У некоторых видов на спорах образуются выросты (шипы) различной формы.

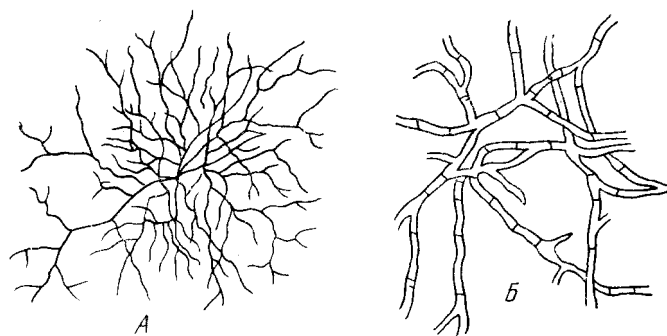


Рис. 12. Мицелий актиномицета и гриба при одинаковом увеличении:
А — актиномицет; Б — мицелиальный гриб.

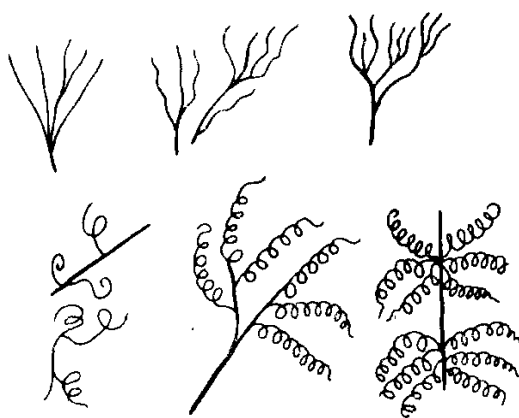


Рис. 13. Форма спороносцев у актиномицетов рода *Actinomyces*.

Культуры актиномицетов пигментированы или бесцветны. Среди пигментированных встречаются синие, фиолетовые, красно-оранжевые, оранжевые, желтые, зеленые, бурые, иногда черные актиномицеты. Неокрашенные виды различаются по цвету воздушного мицелия, который может быть серым, белым, розоватым, голубовато-зеленоватым, коричневым или оливковым.

Актиномицеты относятся к гетеротрофным организмам. В качестве источников углерода используют сахара, спирты, органические кислоты,

полисахариды, жиры, аминокислоты, белки и другие соединения. Источником азота для актиномицетов служат нитраты, аммонийные соли, нитриты, мочевины, аминокислоты, пептон, белки. Способность использовать то или иное соединение неодинакова у разных видов и штаммов актиномицетов.

Актиномицеты в подавляющем большинстве — аэробы, но среди них есть микроаэрофилы и небольшое число видов, которые могут жить в анаэробных условиях. Актиномицеты получают энергию при окислении органических веществ. Преобладающее число актиномицетов относится к мезофилам, термофилы встречаются редко. Для нормального роста большинства актиномицетов требуется нейтральная или слабощелочная реакция среды. Однако в кислых почвах обнаруживаются кислотолюбивые актиномицеты, с оптимальным ростом при pH 5,5—6,0 и не развивающиеся при pH около 7,5. Есть и щелочелюбивые актиномицеты.

Представители почвенных актиномицетов различаются между собой по морфологическим свойствам (тип и стабильность мицелия, число и расположение спор, образование склероциев, спорангиев, образование подвижных элементов), физическим свойствам (теплоустойчивость), химическим свойствам (строение клеточных стенок и целых клеток, тип липидов, изопреноидных хининов и др.).

Разделение актиномицетов на роды проводят согласно морфологическим, физиологическим и хемотаксономическим показателям. Морфологические свойства актиномицетов исследуются микроскопически в поверхностных (растущих на агаровых средах) культурах. Особое внимание при таком исследовании уделяется способу ветвления, образованию и расположению спор, присутствию или отсутствию спорангиев, наличию подвижных элементов, выявлению специальных структур, таких как склероции. Отдельно обозначается группа актиномицетов, обладающих эндоспорами.

При использовании традиционного метода посева из разведений почвенной суспензии на МПА, КАА, казеин-глицериновый агар (КАГ) и др. на чашках Петри вырастают колонии актиномицетов, принадлежащих в большинстве своем к стрептомицетам. Для выделения из почвы и сопряженных с ней субстратов других представителей порядка Actinomycetales требуются специальные селективные приемы, задерживающие рост банальных форм, прежде всего стрептомицетов.

Видовая идентификация многих родов актиномицетов не разработана, требуется создание простых, общедоступных ключей для определения видов.

Для ограничения роста грибов в питательные среды добавляют антибиотики циклогексимид (актидион) (50-100 мкг/мл), пимарицин и ниста-

тин (по 10-50 мкг/мл); для ограничения роста бактерий — полимиксин (5 мкг/мл) и пенициллин (1 мкг/мл). Добавление в среды пропионата натрия (4 г/л) и красителя бенгальского розового (35 мг/л) также задерживает рост грибов и бактерий.

В качестве селективных источников углерода и азота для выделения актиномицетов из почвы в питательные среды добавляют крахмал, глицерин, казеин и нитраты.

Как говорилось выше, при посеве почвенной суспензии на чашках с перечисленными питательными средами чаще всего вырастают колонии актиномицетов, принадлежащих к родам *Streptomyces*, а также *Streptoverticillium*, *Chainia*. Представители этих родов являются аэробными, грамположительными прокариотическими организмами. Они образуют разветвленный мицелий, обычно 0,5-2,0 мкм в диаметре, как правило, нефрагментированный, который подразделяется на первичный, или субстратный, и вторичный, или воздушный, мицелий; последний может отсутствовать. Споры неподвижны, образуются в виде цепочек на специальных спороносящих гифах воздушного мицелия. На поверхности колоний могут образовываться склероции.

Видовую идентификацию актиномицетов родов *Streptomyces*, *Streptoverticillium* и *Chainia* проводят по определителю Гаузе и др., 1983. Согласно ключу Гаузе для определения видов актиномицетов отобраны следующие диагностические признаки: морфологические — форма цепочек спор, характер поверхности оболочки спор; культуральные — окраска воздушного мицелия, окраска субстратного мицелия, наличие растворимых пигментов, наличие меланоидных пигментов.

Для изучения морфологического строения репродуктивных структур культуры актиномицетов выращивают в чашках Петри на средах, наиболее благоприятных для спороношения, обычно на овсяном агаре (г/л): овсяная мука (или геркулес) 20-65; агар — 20; pH 7,2. Тип образования цепочек и характер поверхности спор определяют у зрелых культур обычно на 7-14-й день роста, иногда в более поздние сроки.

5.4.3. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Грибы — обширная группа эукариотных организмов. Значительная часть грибов имеет мицелиальное строение. Диаметр гиф вегетативного мицелия колеблется от 5 до 50 и более мкм. Нити часто хорошо видны невооруженным глазом. Грибы размножаются бесполым и половым способами и чрезвычайно разнообразны по строению органов размножения, что является одним из основных критериев их систематики и деления на виды.

Царство *Mycota* объединяет собственно грибы *Eumycota* и слизевиков *Mухомycota* (Бабьева, Зенова, 1989). Истинные грибы *Eumycota* насчитывают более 100000 видов и разделяются на четыре класса: зигоспоровые, аскоспоровые, базидиоспоровые и несовершенные.

В почве находится огромное количество различных грибов, как в виде спор, так и в виде физиологически активного мицелия. Большая часть из них — сапрофиты, которые играют важнейшую роль в процессах почвообразования. Грибы начинают разрушение таких стойких соединений, как гумус, лигнин, хитин, дубильные вещества, клетчатка, делая возможным дальнейшее их использование другими организмами. Грибы активно участвуют в превращениях соединений азота и способствуют улучшению структуры почвы, агрегируя почвенные частицы. В процессе жизнедеятельности грибы выделяют различные физиологически активные вещества — ферменты, органические кислоты, витамины, антибиотики, токсины, влияющие на развитие других микроорганизмов и высших растений.

Сапротрофные грибы — главные редуценты в экосистемах суши. Грибы являются основными деструкторами таких стойких соединений, как лигнин, хитин, дубильные вещества, целлюлоза, гумус, делая возможным дальнейшее их использование другими организмами. Еще П.А. Костычев в 1885 году установил, что только грибы способны образовать продукты разложения растительных остатков, окрашенные в темный цвет; бактерии этой способностью не обладают. Темная окраска обусловлена накоплением меланиноподобных (черных) пигментов, которые входят в состав гумуса (Бабьева, Зенова, 1989). Грибы активно участвуют в превращениях соединений азота и способствуют улучшению структуры почвы, агрегируя почвенные частицы. В процессе жизнедеятельности грибы выделяют различные физиологически активные вещества — ферменты, органические кислоты, витамины, антибиотики, токсины, влияющие на развитие других микроорганизмов и высших растений.

Распространение грибов в почве и их высокая активность объясняются их большей по сравнению с другими микроорганизмами устойчивостью к изменяющимся условиям окружающей среды. Так, например, имея неодинаковый оптимум pH для развития, грибы хорошо переносят любые условия кислотности и поэтому встречаются и в кислых, и в щелочных почвах. Многие виды грибов развиваются в почвах, имеющих pH ниже 4, при котором жизнедеятельность большинства бактерий и актиномицетов не возможна. Многие грибы отличаются большой устойчивостью к высокой концентрации солей и условиям затрудненного водоснабжения. Однако грибы очень требовательны к условиям аэрации, поэтому богаче представлены в верхних горизонтах почвы.

Общий набор видов, выделяемых из почвы при посевах на среды Чапека, сусло-агар обычно составляет не менее 60-80 видов (Кураков, 2001). Он может быть увеличен за счет редких и случайных видов даже до нескольких сотен видов (Звягинцев и др., 1999). Специфический же комплекс видов микромицетов, по которому можно характеризовать тип почвы, содержит порядка 15-20 видов (Мирчинк, 1976; Звягинцев и др., 1999; Кураков, 2001). Существуют стенотопные виды грибов, развивающиеся в узких пределах экологических условий — индикаторы определенных процессов или свойств почв (Мирчинк, 1976). При многократном анализе инкубированного образца удастся выделить в 4-5 раз больше видов грибов, чем при однократном анализе (Полянская и др., 1990).

Необходимо отметить, что большинство исследований по биологии и экологии почвенных грибов, проводимых почвенными микробиологами, относятся к, так называемым микромицетам. В то же время имеются все основания полагать, что в почвах, особенно лесных, определяющая роль в минерализации таких стойких и широко распространенных полимеров как целлюлоза и особенно лигнин играют грибы-макромицеты — высшие базидиальные грибы (Кураков, 2001, Звягинцев и др., 1999). Кроме того, именно эти грибы образуют симбиоз с корнями сосудистых растений, большинство из которых (9/10) микосимбиотрофно (Звягинцев и др., 1999; Миркин, Наумова, Соломещ, 2001).

Чаще всего при посевах на традиционные среды из почв выделяются мицелиальные грибы, относящиеся к трем большим группам (классам): фикомицетам, аскомицетам (сумчатым) и несовершенным грибам. На плотных средах мицелиальные грибы образуют мягкие, не врастающие в субстрат, округлые или широко распространяющиеся по поверхности, пушистые, нитевидные, паутинообразные, ватоподобные или порошкообразные колонии. Вегетативный мицелий большинства видов не окрашен, пигментирован только спороносящий мицелий. Поэтому молодые колонии таких грибов — белые или сероватые. По мере развития органов плодоношения колонии приобретают зеленую, желтую, коричневую, красную, малиновую или черную окраску. У некоторых грибов пигмент диффундирует в среду.

Фикомицеты имеют несептированный, многоядерный, сильно разветвленный мицелий, образующий характерный войлочный налет на питательной среде. При образовании органов плодоношения, старении или в неблагоприятных условиях в мицелии может появляться некоторое количество перегородок. Размножаются фикомицеты либо бесполом путем при помощи эндоспор, образующихся в специальных клетках — спорангиях, либо половым путем в результате конъюгации двух половых клеток — гамет, морфологически различных (у оомицетов) или идентичных (у зиго-

мицетов). В почвах особенно распространены зигомицеты порядка *Mucorales*, у которых спорангии представляют собой как бы вздутия на концах гиф, называемых спорангиеносцами.

Наиболее часто из муковых в почвах встречаются виды родов *Mucor*, *Rhizopus*, *Actinomucor*, *Absidia* (рис. 14).

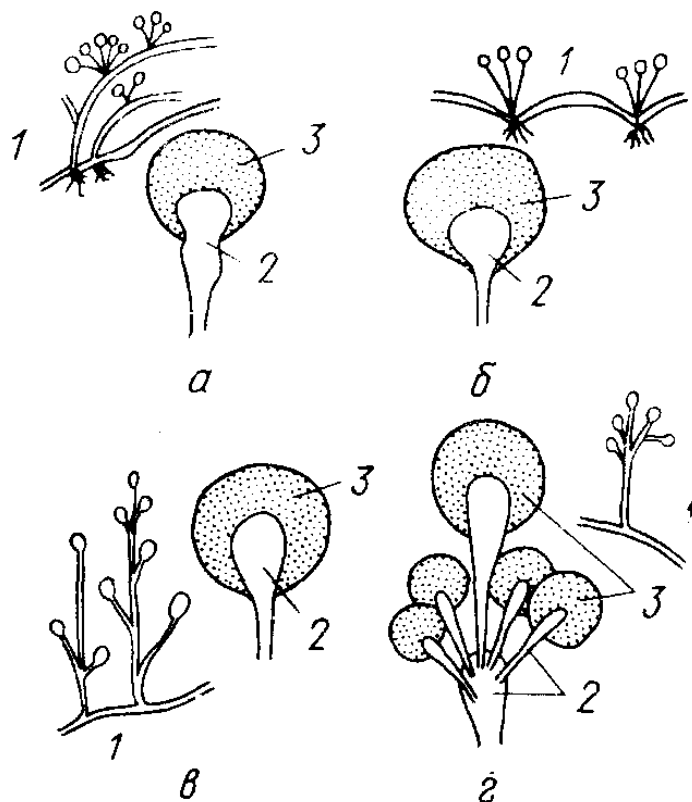


Рис. 14. Некоторые представители муковых грибов (зигомицеты):

а — *Absidia*, *б* — *Rhizopus*, *в* — *Mucor*, *г* — *Actinomucor*;

1 — плодоносящий мицелий, 2 — спорангиеносцы,

3 — спорангий со спорами

К аскомицетам относятся мицелиальные грибы с расчлененным мицелием и основная масса одноклеточных грибов — дрожжей. Аскомицеты, как и фикомицеты, размножаются бесполым и половым способами. Бесполое размножение мицелиальных аскомицетов осуществляется экзоспорами (конидиями), образующимися на конидиеносцах. Наиболее распространенным способом вегетативного размножения дрожжей является почкование (рис. 15, а), например видов родов *Saccharomyces* и *Lipomyces*. При этом у некоторых дрожжей последовательно возникающие клетки могут не отделяться друг от друга, образуя рудиментарный мицелий. Есть дрожжи, размножающиеся вегетативно только делением (рис. 15, б), на-

пример виды рода *Schizosaccharomyces*. У ряда дрожжей наблюдается так называемое почкующееся деление, которое имеет сходство с почкованием и делением (рис. 15, в). Половое размножение аскомицетов осуществляется аскоспорами, возникающими после слияния двух ядер в одной клетке — сумке (аске). Благодаря мейозу число аскоспор в аске обычно строго определено и кратно двум — чаще всего их восемь.

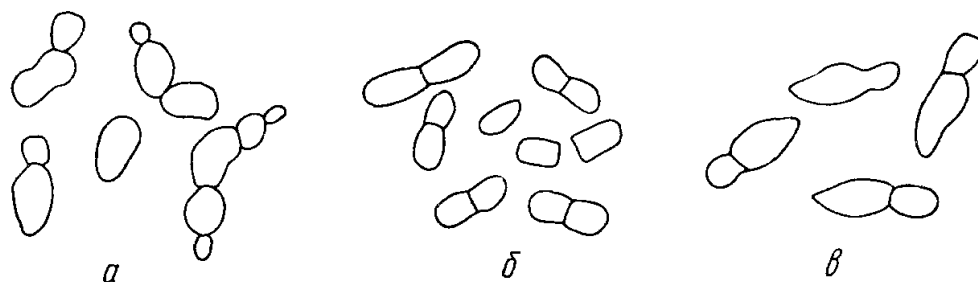


Рис. 15. Способы вегетативного размножения дрожжей:
а — почкование; б — деление; в — почкующееся деление

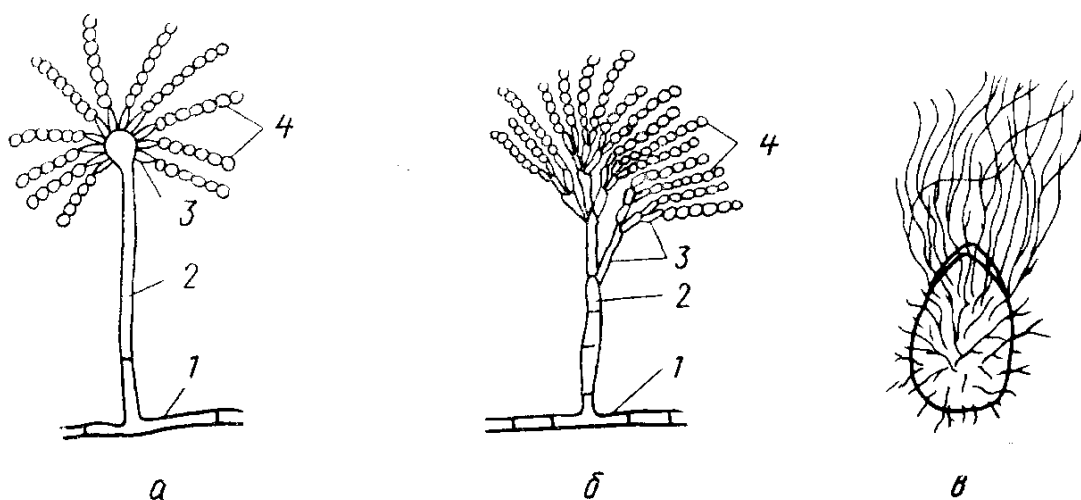


Рис. 16. Спороношение некоторых представителей мицелиальных аскомицетов: а — *Aspergillus*, б — *Penicillium*, в — перитеций *Chaetomium*; 1 — вегетативный мицелий, 2 — конидиофор, 3 — стеригмы, 4 — конидии.

Из мицелиальных аскомицетов в почвах чаще всего встречаются виды родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Chaetomium* (рис. 16). Представители рода *Penicillium* составляют обычно около половины всех грибов, выделяемых из почвы. Виды рода *Aspergillus* обильнее представлены в почвах

юга, виды *Chaetomium* широко распространены в различных почвах, но особенно их много в навозе и гниющих остатках. Конидиеносцы пенициллов двукратно кистевидно ветвятся. На концевых разветвлениях конидиеносцев — стеригмах—отшнуровываются конидии, образуя цепочки. Конидиеносцы аспергиллов на концах вздуты в форме головки. На ней развиваются выросты — стеригмы, отшнуровывающие на свободных концах цепочки конидий. Мицелий у видов *Penicillium* и *Aspergillus* не окрашен, а конидии имеют различную окраску: чаще всего серовато-зеленую или сине-зеленую. Встречаются виды с песочной, коричневой и черной окраской. Виды рода *Chaetomium* характеризуются тем, что сумки у них объединены в особые сплетения мицелия — плодовые тела. Последние имеют форму перитециев, обычно темноокрашенных, покрытых волосками и снабженных на вершине отверстием, нередко оттянутым в форме клювика.

К несовершенным грибам относятся мицелиальные грибы и дрожжи, половой процесс, у которых не выявлен. Они размножаются исключительно бесполым путем. Мицелиальные грибы имеют септированный мицелий. Конидии образуются на изолированных или расположенных группами конидиеносцах или в специальных структурах, названных пикпидами. Дрожжи размножаются почкованием и делением.

В класс несовершенных грибов входит наибольшее число видов мицелиальных грибов, обнаруживаемых в почве. Это представители родов *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Mycogone*, *Stachybotrys*, *Stemphylium*, *Verticillium*, *Oospora*, *Cephalosporium*, *Phoma*, *Botrytis* (рис. 17). Из них наиболее часто встречаются виды родов *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria* и *Fusarium*. Грибы рода *Trichoderma* имеют бесцветный мицелий, ветвящиеся конидиеносцы, на концах которых развиваются округлые головки зеленоватых спор, оклеенные слизью. Виды родов *Cladosporium* и *Alternaria* в отличие от многих других имеют темноокрашенный мицелий, у представителей рода *Cladosporium* мицелий и конидии окрашены в темно-оливковый цвет, конидиеносцы прямостоящие, слегка бугристые, на них развиваются быстро опадающие споры разнообразной формы: округлые, овальные или вытянутые, с одной или несколькими перегородками или без них. У *Alternaria* споры многоклеточные, булавовидные, с продольными и поперечными перегородками. У видов рода *Fusarium* конидиеносцы образуются на поверхности более или менее рыхлых подушечек. Конидии серповидно изогнуты, заострены с концов и имеют одну или чаще несколько перегородок.

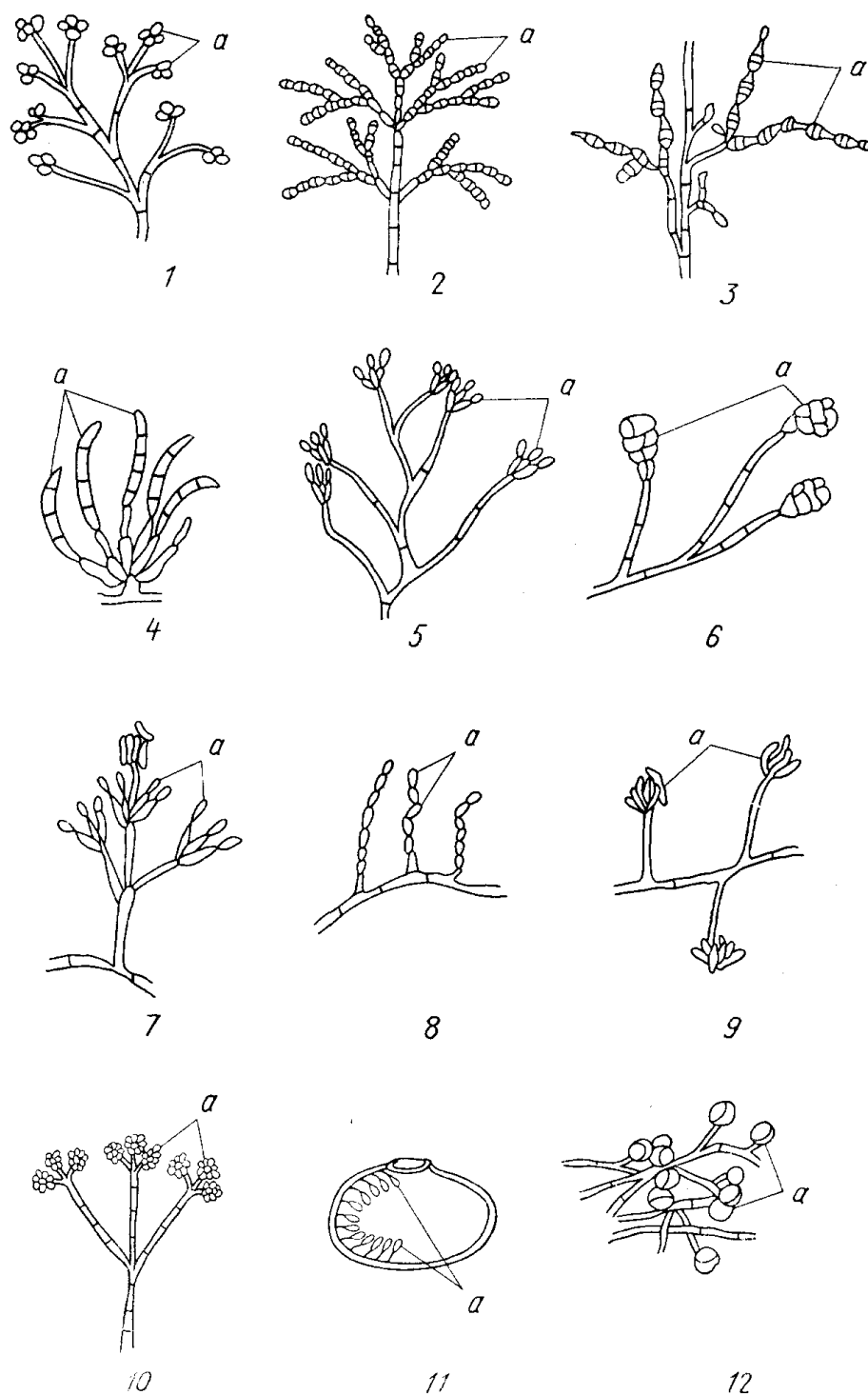


Рис. 17. Конидиеносцы и конидии представителей несовершенных грибов: 1 — *Trichoderma*, 2 — *Cladosporium*, 3 — *Alternaria*, 4 — *Fusarium*, 5 — *Stachybotris*, 6 — *Stemphylium*, 7 — *Verticillium*, 8 — *Oospora*, 9 — *Cephalosporium*, 10 — *Botrytis*, 11 — *Phoma* (пикнида с конидиями), 12 — *Mycogone*; а — конидии

Выделение микроскопических грибов различных эколого-трофических групп

При учете почвенных грибов ультразвуковая обработка оказывает явно отрицательное действие. Известно, что чем крупнее клетка, тем больше она повреждается ультразвуком. Крупные клетки грибов повреждаются ультразвуком сильнее, чем мелкие клетки бактерий.

Учет мицелиальных организмов — грибов и актиномицетов — на питательных средах имеет более условный характер по сравнению с учетом бактерий, так как здесь более неопределенной является величина и характер зародыша, давшего колонию. Это могут быть различные генеративные образования, фрагменты гиф, разнообразные мицелиальные структуры. Предварительная обработка дает возможность разбить гифы на куски примерно одинаковой величины, и хотя размер учитываемых зачатков продолжает различаться в несколько раз, он уже не различается в десятки раз, как это было до диспергирования почвы.

Для проведения посевов на агаровые питательные среды рекомендуется брать навеску почвы 10 г и использовать разведения 10^{-1} - 10^{-4} в зависимости от содержания грибов в почве. Последнее разведение в основном используется для лесных подстилок. Для большинства почв оптимальным является разведение в интервале 10^{-2} - 10^{-3} . Необходимо, чтобы на каждой чашке Петри выросло в среднем 15-30 колоний микроскопических грибов. Оптимальная температура инкубации большинства грибов 24-26 °С. В случае специального выделения психрофилов или термофилов температуру инкубации меняют в соответствии с оптимумами для этих групп грибов. При выделении микроскопических грибов из почвы подавление различных бактерий достигают установлением кислой реакции среды (рН 4,2-4,5). Для подкисления сред употребляют различные кислоты. В среднем на 1 л агаризованной среды добавляют 15-20 мл 0,1 н. раствора серной или соляной кислоты. Молочную кислоту обычно применяют концентрированную в количестве 4 мл на 1 л среды (лимонную в виде 50 % раствора — 10 мл на 1 л среды). Прибавление кислот к агаровым средам (до рН 4,0) не оказывает отрицательного влияния на их способность к переходу в твердое состояние при остывании. Концентрированные кислоты стерилизовать не надо, 0,1 н. растворы серной и соляной кислот следует стерилизовать отдельно. Наиболее часто при проведении посевов из почвы используют молочную или лимонную кислоты.

При необходимости выделить грибы, которые не могут развиваться на кислых средах, и изучении состава грибов в почвах с нейтральной и щелочной реакцией среды в качестве ингибиторов бактерий применяют роданистый натрий — 0,25-0,4 моль/л, краситель бенгальский розовый — 70 мг/л, антибиотики: стрептомицин-сульфат — 40-50 мг/л, тетрациклин,

окситетрациклин, хлортетрациклин — 2-5 мг/л, пенициллин, неомицин, полимиксин, бацитрацин — 50 мг/л среды (Литвинов, 1967). Добавление кислот и других ингибиторов бактерий производится асептически в стерильные, охлажденные до 40-45° С питательные агаровые среды.

Засеянные суспензией чашки Петри периодически просматривают, обычно начиная с 3 суток, и отдельные колонии грибов, в случае угрозы зарастания агара мицелием быстрорастущих микромицетов отсеивают в пробирки на агаризованную питательную среду. Окончательный учет производится в зависимости от среды выделения: на сусло-агаре и синтетических средах с простыми углеводами на 6-10-й день, на средах с целлюлозой, КМЦ, лигнином через 2-3 недели, на голодном и почвенном агаре через 3-4 недели.

Полученные методом посева данные о численности грибных зачатков (диаспор) позволяют составить относительное представление о степени заселенности исследуемой почвы микроскопическими грибами и содержании в ней отдельных видов.

Состав комплекса почвенных грибов-микромицетов зависит от формы поступающего в почву субстрата, ее гетерогенности, физико-химических условий, конкурентоспособности и ростовых характеристик организмов. Известно, что грибы в почве представлены разнообразными по систематическому положению и пищевым потребностям формами. Поэтому для выделения их и всех других групп микроорганизмов не может быть одной универсальной среды. Сапротрофные почвенные микромицеты по способности усваивать те или иные субстраты объединяются в различные пищевые группы: сахаролитические грибы; грибы, разлагающие целлюлозу, лигнин, кератин, хитин и т.д.

Не отрицая наличие существенных физиологических различий среди сапротрофных микромицетов, известно, что деление на специфические трофические группы грибов во многом условно (Звягинцев, 1987; Методы..., 1991). Известно, что вообще нет микроорганизмов, которые не содержали бы гидролаз. Поэтому наряду с использованием сахаров и других мономерных органических соединений так называемые “сахарные” грибы могут потреблять и полимеры, особенно крахмал, белки и т. д. В то же время микроорганизмы, которые обладают специфическими гидролазами, вполне могут использовать ряд мономеров (Звягинцев, 1987).

Грибы, которые не выдерживают конкуренции за моносахара при высоких их концентрациях в среде, выделяют на “голодные” среды — водный агар, агар с почвенной вытяжкой, агар с разведенным в 8-10 раз суслом. На этих средах большинство микромицетов развивается медленно, образует мелкие (2-3 мм в диаметре) колонии, хорошо отделенные друг от друга, что благоприятствует выделению грибов в чистые культуры.

Для выделения фитопатогенных грибов из почвы используют среды, селективность которых задается введением антигрибных антибиотиков. Наиболее часто применяют полиеновые антибиотики (эндомицин, нистатин, пимарицин) и циклогексимид, обладающие широким фунгицидным действием, но вместе с тем не подавляющие рост и развитие отдельных видов фитопатогенных микромицетов. Широко используются для этих целей и такие химические соединения, как красители (бенгальский розовый, кристалл- и генцианвиолет, малахитовый зеленый), спирты, хлораты, фенолы, коммерческие фунгициды (каптан, пентахлорнитробензол, ботран и другие). Бенгальский розовый применяют для ограничения роста быстрорастущих форм микромицетов, фундазол — для подавления грибов *Penicillium*.

Для выделения микроскопических грибов из почвы с целью последующей характеристики структуры комплекса сапротрофных микромицетов наиболее часто используют подкисленные молочной кислотой (4 мл/л) синтетические среды с простыми углеводами, например среду Чапека, сусло-агар, среда Сабуро и др. Применение среды Чапека существенно упрощает анализ посева, так как культурально-морфологические признаки грибов на ней близки тем, которые имеют микромицеты на среде Чапека-Докса, используемой для идентификации многих видов грибов. Поэтому выделение микромицетов для видового определения можно проводить из одной или группы одинаковых колоний, а не из почти всех подряд, как при посевах на ряд других сред. Выделение штаммов почвенных грибов для видовой идентификации осуществляют на среды Чапека-Докса, сусло-агар или другие в соответствии с систематической принадлежностью организма. Каждый штамм нумеруют, записывают в лабораторный журнал принадлежность его к определенному образцу и варианту опыта, что необходимо для дальнейшей обработки данных.

Указывают, какие колонии встречаются наиболее часто. Каждую из описанных колоний рассматривают в микроскоп с объективом 8× непосредственно на чашке Петри. Кроме того, готовят препараты «раздавленная капля». На предметном стекле смешивают каплю воды и уксусной кислоты или этиловый спирт 1:1. Их добавляют потому, что конидии грибов плохо смачиваются водой. Препаровальной иглой захватывают участок колонии без агара, помещают его в каплю, осторожно расправляют мицелий, закрывают покровным стеклом и просматривают препарат, используя объективы 8× и 40×.

Для приготовления микроскопических препаратов грибов используют специальную жидкость следующего состава: карболовая кислота кристаллическая (фенол) — 20 г, глицерин — 40 мл, дистиллированная вода — 20 мл. Для прижизненной окраски грибов используют различные красите-

ли в концентрации 1:500, 1:1000, 1:10000: генциан фиолетовый, метиленовый синий, сафранин, нейтральный красный, метиленовый фиолетовый, эритрозин. При микроскопировании колоний и препаратов обращают внимание на расчлененность мицелия, строение спорангиев и конидиеносцев, форму спор; определяют диаметр мицелия.

Идентификация микромицетов

Почвенные грибы, которые можно выделить методами, описанными в предыдущем разделе, относятся к следующим таксономическим группам:

Класс: Oomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes

Порядок: Peronosporales, Mucorales, Eurotiales, Sphaeriales Hyphomycetales, Spharopsidales Melanconiales

Идентификация микроскопических грибов основывается преимущественно на морфологических признаках, главным образом на строении и способах развития репродуктивных структур как наиболее таксономически значимых.

Принадлежность к классу и роду устанавливают по Атласу родов почвенных грибов. Определение класса производят по характерным чертам строения и способам образования в первую очередь половых структур, но также в некоторых случаях используют характеристику бесполой спороношений и строения мицелия, например, для дифференциации классов Chytridiomycetes и Oomycetes. Для выделения порядков и семейств внутри классов также используют некоторые детали строения половых и бесполой спороношений, строение и степень развития мицелия (зачаточный ризомицелий, хорошо развитый несептированный или септированный). Для дифференциации родов внутри семейств служат разнообразные морфологические признаки. Большое значение для дифференциации родов в классе Deuteromycetes имеет тип конидиогенеза. В качестве видовых дифференцирующих признаков помимо морфологических с применением электронной микроскопии используются культуральные признаки, особенно для родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Часто для дифференциации не только видов, но и групп видов (например, групп видов *Rhizopus*), важно точное измерение скорости роста культуры при разных температурах.

Чтобы приступить к определению, нужно предварительно высеять культуру, подлежащую определению, на плотную питательную среду, наиболее благоприятную для образования репродуктивных структур в чашки Петри. Посев проводят нанесением небольшого количества посевного материала (спор или мицелия) специальной иглой в виде крючка на питательную среду. Чашку при этом держат средой вниз и посев проводят прикосновением иглы к поверхности среды с посевным материалом снизу

в трех местах — так, чтобы образовались три четко обособленные друг от друга колонии. Быстрорастущие грибы (например, мукоровые) можно сеять одной колонией в центре чашки.

Поверхность колонии (шероховатая или гладкая). Характер строения конидиеносца служит основанием для выделения секций, которых в настоящее время насчитывается 10. Диагностирующим признаком для видов является наличие или отсутствие колонки, образованной из цепочек конидий, отходящих от фиалид (развиваются цепочки строго параллельно или расходятся и переплетаются), связь конидиеносца с субстратом (прикреплен конидиеносец к субстратному или воздушному мицелию), форма конидий (округлая, цилиндрическая, эллиптическая), поверхность (гладкая, шероховатая, шиповатая), размеры.

Для рода *Aspergillus* помимо ветвления отмечают цвет конидиеносца, так как он может быть бесцветным или окрашенным, форма головки вместе с цепочками конидий (сферическая, с радиально расходящимися цепочками конидий, или булавовидная), форма вздутия на вершине конидиеносца (округлая, овальная булавовидная).

Культуральные признаки наибольшее значение имеют для родов *Penicillium* и *Aspergillus*, поэтому описание культуральных признаков дается для этих родов. Отмечают скорость роста колонии, желательны при трех температурах: +5, +25, +37°C; внешний вид колонии, ее текстуру (бархатистая, пушистая, шерстистая, шероховатая). Бархатистость колонии определяется плотнорастущими спороношениями, отходящими непосредственно от субстратного мицелия, пушистость — обильно развитым воздушным мицелием, на котором могут образовываться спороношения, шерстистость — за счет большого количества тяжей, шероховатая гранулированная поверхность возникает в результате обильного образования коремий, т.е. структур, представляющих собой плотное объединение нескольких конидиеносцев в пучки. Отмечают форму и цвет края колонии. Описывают окраску спороносящей части и стерильного мицелия, изменения окраски во времени (сохраняется ли первоначальная окраска или она меняется). Отдельно отмечают окраску обратной стороны колонии и диффузию пигмента в агар, определяющую окраску окружающего агара. Отмечают зональность колонии, появление зональности по мере роста, складчатость, наличие экссудата, его цвет, запах культуры. Фиксируют наличие или отсутствие склероциев — жестких структур, образованных плотным переплетением мицелия, по внешнему виду напоминающих плодовые тела — клейстотеции, но не образующих сумок, остающихся стерильными. Описывают их форму, текстуру, цвет, размеры.

Дифференцирующими признаками для семейств класса дейтеромицетов служат способ агрегации конидиеносцев (свободные, в коремиях,

спородохиях). Для дифференциации родов или групп родов — тип конидиогенеза и строение конидий. Для видовой дифференциации используют форму и размеры конидий и некоторые культуральные признаки.

В пределах рода *Penicillium* выделяют еще секции или подро́дыг по строению конидиеносца и подсекции по морфологии конидиеносца и поверхности колонии. В роде *Aspergillus* выделяют две секции по наличию или отсутствию профиалид. Далее используют определители (Кириленко, 1973, 1977, 1978; Литвинова, 1967, 1969; Пидопличко, 1972; Buinet, 1970; Ellis, 1971, 1978; Raper, Fennell, 1965).

5.4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ

Численность дрожжей в почве обычно ниже, чем бактерий, актиномицетов и мицелиальных грибов. Дрожжи обнаруживаются в почвах с высоким содержанием свежих растительных остатков, умеренным водно-температурным режимом и низким значением pH. Чаше других в почвах встречаются представители рода *Lipomyces* (аскомицеты), а также виды *Torulopsis*, *Cryptococcus* и *Candida*, у которых спорообразование не известно. На плотных питательных средах дрожжи растут в виде четко оформленных, округлых или лопастных, выпуклых, гладких или складчатых, бесцветных, беловатых, желтовато-оранжевых или ярко-розовых колоний, заметно отличающихся от колоний мицелиальных грибов. Клетки разных видов дрожжей по форме довольно разнообразны. Они бывают округлыми, овальными, удлинёнными, лимоновидными, треугольными, серповидными. Диаметр округлых форм колеблется в среднем от 4 до 12 мкм.

Методы количественной оценки содержания дрожжей в почве отличаются от общепринятых в почвенной микологии приемов учета мицелиальных грибов. Благодаря своей одноклеточной природе дрожжи могут быть, как и другие одноклеточные микроорганизмы, учтены по числу вырастающих на плотных средах колоний при посеве из суспензии с последующим пересчетом числа клеток и их биомассы на грамм исходного субстрата. Исследование дрожжей проводят из отобранных в течение ближайших 1-2 суток образцов с их сохранением при комнатной температуре в стерильных емкостях (пакетах, пробирках, флаконах).

Длительная вынужденная задержка анализа предполагает временную консервацию проб с целью сохранения естественной численности дрожжей и соотношения популяций разных видов. Такая консервация может быть достигнута разными способами: высушиванием, быстрым замораживанием, снижением температуры хранения и др. Экспериментально было показано, что высушивание образцов почв приводит к значительному снижению как общей численности дрожжей, так и изменению пропорции

отдельных популяций. Особенно чувствительны к высушиванию дрожжи, обитающие в постоянно влажных почвах — луговых, болотных. Сильно снижается при подсушивании почв уровень плотности популяции липомицетов, что связано, не только с гибелью части вегетативных клеток, но и с повышением прочности их связи с почвой. Адсорбция, обусловленная в данном случае наличием полисахаридных капсул, повышается в процессе дегидратации.

Хранение образцов почв при низкой положительной температуре приводит к увеличению численности дрожжей, которая за 2,5 месяца возрастает в 4,5-5 раз, главным образом за счет развития популяций психрофильных и психротрофных видов. Наилучшим способом консервации следует считать быстрое замораживание проб в сухом льду, что позволяет сохранять неизменным их микробный состав в течение месяца после сбора.

В почве можно обнаружить дрожжи разных таксономических и экологических групп: 1 — собственно почвенные, или автохтонные, постоянное местообитание которых не выходит за пределы почвы; 2 — зимогенные, ассоциированные с органическими остатками; 3 — случайные, или аллохтонные, попадающие в почву спорадически из других местообитаний, непосредственно с почвой не связанных.

При учете дрожжей методом посева из почвенной суспензии используют низкие разведения — от 1 : 5 до 1 : 50 для образцов из минеральных горизонтов почв и от 1 : 100 до 1 : 1000 — для лесной подстилки, торфа или дерна.

Лучшей естественной средой для учета дрожжей служит сусло-агар 6-7° Баллинга, подкисленный молочной кислотой (4 мл/л). Сусло, хотя и является полноценной питательной средой для дрожжей, так как содержит хорошо утилизируемые источники углерода и азота, аминокислоты и витамины, все же обладает и некоторыми нежелательными качествами. Во-первых, это не стандартная среда, и разные партии сусла могут отличаться по составу. Во-вторых, основным источником углерода в сусле служит мальтоза, которую некоторые дрожжи не используют, а у других может происходить адаптация к этому сахару.

Для учета дрожжей в почве применяют и синтетические среды:

Глюкозо-пептонный агар (г/л): глюкоза — 40; пептон — 10; агар — 20; подкислить раствором HCl после стерилизации до pH — 4,5.

Глюкозо-минеральная среда (г/л): глюкоза — 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5,0; KNaPO_4 — 0,85; K_2HPO_4 — 0,15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; NaCl — 0,1; агар — 20; подкислить после стерилизации до pH 4,5.

Для повышения селективности синтетических сред помимо их подкисления применяют антибиотики широкого спектра действия против бактерий и грибов. Антибиотики применяют как порознь, так и в комплексах.

В смеси применяют антибиотики стрептомицин-сульфат (20 мг/л) с левомицетином (20 мг/л) и хлортетрациклином солянокислым (100 мг/л). Рост грибов подавляется актидионом, однако, к этому антибиотику чувствительны и многие дрожжи. Поэтому для подавления роста грибов используют другие ингибиторы, например дифенил (0,005—0,01 %), красители подкислить бенгальский розовый (0,003 %), кристаллический фиолетовый (0,001 %), бромкрезол-пурпуровый (0,002 %). Эффективным ингибитором роста микромицетов служит пропионат натрия в концентрации 0,15—0,25%. Однако, при такой концентрации подавляется рост и некоторых дрожжей, особенно представителей рода *Rhizotorula*. Поэтому при анализе материалов, где может быть много красных дрожжей, например подстилок, торфа или дерна, этот ингибитор применять не рекомендуется.

Олигонитрофильные дрожжи, относящиеся главным образом к роду *Lipomyces*, учитывают на среде Эшби или других безазотистых средах, которые предложены для выделения из почв азотобактера и бактерий-олигонитрофилов.

Посевы выращивают при комнатной температуре. Низкие температуры задерживают рост микромицетов, и дрожжи легче выявляются, хотя сроки учета при этом значительно удлиняются. Подсчет колоний проводят по мере их появления, обычно через 7-10 сут. Учет лучше вести подробно, т. е. подсчитать и отметить с нижней стороны чашки все появившиеся в первый срок просмотра колонии, а затем оставить чашки еще на несколько дней для подраживания медленно развивающихся колоний.

При расчете численности и биомассы липомицетов нужно учитывать следующее. Использование метода посева из суспензии почвы дает заниженные на два порядка числа, а подсчет процента обросших комочков почвы соответствует приблизительно таким показателям:

степень заселенности почвы	% обрастания на 15-е сут.	уровень плотности популяции
низкая	<25	10^2
средняя	20—50	10^3
высокая	50—75	10^4
очень высокая	75—100	10^5 и больше

Для расчета биомассы используется показатель удельной плотности клеток липомицетов, который имеет наименьшую величину ($d=1,06$) из всех дрожжей.

5.4.5. ПОЧВЕННЫЕ ВОДОРΟΣЛИ

Размеры образуемой водорослями биомассы различны в зависимости от растительности и типа почвы, достигая сотен килограммов сырой массы на гектар. Однако показатели биомассы водорослей не дают полного представления о роли их в качестве продуцентов. Известна высокая «оборачиваемость» микробной биомассы в почве. Продукция почвенных водорослей в несколько раз превышает их биомассу. Этим водоросли отличаются от остальных продуцентов наземных биогеоценозов.

В составе почвенной биоты всегда содержатся водоросли. Существование водорослей в почве столь же обычно, как и обитание их в водоемах. Однако методы изучения почвенных водорослей существенно отличаются от методов изучения большинства групп почвенного населения. Водоросли можно определить как низшие (преимущественно микроскопические) растения, способные к фотосинтезу. Фототрофное питание водорослей определяет единообразие их физиологических свойств и разнообразие морфологии, включая строение тела и способы размножения. Ныне живущие водоросли не являются монолитной группой организмов, объединенных единством строения и происхождения. Водоросли представляют собой совокупность нескольких обособленных отделов растений, самостоятельных по своему происхождению и эволюции.

Под термином «почвенные водоросли» обычно понимают совокупность нескольких экологических группировок водорослей, включающую наземные водоросли, которые лишь при благоприятных условиях разрастаются в массовых количествах на поверхности почвы, водно-наземные, разрастающиеся на поверхности постоянно влажной почвы, и собственно почвенные водоросли, населяющие толщу почвенного слоя. Согласно классификации ценозов водорослей (Голлербах, Штина, 1969) понятие почвенные водоросли совпадает с понятием эдафические ценозы.

По данным Э.А. Штины в почвах бывшего СССР обнаружено более 1500 видов, включающих значительное число внутривидовых таксонов. Большая часть их относится к четырем отделам. На долю зеленых водорослей приходится 624 вида, сине-зеленых — 429, диатомовых — 255, желто-зеленых — 189. Кроме того, найдено 19 видов эвгленовых, 5 пиррофитовых, 5 золотистых и один вид красных водорослей. Несмотря на кажущееся разнообразие диатомовых водорослей, в каждой почвенной пробе их встречается немного. Обычно преобладают по числу видов зеленые, сине-зеленые и желто-зеленые водоросли.

Отделы водорослей различаются как по морфологическим признакам (организация клетки, структура тела), так и по биохимическим (состав пигментов и продуктов ассимиляции, состав и строение клеточной оболочки).

Тело водорослей представлено талломом, или слоевищем. Талломы характеризуются большим разнообразием. Выделяются различные типы морфологической структуры талломов, повторяющиеся в разных отделах водорослей.

Методы изучения видового состава почвенных водорослей

При отборе почвенных образцов для исследования состава альгофлоры необходимо выполнять общие правила микробиологических анализов почвы: правильно отбирать среднюю пробу, соблюдать стерильность, правила этикетирования и хранения образцов, проводить сопутствующие анализы почвы и растительного покрова. В случае присутствия поверхностных разрастаний водорослей в виде общего позеленения почвы, зеленых, сине-зеленых или коричневых налетов, пленок и корочек, собирают поверхностный слой почвы с водорослями на участке, размеры которого могут быть различными в зависимости от однородности и компактности водорослевого налета — от 1 дм² до 1 м².

Для выявления водорослей в толще целинной почвы берут индивидуальные пробы весом 20-50 г, приуроченные к определенным растительным ассоциациям и определенному почвенному горизонту.

В окультуренных почвах берут смешанный образец весом 20-50 г, составленный из 5-10 исходных. Образцы почв отбирают в конверты из плотной бумаги. Образцы исследуют в свежем виде или хранят в воздушно-сухом состоянии для последующего культивирования.

Культуральные методы исследования состава почвенных водорослей. При выявлении видового состава водорослей используются разные варианты культурального метода. При постановке культур почвенных водорослей применяют общепринятые приемы микробиологической техники, касающиеся стерильности посуды, питательных сред, воды и инструментов. Инкубацию культур проводят обязательно на свету.

Наиболее простым методом для выявления состава почвенной альгофлоры является метод «стекла обрастания». Исследуемую почву, до возможности в ненарушенном состоянии, помещают в стерильные чашки Петри и в увлажненном состоянии выдерживают на свету. Для увлажнения применяют дистиллированную воду или минеральную среду.

На поверхность почвы (одновременно с постановкой культуры или на следующий день) раскладывают стерильные покровные стекла в количестве 4-8 на чашку. Поверхность почвы в чашке должна быть в мелких неровностях, ее не следует уплотнять и заглаживать. Между стеклами и почвой должны оставаться небольшие свободные пространства — «влажные камеры». Почву периодически увлажняют до 80% от полной влагоемкости. На нижней поверхности «стекла обрастания» начинается развитие во-

дорослей, преобладающих в данной почве. Обычно уже через 4-5 дней можно начинать просмотр стекол под микроскопом. Для этого покровное стекло снимают с поверхности почвы пинцетом и, удалив с него крупные частички почвы, кладут на предметное стекло в каплю воды. Целесообразно просматривать не все стекла одновременно, а последовательно, с промежутками в 3-5 дней. Для полного выявления видового состава водорослей в почве достаточно 3-6 недель инкубации. К этому сроку стекла так интенсивно зарастают водорослями, что поселение каких-либо новых видов оказывается невозможным.

На стеклах обрастания быстро размножаются диатомеи, и стекла можно без дополнительных процедур использовать для приготовления постоянных препаратов.

Для приготовления водных культур используют питательные среды, содержащие все необходимые для роста водорослей элементы.

Для посева обычно берут 1-2 г почвы. Желательно применять принцип средней пробы из каждого данного образца и 2-3-кратную повторность культур. Можно засеивать воздушно-сухую почву.

Развитие водорослей в водных культурах обычно становится заметным после 2-3 недель инкубации на свету. Наблюдается последовательность появления и исчезновения видов в культурах, что определяет необходимость многократного просмотра водорослей по мере их развития, начиная с трех недель и кончая 3-4 мес.

Для приготовления препаратов при изучении водорослей берут на предметное стекло пробы налетов и пленок со дна и стенок колб, о поверхности и из толщи раствора, соблюдая обычные приемы стерильности.

Агаровые культуры. Питательные среды с 1,5-2% агара применяются как для поддержания чистых культур, так и для выделения водорослей из почвы. На агаре хорошо разрастаются диатомовые, зеленые и сине-зеленые водоросли, в том числе спорообразующие формы, медленно растущие на стеклах. Поскольку вокруг каждой мелкой почвенной частицы вырастает немного видов водорослей, а иногда только один вид, то с агаровых культур легко выделить альгологически чистые культуры. Инкубация всех культур проводится на свету. Чаще всего для инкубации служат различной конструкции люминостаты.

Разные виды культур имеют свои достоинства и недостатки. Так, водные культуры, хорошо выявляя общий состав обитающих в почве водорослей, могут дать неправильное представление о количественных соотношениях между видами и о доминирующих формах. Коррективы в эти представления вносят почвенные культуры со «стеклами обрастания», выявляющие, в первую очередь, массовые и жизнедеятельные формы, или прямые наблюдения свежевзятой почвы. Необходимо учитывать, что во

всех описанных культурах, особенно в почвенных, наряду с водорослями, хорошо развиваются протонема мхов, а иногда и заростки папоротников из спор, находящихся в почве.

Идентификация почвенных водорослей. Для идентификации почвенных водорослей нет специального определителя, и приходится пользоваться многотомными определителями пресноводных водорослей («Определитель пресноводных водорослей СССР» и «Візначник пресноводних водорослей УССР»). Не исключено, что при выделении из почвы могут встретиться водоросли, не описанные в таблицах. Вначале дается идентификация отделов, затем родов, по отделам. Для зеленых водорослей, наиболее разнообразных в почве, дано также и разделение по порядкам. В разных отделах водорослей основные систематические признаки различны. Так, для сине-зеленых основным критерием является строение тела — размеры, наличие влагиалиц (чехлов), у нитчатых форм — ветвление и т.п. Определение диатомовых ведется по пустым панцирям, для рассмотрения которых покровное стекло с водорослями прокаливается и препарат заполняется особой средой (или канадским бальзамом). При определении зеленых и желто-зеленых водорослей большое значение имеют способы размножения, в частности образование подвижных зооспор или неподвижных автоспор. Обычно размножение интенсивно происходит в водных культурах. Выяснение способов размножения требует наблюдательности, чтобы в накопительных культурах не спутать зооспоры и автоспоры с клетками водоросли. Многие водоросли размножаются с наступлением темноты, поэтому существуют приемы затемнения культур перед просмотром. Нередко идентификация до рода возможна только после выделения водоросли в альгологически чистую культуру.

Количественные методы изучения почвенных водорослей

Количество почвенных водорослей подвержено резким колебаниям и за короткий промежуток времени изменяется в значительных пределах, поэтому для установления количественных характеристик водорослевых группировок необходимы многократные учеты.

Отбор почвенных образцов производят обычно с глубины 0-10 см, поскольку водоросли населяют преимущественно самый верхний слой почвы.

Для определения массы микроскопических водорослей в поверхностных разрастаниях берут пробы с единицы площади и глубиной 0,5-1 см и в дальнейшем рассчитывают данные не на вес, а на площадь почвы.

При подготовке к количественному анализу необходимо добиться относительно равномерного, распределения клеток в объеме почвенного об-

разца. Навески в 1 г помещают в пробирки или пенициллиновые склянки. Определяют влажность почвы. Повторность проб от 3 до 5.

Для очень влажных и медленно высыхающих образцов подбирают способы усреднения без высушивания (например, образцы тундровой почвы тщательно размешивают в воде), чтобы избежать гибели клеток водорослей.

Ф.Х. Хазиев и Р.Р. Кабиров предлагают проводить гомогенизацию образцов без предварительного высушивания путем приготовления суспензии из расчета 1 г почвы на 4-5 частей воды.

Счет водорослей проводят с помощью микроскопа, используя свежую почву (допустимо хранение в холодильнике при 5° увлажненной почвы в течение нескольких суток). Если немедленная обработка невозможна, образец почвы для счета водорослей можно сохранить в течение длительного времени. Для этого пробы для счета водорослей помещают в пробирки или невысокие пузырьки и фиксируют 4%-ным формалином (объем 4-5 мл). Если за единицу почвы принимают 1 г, то навеску из средней пробы берут немедленно после доведения почвы до воздушно-сухого состояния, так как при длительном ее высушивании клетки водорослей деформируются и трудно выявляются при микроскопировании. Если за единицу принимается 1 см³, то этот объем почвы, взятый из средней пробы, заливают формалином без предварительного высушивания. Можно фиксировать 1 г невысушенной почвы, но в этом случае надо определить ее полевую влажность для последующего пересчета. В этикетке, вложенной в склянку, должно быть точно указано место и глубина взятия пробы, ее размер, дата.

Прямые методы количественного учета почвенных водорослей. Навеску почвы растирают в склянке, с добавлением небольшого количества воды (если счет ведется в свежевзятой почве) или в том объеме формалина, в котором была зафиксирована почва. Для растирания используют пестик, изготовленный из препаровальной иглы с резиновым наконечником, вырезанным пробочным сверлом. Затем добавляют воду, доводя объем суспензии до 4 мл, и тщательно взбалтывают в течение 2 мин. После полуминутного отстаивания взвесь над осадком сливают в центрифужную пробирку. К осадку добавляют 3 мл воды, взбалтывают 1 мин, отстаивают 30 сек. и взвесь сливают в ту же центрифужную пробирку. Процедуру повторяют еще раз. После этого осадок отбрасывают.

В зависимости от механического состава почвы и особенностей распределения в ней водорослей время растирания, взбалтывания и отстаивания можно менять, добиваясь, чтобы осадок не содержал водорослей.

Суспензию, слитую в центрифужную пробирку, разливают по нескольким пробиркам и центрифугируют 1 мин 500 об./мин. Осадок дово-

дят до объема 10 или 20 мл, иногда до 40 мл в зависимости от густоты суспензии.

Каплю суспензии после тщательного перемешивания в пробирке (не менее 1 мин) помещают на предметное стекло. Для отбора капли используют мерные пипетки со слегка подточенным носиком. Следует нанести на предметное стекло одну из первых капель, пока не нарушена гомогенность суспензии.

Нанося каплю суспензии, подсчитывают число капель в одном мл и определяют таким образом ее объем. Для замедления подсыхания препарата в каплю суспензии можно добавить каплю глицерина, перемешивая смесь краем покровного стекла и добиваясь равномерного распределения водорослей в препарате. Каплю закрывают покровным стеклом. Препарат готов для микроскопирования.

Приготовленный к счету препарат просматривают: при люминесцентном освещении, если почва свежая, или при обычном освещении микроскопа, если почва фиксирована формалином. Можно считать водоросли не во всей капле, а только в части ее, просматривая, например, каждую вторую или каждую пятую полосу, равную по ширине диаметру поля зрения. Число просчитываемых полос устанавливается эмпирически в зависимости от разведения суспензии и количества водорослей в ней. Отмечают число встреченных в препарате водорослей, отдельно по систематическим группам: сине-зеленые (цианобактерии), зеленые и желто-зеленые (вместе), диатомовые. При наличии многоклеточных форм указывают число особей и число клеток. Можно сразу измерять обнаруженные клетки и нити для последующего определения их объема и расчета биомассы. Для этого используют окуляр-микрометр. Цену линейки определяют с помощью объект-микрометра.

Люминесцентный метод учета клеток водорослей. При просмотре почвенной суспензии под люминесцентным микроскопом водорослевые клетки выявляются за счет красного (на черном поле) свечения, обусловленного естественной флуоресценцией хлорофилла. Используются люминесцентные микроскопы. Наблюдения проводят в отраженном свете при максимально открытых полевой и апертурной диафрагмах. Для возбуждения флуоресценции используют свет с максимумом 365 нм. Разграничение водорослей по группам достигается просмотром препарата под микроскопом при переключении света люминесценции на проходящий свет. Используя люминесцентный микроскоп, можно упростить процедуру подготовки почвенной пробы к счету, в частности, исключить процедуры отмучивания и центрифугирования.

Предложен другой метод приготовления препаратов для люминесцентной микроскопии (Кожевин, 1989). Почвенную суспензию (1:10) об-

рабатывают на ультразвуковом диспергаторе (2 кГц, 44 А, 2 мин), наносят на тщательно обезжиренное предметное стекло (0,01 мл на препарат) и равномерно распределяют по площади 4 см² (квадрат 2х2 см). При данной площади на каждом стекле можно приготовить 3 препарата. Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре, фиксируют их легким нагреванием и микроскопируют. Число водорослей в 1 г почвы рассчитывают по формуле

$$N=(a \cdot n \cdot S)/p$$

где а — среднее число клеток в поле зрения; р — площадь поля зрения (мкм²); n — показатель разведения; S — площадь мазка.

В данном случае площадь мазка 4 см². Тогда формула имеет вид

$$N=(a \cdot 40)/p$$

При отсутствии люминесцентного микроскопа можно использовать люминесцентные приставки. Хорошее свечение клеток наблюдается при использовании светофильтров СФ-1, теплозащитного СЗЗ-7, запирающего КС-18. Нельзя использовать для счета в люминесцентном микроскопе пробы, зафиксированные формалином, так как формалин «гасит» естественную флуоресценцию клеток водорослей.

Культуральные методы учета водорослей. Несмотря на простоту прямых методов количественного учета, до сих пор применяются и культуральные методы, основанные на последовательном разбавлении почвенной суспензии и засева ее в питательные среды. Культуральные методы имеют ряд недостатков, обусловленных неодинаковой скоростью роста разных видов, трудностью подбора сред, одинаково подходящих для всех групп водорослей, неравномерностью распределения водорослей в суспензии.

5.5. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАССЫ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВЕ

5.5.1. РЕГИДРАТАЦИОННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАССЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Регидратационный метод основан на биоцидной обработке простым высушиванием почвы при умеренно высокой температуре (65-70°, 24 ч.). В ходе высушивания нарушается барьер проницаемости клеток вследствие денатурации цитоплазматических мембран, при этом мертвое органическое вещество не разрушается. Последующая регидратация (встряхивание высушенной почвы с водой или разбавленным солевым раствором) приводит к высвобождению внутриклеточного содержимого микроорганизмов в

жидкую фазу. Биомассу микроорганизмов определяют по приросту содержания водорастворимых соединений в высушенной почве по сравнению с контрольной свежей почвой. Концентрацию органических веществ измеряют методом бихроматного окисления. Недостатком регидратационного метода является его трудоемкость, особенно при определении пересчетного коэффициента в каждом анализируемом образце.

РЕАКТИВЫ: экстрагент (вода или 0,5 н. K_2SO_4 , готовят, растворяя 42,6 г соли в 1 л воды), сернохромовая смесь (готовят, растворяя 23,2 г $K_2Cr_2O_7$ в 400 мл воды, затем осторожно приливают 2 л конц. H_2SO_4 с плотностью 1,84 г/см³).

ОБОРУДОВАНИЕ: ФЭК, центрифуга, термостат.

ХОД АНАЛИЗА: 50 г свежей почвы, предварительно просеянной через сито с ячейками 1-3 мм и освобожденной от корней растений, помещают в коническую колбу емкостью 300 мл и высушивают в сушильном шкафу при 70°C в течение 18-24 ч. Параллельно определяют содержание влаги в свежем образце почвы. Одновременно контрольный образец (без прогрева) заливают 0,5 н. раствором K_2SO_4 (соотношение почва : раствор K_2SO_4 = 1 : 2) и взбалтывают на качалке в течение 30 мин. Затем суспензию фильтруют через двойной складчатый крупнопористый фильтр или центрифугируют. Вытяжку хранят до анализа в холодильнике при 4°C в течение 18-24 ч. Из высушенной почвы вытяжку готовят аналогичным образом. При этом необходимо учесть ту влагу, которая содержалась в свежей почве и испарилась при высушивании. Легче всего это сделать путем увлажнения высушенной почвы до исходного состояния перед приготовлением вытяжки. В пробирки отбирают по 1,6 мл вытяжки из контрольного и опытного образцов, добавляют по 2,4 мл сернохромовой смеси и перемешивают. Инкубационную смесь прогревают при 140 °C в течение 20 мин., охлаждают и измеряют оптическую плотность при 590 нм. Параллельно ставят холостую пробу на реактивы (вместо надосадочной жидкости используют соответственно раствор K_2SO_4 или дистиллированную воду). Следует помнить, что во избежание выпаривания при прогревании инкубационной смеси пробирки необходимо закрывать крышками (стеклянными или из фольги). Применение ватных или резиновых пробок недопустимо, поскольку содержащиеся в них органические вещества могут исказить результаты анализов.

Расчет концентрации углерода в вытяжках производят по формулам,

$$C_v = (D_v - D_k) V / k a;$$

$$C_k = (D_c - D_k) V / k a$$

где C_v — содержание органических веществ в высушенной почве (мкг С/г); C_k — содержание органических веществ в контрольной (без высушивания) почве (мкг С/г); V — объем вытяжки (мл); a — масса почвы, взятой

для анализа (г); D_v — оптическая плотность пробы из высушенной почвы; D_c — оптическая плотность пробы из свежей (контрольной) почвы; D_k — оптическая плотность холостой пробы; k — пересчетный коэффициент от оптической плотности к концентрации (мл/мкг С).

Пересчетный коэффициент k определяют по калибровочному графику с серией растворов глюкозы (50-500 мкг С/мл, что соответствует 125-1250 мкг глюкозы/мл). k рассчитывают по тангенсу угла наклона градуировочной шкалы к оси абсцисс.

Если концентрация органических веществ в вытяжке низкая, то используют более чувствительную модификацию бихроматного метода: в составе сернохромовой смеси количество $K_2Cr_2O_7$ снижают с 23,2 до 1,26 г, а спектрофотометрию продуктов окисления осуществляют при 340 нм в кварцевых кюветах. Остальные операции остаются в неизменном виде. В области 340 нм находится максимум поглощения $Cr_2O_7^{2-}$, поэтому о количестве органических веществ судят по снижению оптической плотности реакционной смеси по сравнению с холостой пробой.

Нахождение пересчетного коэффициента и расчет биомассы. Биомассу микроорганизмов рассчитывают по формуле

$$X = (C_v - C_k)/k,$$

где x — биомасса (мкг С/г почвы); C_v и C_k — содержание растворимых органических веществ соответственно в высушенной и контрольной почве (мкг С/г почвы); k — пересчетный коэффициент, который по своему смыслу есть доля клеточных компонентов, переходящих в раствор в результате высушивания-регидратации.

Для прямого нахождения величины k почвенный образец инкубируют с известным количеством глюкозы (1-5 мг/г почвы), определяя в динамике потребление субстрата бихроматным методом в водных вытяжках и выделение CO_2 методом газовой хроматографии. Прирост углерода микробной биомассы Δx рассчитывают по уравнению материального баланса

$$\Delta x = s_0 - s - \Delta p,$$

где s_0 — доза субстратного обогащения почвы (мкг С глюкозы/г почвы); s — остаточное количество глюкозы (мкг С/г почвы); Δp — выделившийся CO_2 в избытке по сравнению с контролем (необогаченной почвой; мкг С/г почвы). Параллельно определяют количество органических веществ в вытяжках из почвы после высушивания-регидратации. Аналогичные определения проводят для необогаченной почвы.

Коэффициент пересчета k находят для каждого срока инкубации по формуле

$$K = ((C_v^r - C^r) - (C_v^k - C^k))/\Delta x,$$

где C_v и C — количество углерода растворимых органических соединений в почве после высушивания-регидратации и в почве без обработки соот-

ветственно, индекс “г” обозначает почву, обогащенную глюкозой, а индекс “к” — контрольную почву без субстратного обогащения.

Примечание. Обычно коэффициент k составляет примерно 0,25.

5.5.2. ИЗМЕРЕНИЕ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ МЕТОДОМ ФУМИГАЦИИ-ЭКСТРАКЦИИ

Прямое измерение массы почвенных микроорганизмов требует много времени и является узкоспециализированным научным исследованием. Диспергирование почвы в воде и изучение тонких пленок этой дисперсной системы под микроскопом — основной метод определения объема организмов. Чтобы перейти от объема к массе, необходимо знать плотность основных групп организмов, выражаемую как отношение массы к объему. Она варьирует от 1,1 до 1,5 г/см³.

Разработаны более удобные косвенные методы, но только недавно были приняты стандартные методы определения микробной биомассы, для усовершенствования которых до сих пор проводятся научные исследования. Рассмотренный здесь метод фумигации — экстракции наиболее прост и надежен в исполнении (Amato and Ladd, 1988, модифицированный Joergen-sen and Brookes, 1990, и Ocio and Brookes, 1990, цит. по Роуэллу, 1998).

ПРИНЦИПЫ. При помещении влажной почвы в атмосферу, содержащую пары хлороформа, микроорганизмы погибают. Содержимое клеток микроорганизмов становится растворимым и может быть экстрагировано из почвы раствором хлорида калия. Азот (N), солюбилизированный таким образом в виде аминокислот и аммония, определяют реакцией с нингидрином и измеряют спектрофотометрически в виде темно-красного комплекса. Количество определяемого N прямо пропорционально биомассе микроорганизмов, первоначально существующей в почве: около четверти N из микробной биомассы высвобождается, но эта доля примерно постоянна для разных почв (при соблюдении стандартных условий). Константу пропорциональности устанавливают сравнением количества N, реагирующего с нингидрином, с результатами определения биомассы другими методами, в первую очередь методом фумигации — инкубации.

РЕАКТИВЫ.

Реактив нингидрина. Растворяют 0,8 г нингидрина и 0,12 г гидриндантина в 30 мл диметилсульфоксида. Добавляют 10 мл литий-ацетатного буфера. Реактив готовят, как правило, в день использования, однако раствор можно хранить несколько дней, если пропустить через него (в течение 30 мин) газообразный азот, не содержащий кислорода, и хранить герметически закрытым.

Литий-ацетатный буфер. К 500 мл воды добавляют 168 г гидроксида лития $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Перемешивают до тех пор, пока около половины его не растворится. Добавляют 293 мл ледяной уксусной кислоты (CH_3COOH) и доводят объем почти до 1 л. Разбавляют 5 мл этого раствора 10 мл воды и измеряют рН. Если рН не равен $5,2 \pm 0,05$, добавляют в основную часть раствора уксусную кислоту или гидроксид лития: 1 мл или 1 г соответственно будут изменять рН примерно на 0,01. Закрывают раствор и оставляют охлаждаться на ночь. Затем доводят до 1 л и фильтруют, если раствор непрозрачный.

Водный раствор этанола. Разбавляют этанол (95%-ный по объему) равным объемом воды.

Стандартные растворы, содержащие азот. Растворяют 0,469 г лейцина в воде и доводят до 1 л. Такой раствор содержит 50 мкг N в 1 мл. В мерные колбы на 100 мл отбирают пипеткой 0, 5, 10, 15, 20 и 30 мл этого раствора, добавляют в каждую 50 мл 4 М KCl и доводят объем до метки. Эти растворы содержат 0; 2,5; 5; 7,5; 10 и 15 мкг N в 1 мл.

Раствор хлорида калия. Растворяют 289 г KCl в воде и доводят объем до 1 л, получая 4 М KCl. Разбавляют равным объемом воды, чтобы получить экстрагирующий раствор (2 М KCl).

Хлороформ.

ОБОРУДОВАНИЕ. 1) Стеклянные флаконы вместимостью 150 мл. 2) Спектрофотометр и 1-сантиметровые кюветы. 3) Водяная баня, 100 °С.

ХОД АНАЛИЗА.

1. Подготовка почвы. Почва должна быть взята с полевой влажностью и просеяна через сито с отверстиями диаметром 2 мм. Для облегчения измельчения и просеивания ее можно предварительно слегка подсушить. Можно использовать и воздушно-сухую почву, хотя в процессе высушивания на воздухе, хранения и повторного увлажнения существенная часть микроорганизмов погибает.

Воздушно-сухую почву просеивают и увлажняют до 40%-ной влагоемкости. Четыре пробы по 25 г помещают в незакупоренные стеклянные флаконы и инкубируют в течение 2 нед в большом закрытом контейнере (для этой цели пригоден эксикатор). В контейнер помещают влажную фильтровальную бумагу для предохранения почвы от высыхания и открывают каждый день для поддержания соответствующей аэрации. Поддержание таких условий позволяет достичь стабильного уровня биомассы.

2. Фумигация. Две пробы равной массы, взятые из одного и того же образца, помещают в вакуумный эксикатор вместе со стаканчиком, содержащим 25 мл хлороформа, после чего откачивают воздух до достижения интенсивного кипения хлороформа в течение 2 мин. В результате этого пары хлороформа пропитывают почву и содержащиеся в ней микроорга-

низмы погибают. Почву оставляют под воздействием паров хлороформа на 24 ч и затем удаляют стаканчик с ним из эксикатора. (Осторожно! Пары хлороформа опасны, необходимо работать в перчатках и проводить испарение в вытяжном шкафу.) Эксикатор оставляют открытым на несколько минут, затем закрывают и откачивают воздух, чтобы удалить пары хлороформа из почвы. Затем эксикатор снова открывают на некоторое время, закрывают и повторяют откачивание.

3.Экстракция. В четыре флакона с почвой (два с фумигированной и два с нефумигированной) добавляют по 100 мл раствора 2 М КС1, закрывают крышкой и встряхивают в течение 30 мин. Далее содержимое отфильтровывают через бумажный фильтр в пробирку. Для определения азота нингидринным реактивом требуется 2 мл полученного фильтрата.

4.Определение азота нингидринным реактивом.

Калибровка. В пробирки на 50 мл вносят пипеткой 2 мл стандартного раствора лейцина. Медленно добавляют 1 мл нингидринного реактива и тщательно перемешивают. Помещают пробирки на 25 мин в кипящую водяную баню, после чего охлаждают до комнатной температуры. Затем добавляют 20 мл водного раствора этанола, тщательно перемешивают и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 570 нм, используя 1-сантиметровую кювету. В контрольную кювету наливают воду. По полученным результатам строят калибровочную кривую, отражающую зависимость оптической плотности от концентрации азота.

Экстракты. Проявляют окраску, следуя приведенному выше методу, используя по 2 мл каждого экстракта, и определяют концентрацию азота по калибровочной кривой.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В литературе нет точных данных о коэффициенте, используемом для вычисления микробной биомассы по количеству азота, реагирующего с нингидрином. Трудности связаны с невозможностью добиться истинного измерения микробной биомассы для проведения калибровки метода. В Ротамстеде (Ocio and Brookes, 1990, цит. по Роуэллу, 1998) используют следующие коэффициенты (при этом все величины выражаются в микрограммах на грамм абсолютно сухой почвы):

Углерод микробной биомассы = $31 \cdot \text{Нингидрин—N}$

Азот микробной биомассы = $4,6 \cdot \text{Нингидрин—N}$

В среднем 50 % сухой биомассы составляет углерод, поэтому для нее, по-видимому, пригодно следующее соотношение:

Микробная биомасса (сухое вещество) = $62 \cdot \text{Нингидрин—N}$.

Внутри данного эксперимента эффекты обработок можно сравнивать, не подвергая сомнению выводы, однако метод не дает абсолютных значений, поэтому результаты следует интерпретировать с осторожностью.

Метод дает общее представление об определении микробной биомассы методом фумигации-инкубации. В нем предусмотрено применение хлороформа, свободного от этанола, потому, что в противном случае в почве будет оставаться этанол, который служит источником углерода, используемого микроорганизмами для увеличения интенсивности дыхания. Другие методы включают определение общего углерода или общего азота в KCl-экстракте после фумигации. Однако они присутствуют в малых количествах, что затрудняет их определение.

5.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

5.6.1. ПОКАЗАТЕЛИ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПО ДАННЫМ МЕТОДА ПОСЕВА

Бактериальное разнообразие почв, определенное на основании молекулярно-генетических методов, значительно более неопределенно и неконкретно, чем, то, которое определяется обычными методами посева. При этом при генетическом подходе пока невозможно выявить физиологические особенности и экологические функции бактерий, определяемых в почве. На этом основании Т.Г. Добровольская с соавт. (2001) предлагают выявление бактериального разнообразия с использованием разработанных ими на кафедры биологии почв МГУ подходов и показателей. В их основе лежит идентификация выявленных при посеве бактерий до рода по простым фенотипическим признакам. При этом не следует стремиться описать все разнообразие бактерий, что практически невозможно, а выбрать в качестве модельной одну из групп бактерий, все представители которой способны расти на одной и той же питательной среде. На ней определяют синэкологические показатели: доли разных таксонов бактерий, доминанты, субдоминанты и минорные группы. В качестве модельных групп выбран комплекс аэробных и факультативно-анаэробных бактерий, включающий более 50 родов (теоретически до 80), выделяемых из почвы и сопряженных субстратов и способных расти на модифицированной пептонно-глюкозо-дрожжевой среде, а также актиномицеты, выделяемые на казеин-глицериновом агаре и среде с пропионатом натрия.

После 2-3 недельной инкубации при 20-24°C подсчитывают общее количество выросших колоний и определяют общую численность в колониеобразующих единицах (КОЕ) на грамм. После проводят дифференцирующий учет колоний разных таксонов. Для этого сначала на каждой чашке выделяют макроморфологические типы колоний и подсчитывают коли-

чество колоний каждого типа. По 3-5 представителей каждого типа колоний выделяют в чистую культуру и идентифицируют по определителям Берджи на основании микроморфологических и физиолого-биохимических признаков. Последние включают определение состава дифференцирующих сахаров и аминокислот, наличия L- или мезо-диаминопимелиновой кислоты в гидролизатах целых клеток. По результатам дифференцирующего учета для образца рассчитывают относительное обилие каждой таксономической группы. Затем по полученным данным рассчитывают синэкологические показатели структуры бактериальных обществ. В результате исследований (Добровольская, Чернов, Звягинцев, 1997) установлено, что наименее изменчивы валовые и усредненные показатели: уровень общей численности, видовая насыщенность и общее обилие таксонов, инвентаризационное разнообразие (общее количество обнаруженных таксонов). Наиболее изменчивыми и информационными являются показатели, характеризующие иерархическую и синтипологическую структуру бактериальных сообществ: спектры потенциальных доминантов, уровень дифференцирующего разнообразия (отражает разнородность отдельных групп бактерий по их таксономической структуре), характер ярусной структуры, соотношения экологических групп (копиотрофов, олиготрофов, гидролитиков и т.д.).

Показатели бактериальных сообществ (Добровольская, Чернов, Звягинцев, 1997):

1.Общее обилие: численность КОЕ/г (средняя, пределы колебаний); тип пространственной организации.

2.Таксономическая структура: число обнаруженных таксонов; среднее количество таксонов в образце; α -разнообразие (индекс Шеннона): средняя, пределы колебаний; β -разнообразие: индекс Уилсона и Шмиды, среднее сходство образцов, %; число потенциальных доминантов; грамположительные/граммотрицательные.

3.Экологическая структура: доминирующие трофические группы; доля гидролитиков.

4.Типичные адаптивные признаки популяций: жизненный цикл; морфологическая дифференциация; подвижность; пигментация; устойчивость к высушиванию; нуклеотидный состав ДНК; тип стратегии.

Этот метод посева с последующей идентификацией бактерий до рода также имеет существенные недостатки: выявляется не более 50 (до 80) родов гетеротрофных аэробных и факультативно анаэробных бактерий, требуются высококлассные специалисты в области систематики бактерий, имеющих многолетний опыт идентификации бактерий; практически невозможно исследовать бактериальное разнообразие до вида.

При экологических исследованиях с определением большого массива штаммов проведение молекулярно-биологических и хемотаксономических методов идентификации практически невозможно.

5.6.2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ И АКТИНОМИЦЕТОВ ПО РАДИАЛЬНОЙ СКОРОСТИ РОСТА

Видовой и кинетический способы описания структуры комплекса почвенных микромицетов тождественны, что позволяет выделять структурные изменения по радиальной скорости роста колоний без определения видов.

Посев производят на КАА для актиномицетов и на среду Чапека для грибов. Разведение подбирают таким образом, чтобы на чашке Петри выросло не более 3-5 колоний грибов и 5-10 колоний актиномицетов. После 36 ч. инкубирования в термостате при 28°C измеряют диаметр выросших на чашках колоний при помощи микроскопа МБС-9. Эту операцию повторяют трижды через 12-24 ч.

За диаметр отдельной колонии в данный момент времени принимают среднее арифметическое измерение, выполненное в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Вычисление радиальной скорости роста проводят по формуле:

$$K_r = (r - r_0) / (t - t_0) ,$$

где K_r — радиальная скорость роста; r_0 — радиус колоний в начальный момент времени t_0 ; r — радиус колоний в момент времени t . Значение K_r определяется для каждой колонии, затем вычисляют среднюю величину $K_{r\text{ср}}$ для всех колоний, выросших при посеве.

Более детальное представление о перестройках структуры комплекса почвенных грибов и актиномицетов дает анализ распределения по классам с различной радиальной скоростью роста. Для изучения распределения актиномицетов и грибов по скоростям роста выбирают классы значений радиальной скорости роста, которые захватывают весь диапазон встретившихся в опыте K_r индивидуальных колоний, причем для верхней границы отдельного класса справедливо

$$K_{r\text{верх}} = A + B (n - 1) ,$$

где A — K_r нижней границы класса; B — ширина класса; n — номер класса. Следовательно, класс объединяет в себе актиномицеты (грибы) с близкими значениями радиальных скоростей роста.

Оценку разнообразия сообщества проводят с помощью индекса разнообразия Шеннона по формуле

$$D = (\sum p_n \lg p_n) / \lg 2 ,$$

где D — индекс разнообразия Шеннона; $p_n = N_n / \sum N_n$; N_n — доля актиномицетов (грибов) n -го класса в %.

$K_{\text{гср}}$ и индекс Шеннона следует рассчитывать по выборке из 30-40 колоний для грибов и 70-100 колоний для актиномицетов.

5.7. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИИ

Старыми методами микробиологии установили лишь 1-5 % почвенных бактерий (Rondon, Goodman, Handelsman, 1999). Поэтому бурно развиваются новые методы идентификации бактерий: метод мультисубстратного тестирования (метаболический потенциал сообщества), анализ профилей метиловых эфиров жирных кислот, разные модификации молекулярно-биологических методов.

Преимущества молекулярно-биологических методов по сравнению с традиционным методом посева: облегчается трудоемкая процедура посева, культивирования и выделения чистых культур микроорганизмов, разнообразие выделенных бактерий повышается в сотни и более раз, учет «некультивируемых форм» бактерий, обнаружение новых эволюционных линий.

Определение ДНК-ДНК гомологии основано на аналитическом определении сходства ДНК двух организмов. Принимается, что организмы, различающиеся по ДНК-ДНК гомологии менее чем на 30 %, принадлежат к одному виду. О свойствах организмов эти данные ничего не говорят, но надежно устанавливают эквивалентность, а особенно идентичность сравниваемых объектов.

Новый метод молекулярной биологии классификации организмов основан на сравнении последовательности нуклеотидов в гене 16S рРНК. Этот ген выбран по нескольким причинам. Он наиболее удален от функциональных зависимостей, связанных с условиями обитания. Он технически удобен, поскольку содержит 1500 пар оснований. Такого рода анализ последовательности нуклеотидов при фактическом отсутствии организма дает «номер паспорта» (Заварзин, Колотилова, 2001). Полученные записи результатов сравнения в виде графов внешне сходны с дихотомическими деревьями определительных ключей. В настоящее время проанализированы последовательности 16S рРНК почти 5 тысяч видов бактерий. Принято, что при различии более 5 % в последовательности нуклеотидов в гене 16S рРНК организмы принадлежат к разным родам. Полное сравнение генома требует в отличие от исследования 16S рРНК — одного гена со специальной функцией в синтезе белка, анализа около 4 млн. пар оснований в ДНК, поэтому до сих пор неприемлемо.

Исследование биоразнообразия в природе проводится на основе экстракции суммарной ДНК из образца, очистки, амплификации, получения генов рРНК, их секвестирования и сопоставления с имеющимся компьютерным банком данных. Другой прием заключается в применении генных проб, позволяющих сразу же установить принадлежность организмов к той или иной ветви.

Сущность и недостатки молекулярно-биологических методов исследования бактерий почв описаны по работе Т.Г. Добровольской, Л.В. Лысак, Г.М. Зеновой, Д.Г. Звягинцева (2001).

1.Изучение экстрактов ДНК из почвы при помощи метода реассоциации или дифференцированного центрифугирования в градиенте CsCl.

Изучение экстрагированной из почвы ДНК методом реассоциации основано на связи гетерогенности препарата бактериальной ДНК со скоростью ее реассоциации. Гетерогенность ДНК определяется как общая длина различных ДНК последовательностей. Определяемое количество пар оснований в негомологичной ДНК эквивалентно размеру генома в целом и может использоваться для характеристики разнообразия бактериальных сообществ. Недостатки метода слабая экстракция ДНК из почвы (около 20%), сложность очистки от гумусовых веществ, длительность реассоциации (до 2 недель).

Дифференцированное центрифугирование в градиенте CsCl очищенного экстракта ДНК позволяет разделить тотальный препарат ДНК на фракции с разной плавучей плотностью, которая связана соответствующей формулой с мол.% Г+Ц. Полученные данные могут быть дальше более детально изучены другими молекулярными методами — гибридизация, фингерпринт и т.д. Этот простой метод имеет такие же недостатки, кроме того, он недостаточно чувствителен к изменениям в бактериальном сообществе.

2.Экстракция из почвы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) с последующей амплификацией фрагментов гена 16S рРНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) и детальное изучение амплифицированных фрагментов разнообразными молекулярно-генетическими методами.

Большинство современных исследований выполнено методом экстракции из почвы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) с последующей амплификацией фрагментов гена 16S рРНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) и детальным изучением полученных фрагментов.

ХОД АНАЛИЗА:

1.Экстракция ДНК из почвы.

2.Амплификация фрагментов последовательностей ДНК, кодирующих 16S рРНК при помощи ПЦР с универсальными или специфическими праймерами.

3.Клонирование полученных амплификантов путем введения соответствующих векторов в геном *E. coli* и создание так называемой «библиотеки почвенных клонов».

4.Изучение амплифицированных последовательностей «почвенных клонов» различными молекулярно-генетическими методами: прямого секвенирования, гибридизации с реперными последовательностями, разнообразными модификациями рестрикционного анализа с использованием различных приемов гель-электрофореза.

5.Анализ полученной информации о последовательностях путем сравнения с базами данных о последовательностях. В настоящее время в Рибосомальной базе данных (RDB) содержатся сведения о почти 10000 тысячах полных или частичных последовательностях коллекционных культур и «почвенных клонов», причем база все время пополняется.

В результате идентификации по 16S рРНК природных популяций показало, что «в природе есть множество объектов, которые не могут быть сопоставлены с известными, организмы, выделенные в чистую культуру, в природе немногочисленны. Следовательно, культуральные методы вносят систематическую ошибку в познание биоразнообразия микробного мира, и вся концепция валидации на основе тезиса «чистая культура в признанной коллекции» потерпела крах: можно сказать и трудно опровергнуть, что существующая таксономия бактерий, как она представлена в определителях Берджи на основании узаконенных в соответствии с Кодексом номенклатуры бактерий, есть «классификация артефактов». ... Выход из кризиса состоит в необходимости перехода от геномных характеристик к функциональным» (Заварзин, Колотилова, 2001).

Обладая множеством достоинств, метод идентификации по 16S рРНК природных популяций дает лишь ответ на вопрос о присутствии или отсутствии в образце фрагментов последовательностей, характерных для определенного таксона и их близости к последовательности реперных штаммов из доступных баз данных, а не об относительном количестве его в сообществе. Метод сложен, многоступенчат и на каждом этапе могут быть ошибки, искажающие результаты анализа. Согласно исследованиям, проведенным этим методом, в почве преобладают грамотрицательные формы бактерий, в то время как традиционный посев выявляет доминирование грамположительной микрофлоры. Т.Г. Добровольская с соавт. (2001) объясняет это более легким лизисом грамотрицательных бактерий.

3.Изучение бактериальных популяций почвы *in situ* методом гибридизации с олигонуклеотидными маркерами (ДНК- и РНК-зондами), меченными флуоресцентными красителями.

Изучение бактериальных популяций почвы *in situ* методом гибридизации с олигонуклеотидными маркерами (ДНК- и РНК-зондами), меченными флуоресцентными красителями позволяет получить количественную информацию о метаболически активных или численно доминирующих популяциях в почве на основании специфического связывания последовательностей 16S (реже 23S) рРНК со специально подобранными олигонуклеотидными маркерами (зондами). При этом флуоресцентный краситель (акридин оранжевый или ДАФИ (4,6-диамидино-2-фенилиндол)), присоединенный к олигонуклеотидному маркеру, легко диагностирует искомые клетки при просмотре препарата под микроскопом при специальной подсветке. Метод имеет ограничения, связанные, как с разной проницаемостью клеточных покровов по отношению к маркерам, так и высоким требованием к содержанию клеток в препарате (не менее 1 млн/г почвы).

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ

6.1. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

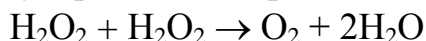
На основании многочисленных исследований, проведенных для различных типов почв, рекомендуется определение активности ферментов проводить с одинаковой навеской (1 г) свежей воздушно-сухой, очищенной от растительных остатков и камней, почвы, просеянной через сито диаметром отверстий 1 мм, при постоянной температуре 30°C (кроме каталазы — 20°C, активность которой определяется газометрически), при естественных значениях значения pH. **Обязательно** необходим анализ контрольных образцов (образцы, стерилизованные в течение 3 часов в сушильном шкафу при 180°C) для установления каталитической активности почвы и контроль для определения чистоты реактивов. Во многих методиках рекомендуется определение активности фермента при оптимальном для него значениях pH. Однако с целью выявления активности фермента в реальных условиях при биодиагностике почв авторы придерживаются рекомендаций А.Ш. Галстяна (1978) об определении активности при естественной реакции среды почвы. Активность ферментов следует выражать в одинаковых единицах продукта реакции на определенную массу почвы (обычно 1 г).

При анализе активности ферментов (особенно каталазы) в большом количестве образцов удобно заранее приготавливать взвешенные навески почвы в пакетики из кальки, а лучше в сухие чистые пробирки.

6.1.1. КАТАЛАЗА

(H₂O₂ : H₂O₂ - оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6.)

Каталаза катализирует реакцию разложения перекиси водорода с образованием воды и молекулярного кислорода:



Перекись водорода образуется в процессе дыхания живых организмов и в результате различных биохимических реакций окисления органических веществ. Токсичность перекиси водорода определяется его высокой реакционной способностью, которую проявляет синглетный кислород, *O₂. Его высокая реакционная способность приводит к неконтролируемым реакциям окисления. Роль каталазы заключается в том, что она разрушает ядовитую для организмов перекись водорода.

Каталаза широко распространена в клетках живых организмов, в том числе микроорганизмов и растений. Высокую каталазную активность проявляют также почвы.

Методы определения каталазной активности почвы основаны на измерении скорости распада перекиси водорода при взаимодействии ее с почвой по объему выделяющегося кислорода (газометрические методы) или по количеству неразложившейся перекиси, которое определяют перганатометрическим титрованием или колориметрическим методом с образованием окрашенных комплексов.

Исследованиями К.Ш. Казеева и Е.В. Даденко (2001) установлено, что при хранении образцов активность каталазы из всех ферментов снижается в наибольшей степени, поэтому ее определение необходимо проводить в первую неделю после отбора образцов.

Метод А.Ш. Галстяна (1978)

ХОД АНАЛИЗА. Для определения активности каталазы используют прибор из двух соединенных резиновым шлангом бюреток. Бюретки заполняют водой. Уровень воды в бюретках уравнивают. Необходимо поддерживать определенный уровень воды в бюретках, это свидетельствует о достижении температурного равновесия в приборе. Навеску (1 г) почвы вносят в одно из отделений сдвоенной колбы (рис. 18). Обычно рекомендуемое внесение мела роли не играет. В другое отделение колбы приливают 5 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. Колбу плотно закрывают каучуковой пробкой со стеклянной трубкой, которая соединена с измерительной бюреткой с помощью резинового шланга.

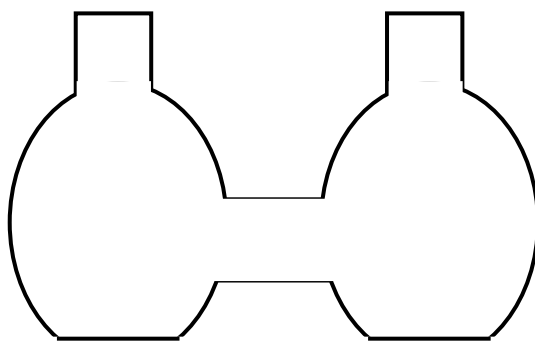


Рис. 18. Сдвоенная колба.

Опыт проводят при температуре 20°C. При другой температуре скорость реакции будет отличаться, что исказит результаты. В принципе, важна температура не воздуха, а перекиси, температура которой должна быть 20°C. В случае значительных отличий температуры воздуха от 20°C (чаще всего летом), рекомендуется проводить анализ в подвале или другом прохладном помещении. Рекомендованное в таких случаях применение

водяной бани с температурой 20°C вряд ли эффективно в случае сильных отклонений температуры воздуха от рекомендованной при анализе.

Начало опыта отмечают по секундомеру или песочным часам в тот момент, когда перекись смешивается с почвой, и содержимое сосуда встряхивают. Взбалтывание смеси производят в течение всего опыта, стараясь не касаться колбы руками, держа ее за пробку. Выделяющийся кислород вытесняет из бюретки воду, уровень которой отмечают через 1 и 2 мин. Рекомендации определять количество кислорода через каждую минуту в течение 3 минут ввиду прямолинейности реакции разложения перекиси лишь увеличивает затраты времени на анализ.

Один исследователь при использовании данной методики способен за день проанализировать активность каталазы более чем 100 образцов. Удобно проводить анализ вдвоем и с использованием 5-6 сосудов. Один человек непосредственно занимается анализом и следит за уровнем бюретки, второй следит за временем, записывает данные и моет использованные сосуды.

Контролем служат стерилизованная сухим жаром (180°C) почва. Некоторые почвы, соединения и минералы обладают высокой активностью неорганического катализа разложения перекиси даже после стерилизации — до 30-50% от общей активности.

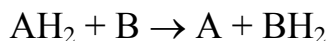
Активность каталазы выражают в миллилитрах O₂, выделяющегося за 1 мин. из 1 г почвы.

РЕАКТИВЫ: 3%-ный раствор H₂O₂. Концентрацию пергидроля **обязательно** периодически проверяют, рабочий раствор готовят непосредственно перед анализом. Для установления концентрации пергидроля на аналитических весах в мерной колбе емкостью 100 мл взвешивают 1 г H₂O₂, объем доводят до метки и взбалтывают. Берут 20 мл полученного раствора в конические колбы на 250 мл (3 повторности), добавляют 50 мл дистиллированной воды и 2 мл 20% H₂SO₄. Затем титруют 0,1 н. KMnO₄. 1 мл KMnO₄ соответствует 0,0017008 г H₂O₂. После установления концентрации пергидроля готовят 3% раствор разбавлением дистиллированной водой. Титровальный раствор KMnO₄ готовят из фиксанала и выдерживают несколько дней для установления титра.

6.1.2. ДЕГИДРОГЕНАЗЫ

(субстрат : НАД (Ф) - оксидоредуктазы, КФ 1.1.1).

Дегидрогеназы катализируют окислительно-восстановительные реакции путем дегидрирования органических веществ. Они проходят по следующей схеме:



В почве субстратом дегидрирования могут быть неспецифические органические соединения (углеводы, аминокислоты, спирты, жиры, фенолы и т.д.) и специфические (гумусовые вещества). Дегидрогеназы в окислительно-восстановительных реакциях функционируют как переносчики водорода и разделяются на две группы: 1) аэробные, которые передают мобилизованный водород кислороду воздуха; 2) анаэробные, которые передают водород другим акцепторам, ферментам.

Основным методом обнаружения действия дегидрогеназ является восстановление индикаторов с низким редокс-потенциалом типа метиленовой сини.

Для определения активности дегидрогеназ почвы в качестве водорода применяют бесцветные соли тетразолия (2,3,5-трифенилтетразолий хлористый — ТТХ), которые восстанавливаются в красные соединения формазанов (трифенилформазан — ТФФ).

ХОД АНАЛИЗА. Навеску (1 г) подготовленной почвы аккуратно через воронку помещают на дно пробирки емкостью 12-20 мл, и тщательно перемешивают. Прибавляют 1 мл 0,1 М раствора субстрата дегидрирования (глюкоза) и 1 мл свежеприготовленного 1%-ного раствора ТТХ. Пробирки помещают в анаэроостат или вакуумный эксикатор. Определение проводят в анаэробных условиях, для чего воздух эвакуируют при разряжении 10-12 мм рт. ст. в течение 2-3 мин и ставят в термостат на 24 часа при 30°C. При инкубировании почвы с субстратами толуол в качестве антисептика не прибавляют, так как он сильно ингибирует действие дегидрогеназ. Контролем служат стерилизованная почва (при 180°C в течение 3 часов) и субстраты без почвы. После инкубации в колбы добавляют 10 мл этилового спирта или ацетона, встряхивают 5 мин. Полученный окрашенный раствор ТФФ фильтруют и колориметрируют. При очень интенсивной окраске раствор разбавляют спиртом (ацетоном) в 2-3 раза. Используют 10 мм кюветы и светофильтр с длиной волны 500-600 нм. Количество формазана в мг рассчитывают по стандартной кривой (0,1 мг в 1 мл). Активность дегидрогеназ выражают в мг ТТФ на 10 г почвы за 24 часа. Ошибка определения до 8%.

РЕАКТИВЫ: 1) 1%-ный раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого; 2) 0,1 М раствор глюкозы (18 г глюкозы растворяют в 1000 мл дистиллированной воды; 3) этиловый спирт или ацетон; 4) трифенилформазан для стандартной шкалы. Для составления калибровочной кривой готовят ряд растворов в этиловом спирте, ацетоне или толуоле с концентрацией формазана (от 0,01 до 0,1 мг формазана в 1 мл) и фотоколориметрируют как описано выше.

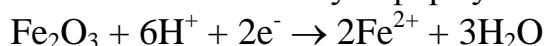
При отсутствии формазана, его получают восстановлением ТТХ гидросульфитом натрия, сульфитом аммония, порошком цинка в присут-

ствии глюкозы или др. Исходная концентрация раствора ТТХ 1 мг/мл. К 2 мл исходного раствора ТТХ добавляют на кончике ланцета кристаллический гидросульфит натрия. Выпавший осадок формазана извлекают 10 мл толуола. В этом объеме толуола содержится 2 мг формазана (0,2 мг/мл). Дальнейшим разведением готовят рабочие растворы для шкалы.

6.1.3. ФЕРРИРЕДУКТАЗЫ

(НАД(Ф) · Н₂ : Fe₂O₃ - оксидоредуктаза. КФ 1.6.99.)

Восстановление соединений железа характерно для почвообразования в гумидных районах с преобладанием анаэробных условий в почвенном профиле. В этом непосредственное участие принимают многие виды микроорганизмов с помощью своих метаболитов, среди которых биологически активными являются ферменты. При восстановлении железа в почве участвуют дегидрогеназные системы. Эти ферменты называются ферриредуктазами (Fe₂O₃-редуктазы). Дегидрогеназы почвы (ферриредуктазы) используют кислород окиси железа в качестве конечного акцептора электронов в цепи окислительно-восстановительных процессов в почве. При этом окись железа восстанавливается в закисную форму:



Донорами водорода могут служить различные органические соединения почвы.

Высокая активность ферриредуктазы обнаруживается в гидроморфных почвах пойм рек и внепойменных переувлажненных почвах мочаров, где она может служить индикатором процессов переувлажнения.

Модифицированный метод А.Ш. Галстяна, Н.А. Оганесяна (1973)

Метод основан на определении количества образующегося двухвалентного железа при взаимодействии окиси железа с почвой.

ХОД АНАЛИЗА. 1 г почвы помещают в пробирку емкостью 12-15 мл, вносят 10 мг окиси железа в виде тонко измельченного порошка, тщательно перемешивают и добавляют 1 мл дистиллированной воды и 1 мл 1%-ной глюкозы. Пробирки осторожно встряхивают и помещают в анаэроостат или вакуумный эксикатор. Воздух из анаэроостата (вакуумного эксикатора) откачивают при разряжении 10-12 мм рт. ст. и помещают в термостат на 48 ч. при 30°C. В качестве контролей ставят почву с водой вместо субстрата и субстрат без почвы. После инкубирования в термостате в опытную и контрольную пробирку добавляют 8 мл 1 н. серной кислоты для экстрагирования восстановленного железа. Пробирки встряхивают 5 мин и центрифугируют 3 мин при 3000 об/мин. К 5 мл фильтрата добавляют 4 мл ацетатного буферного раствора и 1 мл 0,5%-ного раствора фенантролина. Раствор перемешивают. В случае интенсивной окраски

фильтрат следует разбавить. Через 30 мин окрашенный раствор колориметрируют, используя кюветы на 10 мм и зеленый светофильтр (500 нм). Количественный учет восстановленного железа производят с помощью калибровочного графика, построенного по данным стандартных растворов солей Мора.

$$C = C_{\text{График}} * 200$$

Активность ферриредуктазы выражают в миллиграммах восстановленного Fe_2O_3 на 100 г почвы за 48 ч.

РЕАКТИВЫ: 1) Fe_2O_3 (тонко растертый в ступке порошок); 2) 1%-ный раствор глюкозы (свежеприготовленный); 3) 1 н. раствор H_2SO_4 ; 4) ацетатный буфер — 100 г CH_3COONa растворяют в 500 мл воды, добавляют 300 мл ледяной уксусной кислоты и объем раствора доводят до 1 л; 5) 0,5%-ный раствор фенантролина (дипиридила) в 0,1 н. HCl ; 6) стандартный раствор соли Мора: 0,1 мг Fe в 1 мл 0,7022 г $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в холодной прокипяченной дистиллированной воде, подкисленной 2 мл концентрированной H_2SO_4 , и разбавляют водой до 1 л. Рабочие растворы железа готовят разведением стандартного раствора. Для составления шкалы к 5 мл рабочих растворов прибавляют 4 мл ацетатного буферного раствора и 1 мл 0,5%-ного раствора фенантролина и фотометрируют как описано выше.

6.1.4. ПЕРОКСИДАЗЫ

(донор : H_2O_2 - оксидоредуктаза. КФ 1.11.1.7.)

Пероксидазы осуществляют окисление органических веществ почв (фенолов, аминов, некоторых гетероциклических соединений) за счет кислорода перекиси водорода и других органических перекисей, образующихся в почве в результате жизнедеятельности микроорганизмов и действия некоторых оксидаз (например, уратоксидазы). Эти ферменты играют важную роль в процессе образования гумуса.

При определении пероксидазной активности почвы в качестве акцепторов кислорода используют полифенолы: пирогаллол, пирокатехин и др. Под действием кислорода перекиси при участии пероксидазы полифенолы окисляются и переходят в хиноны.

Методы определения пероксидазной активности почвы основаны на учете количества продуктов окисления полифенолов, используемых в качестве субстратов фермента, путем фотометрических измерений интенсивности их окраски в случае образования окрашенных соединений (например, пурпургаллина) или методом титрования.

Метод А.Ш. Галстяна (1974)

ХОД АНАЛИЗА. 1 г почвы помещают в мерные колбы емкостью 50 мл с притертыми пробками, затем вносят 10 мл 1%-ного раствора пирогаллола и 2 мл 0,5 %-ной перекиси водорода. Содержимое колбы встряхивают, и колбы ставят в термостат на 30 мин при 30°C. Реакцию останавливают прибавлением 5 мл 20%-ной серной кислоты. Образовавшийся пурпургаллин извлекают серным эфиром, для чего в колбу после инкубации доливают до метки эфир, энергично взбалтывают несколько раз, и окрашенную эфирную фазу смеси, содержащую растворенный пурпургаллин, колориметрируют. В случае высокого содержания пурпургаллина экстракцию его из почвы повторяют до получения бесцветного эфирного раствора, после чего все эфирные вытяжки соединяют и доводят до определенного объема, добавляя эфир. При колориметрировании эфирного раствора пурпургаллина используют кюветы толщиной 10 мм и светофильтр с длиной волны 430 нм. Для внесения корректив на эфирорастворимые органические вещества почвы и чистоту пирогаллола ставят контроли — соответственно почва без субстратов и субстраты без почвы. В контроле — почва без субстрата — почву инкубируют с 12 мл воды. Количество пурпургаллина находят по стандартной кривой, составленной по раствору бихромата калия.

Активность пероксидазы выражают в миллиграммах пурпургаллина на 100 г почвы за 30 мин.

РЕАКТИВЫ: 1) 1%-ный раствор 1,2,3-пирогаллола; 2) 0,5%-ный раствор H_2O_2 ; 3) серный эфир; 4) 0,5 н. HCl ; 5) 20%-ный раствор H_2SO_4 ; 6) стандартный раствор бихромата калия: 0,75 г $K_2Cr_2O_7$ в 1 л 0,5 н. HCl . (Это соответствует 5 мг пурпургаллина в 50 мл эфира.) Для составления калибровочной кривой делают соответствующие разведения стандартных растворов и просматривают на колориметре, как описано выше.

6.1.5. ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ

(О-дифенол : кислород-оксидоредуктаза. КФ 1.10.3.1.)

Полифенолоксидазы участвуют в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса. Они катализируют окисление фенолов (моно-, ди-, три-) до хинонов в присутствии кислорода воздуха. Хиноны в соответствующих условиях при конденсации с аминокислотами и пептидами образуют первичные молекулы гуминовой кислоты.

Методы определения полифенолоксидазной активности почвы основаны на измерении скорости окисления внесенных в почву полифенолов. Наиболее активно окисляется пирогаллол (Купревич, Щербакова, 1966).

Метод А.Ш. Галстяна (1974)

В процессе взаимодействия пирогаллола с почвой происходит окисление его под действием полифенолоксидаз при участии кислорода воздуха. Образующийся пурпургаллин определяют колориметрически.

ХОД АНАЛИЗА. Активность полифенолоксидазы определяют тем же способом, что и активность пероксидазы, за исключением того, что в реакционную среду не вносят перекись водорода.

Активность полифенолоксидазы выражают в миллиграммах пурпургаллина на 100 г почвы за 30 мин.

РЕАКТИВЫ: 1) 1%-ный раствор 1,2,3-пирогаллола; 2) серный эфир; 3) 0,5 н. HCl; 4) 20%-ная H₂SO₄; 5) стандартный раствор бихромата калия: 0,75 г K₂CrO₇ в 1 л 0,5 н. HCl. (Это соответствует 5 мг пурпургаллина в 50 мл эфира).

6.1.6. АСКОРБАТОКСИДАЗА

(L - аскорбат: кислород-оксидоредуктаза. КФ 1.10.3.3)

Аскорбиновая кислота (витамин С) является широко распространенным в растениях и микроорганизмах соединением, поступающим также в почву. Под действием аскорбатоксидазы она превращается в дегидроаскорбиновую кислоту.

Аскорбатоксидаза широко распространена в растениях и играет роль «конечной» оксидазы в процессе клеточного дыхания. Почвы также проявляют аскорбатоксидазную активность.

Метод А.Ш. Галстяна, Л.Г. Марукяна (1973)

Метод основан на определении остаточного количества аскорбиновой кислоты в процессе реакции при использовании ее редуцирующих свойств. Разница между количеством остаточной аскорбиновой кислоты и внесенной в почву равняется количеству образующейся дегидроаскорбиновой кислоты.

ХОД АНАЛИЗА. 1 г почвы помещают в колбы емкостью 50 мл, добавляют 1 мл 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты и 1 мл воды. Колбы осторожно встряхивают, закрывают корковыми пробками и ставят в термостат на 1 час при температуре 30°C. После инкубации добавляют 28 мл 1%-ной соляной кислоты, встряхивают в течение 5 мин и фильтруют. 5 мл фильтрата переносят в колбы емкостью 200-250 мл, где было налито 45 мл воды. Количество аскорбиновой кислоты определяют титрованием 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола до розового окрашивания, которое не исчезает в течение 1 мин. Контроли: субстрат без почвы, стерилизованная почва (в автоклаве при 1,5 атм. в течение 1 часа) и почва с водой (без субстрата).

Активность аскорбатоксидазы выражают в миллиграммах дегидроаскорбиновой кислоты на 100 г почвы за 1 ч. Расчет производят, принимая во внимание, что количество аскорбиновой кислоты эквивалентно количеству образующейся дегидроаскорбиновой кислоты.

$$x = [B - (A - D)] - [B - (C - D)] K \cdot 6 \cdot 100,$$

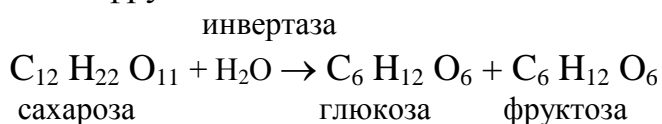
где количество 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (в мл) израсходовано на титрование: А — в опытном варианте, В — в контроле без почвы, С — в варианте со стерильной почвой, D — в варианте с почвой без субстрата, К — количество аскорбиновой кислоты, эквивалентное 1 мл 0,001 н. 2,6-дихлорфенолиндофенола (устанавливают титрованием стандартного раствора аскорбиновой кислоты), мг; 6 — коэффициент для пересчета на весь объем фильтрата; 100 — коэффициент для пересчета на 100 г почвы.

РЕАКТИВЫ: 1) 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты, 2) 1%-ная HCl, 3) 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (синьки), 4) стандартный раствор аскорбиновой кислоты, (в мг/мл).

6.1.7. ИНВЕРТАЗА

(β - фруктофуранозидаза, сахараза, КФ 3.2.1.26)

Инвертаза является карбогидразой, она действует на β - фруктофуранозидазную связь в сахарозе, раффинозе, генцианозе и др. Наиболее активно этот фермент гидролизует сахарозу с образованием редуцирующих сахаров — глюкозы и фруктозы:



Инвертаза широко распространена в природе и встречается почти во всех типах почв. Очень высокая активность инвертазы обнаружена в горно-луговых почвах. Активность инвертазы четко коррелирует с содержанием гумуса и почвенным плодородием. Рекомендуются при исследовании влияния удобрений для определения их эффективности. Методы определения активности инвертазы почв основаны на количественном учете восстанавливающих сахаров по Бертрону и по изменению оптических свойств раствора сахарозы до и после воздействия фермента. Первый способ может быть применен при изучении фермента с очень широкой амплитудой активности и концентрации субстрата. Поляриметрический и фотоколориметрический способы более требовательны к концентрации сахаров и неприемлемы для почв с высоким содержанием органического вещества, где получают окрашенные растворы; поэтому эти методы ограничено применяются в почвенных исследованиях.

Модифицированный колориметрический метод Ф.Х. Хазиева

ХОД АНАЛИЗА. Навески (1 г) подготовленной почвы помещают в колбы емкостью 50 мл, добавляют 5 мл 3%-ного свежеприготовленного раствора сахарозы на фосфатном буфере (рН 4,9) и каплю-две толуола. При биодиагностике почв активность инвертазы определяют без добавления буфера — при рН почвы. Колбы закрывают корковыми пробками, осторожно встряхивают и помещают в термостат при 30°C на 24 часа. Контролем служат субстраты без почвы и почва, стерилизованная сухим жаром при 180°C в течение 3 часов. В течение инкубации колбы периодически встряхивают. После инкубации в колбы добавляют 25 мл дистиллированной воды, взбалтывают и фильтруют. В случае высокой активности инвертазы (особенно в горно-луговых и торфянистых почвах с высоким содержанием гумуса) количество добавляемой воды увеличивают до 50-100 мл. В случае низкой активности количество дистиллята уменьшают до 5-10 мл. Разведение учитывают при расчетах активности фермента.

Берут пипеткой 6 мл фильтрата в пробирку объемом 15-20 мл. Добавляют пипеткой 6 мл реактива Феллинга, перемешивают. Пробирку с ярко-синим раствором нагревают на кипящей водяной бане 10 мин. При нагревании часть меди реактива Феллинга восстанавливается и выпадает в осадок красного цвета, при этом раствор осветляется. Далее пробирки охлаждают, содержимое центрифугируют 1-3 мин при 1500-3000 об/мин. Колориметрировать при длине волны 630 нм в кюветах шириной 1 см.

Окрашенный раствор лучше колориметрировать на фотоэлектроколориметре КФК-3 с непрерывной шкалой, так как при использовании КФК-2 или подобных ему приборов с ограниченной шкалой дает неточные результаты, так как большинство значений ложатся в левой недробной половине шкалы.

Количество глюкозы (мг/мл) определяют по калибровочной кривой. Полученные данные умножают на 30 (общий объем раствора). Активность инвертазы выражают в миллиграммах глюкозы на 1 г почвы за 24 часа.

РЕАКТИВЫ: 1) свежеприготовленный 3%-ный раствор сахарозы (для хранения раствора в течение нескольких дней добавляют несколько капель толуола); 2) толуол; 3) реактив Феллинга, готовый реактив не хранится и готовится он смешиванием двух растворов перед анализом: раствор-1 — 100 г сегнетовой соли (калий-натрий виннокислый) растворяют в дистиллированной воде, прибавляют 75 г КОН или NaOH и доводят объем до 500 мл; раствор-2 — 20 г CuSO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят до 500 мл, 4) стандартный раствор глюкозы. Исходный раствор: 6 мг глюкозы в 1 мл дистиллированной воды. Рабочие растворы готовят, доводя 1, 2, 5, 10, 15, 20 мл исходного раствора (соответственно 0,06, 0,12, 0,30, 0,6, 0,9 и 1,2 мг глюкозы в 1 мл раствора) дистиллятом в

мерных колбах до 100 мл. Далее к 6 мл растворов добавляют реактив Феллинга и дальше действуют по описанной выше методике.

6.1.8. α - и β -АМИЛАЗЫ

(α - амилаза: 1,4 - α - глюкан - глюканогидролаза. КФ 3.2.1.1.;

β -амилаза: 1,4 - α - глюкан - мальтогидролаза. КФ 3.2.1.2.)

Ферменты амилазы осуществляют гидролиз крахмала с образованием декстринов и мальтозы. Крахмал входит в состав органических остатков, попадающих в почву.

В природе встречаются два типа амилаз: α - амилаза гидролизует 1,4 - α - глюкозидные связи в полисахаридах (крахмал, гликоген и родственные поли- и олигосахариды), содержащих три или более остатков α - глюкозы, соединенных 1,4 - α - связями; β -амилаза гидролизует 1,4 - β - глюкозидные связи в полисахаридах (крахмал, гликоген и родственные поли- и олигосахариды), последовательно отщепляя остатки мальтозы и образуя путем инверсии β - мальтозу. В почвах преобладает β -амилаза. Методы определения активности амилазы почв основаны на измерении количества редуцирующих сахаров, образующихся при гидролизе крахмала в почве.

Метод А.Ш. Галстяна (1978)

ХОД АНАЛИЗА: 1 г почвы помещают в колбу емкостью 50 мл, несколько капель толуола и 5 мл 2%-ного раствора крахмального клейстера, приготовленного на ацетатном буфере (рН 5,9). Колбу ставят в термостат на 24ч при 30°C. После завершения инкубации в колбы приливают 25 мл воды и фильтруют. Редуцирующие сахара определяют колориметрическим методом. Взять пипеткой 6 мл фильтрата в большую пробирку. Добавить пипеткой 6 мл реактива Феллинга, перемешать.

Пробирку с раствором нагревать на кипящей водяной бане 10 мин, охладить, содержимое перенести в пробирку; центрифугировать 1-3 мин при 1500-3000 тыс. об./мин. Колориметрировать при длине волны 630 нм в кюветах шириной 1 см.

Количество глюкозы рассчитывается по калибровочной кривой. Исходный стандартный раствор: 6 мг глюкозы в 1 мл воды. В качестве контроля используют почву, простерилизованную сухим жаром при 180°C в течение 3 час.

Активность амилазы выражают в миллиграммах глюкозы на 1 г почвы за 24 часа.

РЕАКТИВЫ: 1) 2%-ный крахмал; 2) толуол; 3) ацетатный буфер (рН 5,9); остальные реактивы такие же, как использовались для определения инвертазы.

6.1.9. ПРОТЕАЗЫ

(пептид - гидролазы. КФ 3.4.4.)

Протеолитические ферменты катализируют гидролитическое расщепление белковых веществ до пептидов и гидролиз этих продуктов до аминокислот.

Протеазы делят на две группы: протеиназы и пептидазы. Первые из них расщепляют настоящие белки, а вторые катализируют распад полипептидов и дипептидов до аминокислот. Однако такое деление довольно условно.

При определении активности протеаз в почве в качестве субстрата обычно применяют казеин, желатину и некоторые пептиды. Активность протеаз учитывают по количеству аминокислот или других кислоторастворимых продуктов, освобождающихся при распаде белковых субстратов в почве, или по изменению физических свойств субстрата, например по уменьшению вязкости.

Колориметрические методы основаны на учете количества аминокислот, образующихся при протеолизе внесенных в почву белков, путем связывания их в окрашенные комплексы.

Метод А.Ш. Галстяна (1978)

ХОД АНАЛИЗА. 1 г почвы помещают в стеклянную колбу емкостью 50 мл, прибавляют 5 мл 1%-ного раствора желатины или казеина, приготовленного на фосфатном буфере (рН 7,4), и 0,2 мл толуола. Колбу тщательно встряхивают, закрывают корковой пробкой и ставят в термостат на 24 ч при температуре 30°C, периодически встряхивают. После инкубации добавляют 5 мл воды и содержимое колбы фильтруют. Из фильтрата берут 5 мл раствора в пробирку, прибавляют 0,5 мл 0,1 н. серной кислоты и 3 мл 20%-ного сернокислого натрия для осаждения белков. Затем снова фильтруют в пробирку и прибавляют 1 мл 2%-ного раствора нингидрина. Смесь тщательно взбалтывают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Полученный окрашенный раствор из пробирки переливают в мерную колбу емкостью 50 мл, объем доводят дистиллированной водой до метки и проводят фотоколориметрирование, используя зеленый светофильтр (длина волны 500- 560 нм). Контрольные пробы ставят со стерилизованной сухим жаром почвой и субстратом без почвы. Количество аминокислот в переводе на глицин находят по калибровочной шкале, составленной на чистый глицин.

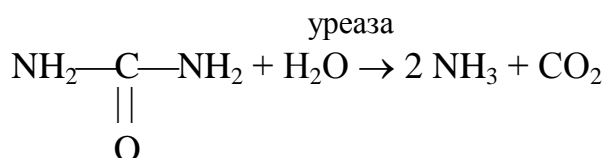
Активность протеазы выражают в миллиграммах глицина на 1 г почвы за 24 ч.

РЕАКТИВЫ. 1) 1%-ный раствор желатины или казеина в фосфатном буфере (pH 7,4) — при биодиагностике используют водный раствор; 2) толуол; 3) фосфатный буфер (pH 7,4); 4) 0,1 н. H_2SO_4 ; 5) 20%-ный раствор Na_2SO_4 ; 6) 2%-ный раствор нингидрина: 2 г нингидрина растворяют в 100 мл ацетона. Рабочий раствор готовят, смешивая 95 мл ацетонового раствора с 1 мл CH_3COOH и 4 мл воды. Раствор нестойкий, готовят только перед употреблением; 7) стандартный раствор глицина; водный раствор глицина концентрации 100 мкг в 1 мл. Путем соответствующих разбавлений готовят рабочие растворы, окрашивают нингидрином (как описано выше) и составляют шкалу.

6.1.10. УРЕАЗА

(карбамид - амидогидролаза, КФ 3.5.1.5.)

Уреаза гидролизует карбамид (мочевину) до аммиака и углекислого газа:



В почве мочевины (карбамид) образуется в процессе превращения азотистых органических соединений — белков и нуклеиновых кислот. В значительном количестве карбамид вносится с навозом и в форме концентрированного азотного удобрения. Образовавшийся в результате уреазной реакции аммиак служит непосредственным источником азотного питания растений. Поэтому активность уреазы является одним из важнейших показателей биологической активности почв. Методы определения активности уреазы почвы основаны на учете количества аммиака, образующегося при гидролизе карбамида.

ХОД АНАЛИЗА. Навески (1 г) подготовленной почвы помещают в колбы на 50 мл, добавляют 5 мл 3%-ной мочевины и 1-2 капли толуола. Контролем служат стерилизованная почва (180°C, 3 часа) и субстраты без почвы. Колбы закрывают корковыми пробками, встряхивают и ставят в термостат при 30°C на 24 часа. В течение инкубации колбы периодически встряхивают. По окончании инкубации в колбу добавляют 15 мл 1,0 н. раствора KCl и встряхивают в течение 5 мин для вытеснения из почвы аммиака. Содержимое колбы переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 5-10 мин при 3000 об/мин или фильтруют через складчатый беззольный фильтр. Берут пипеткой 2-10 мл фильтрата (в зависимости от содержания аммиака, в черноземах 2 мл) в мерную колбу на 50 мл, дистиллированной водой доводят объем до 30 мл, перемешивают. Прибавля-

ют из бюретки 2 мл 30%-ного раствора калия-натрия виннокислого, перемешивают. Прибавляют из бюретки 2 мл реактива Несслера, перемешивают, доводят водой до метки, перемешивают. Колориметрируют на фотоэлектроколориметре в кюветах шириной 30 мм с синим светофильтром (длина волны 400 нм).

Количество аммиака рассчитывают по предварительно составленной калибровочной кривой. Стандартный раствор: 0,1 мг NH_3 в 1 мл воды.

Примечание. Дистиллированную воду необходимо проверять на содержание аммиака. Контроль — предварительно стерилизованная сухим жаром почва при 180°C в течение 3 часов.

Активность уреазы выражается в миллиграммах NH_3 на 10 г почвы в сутки:

$$\text{NH}_3 = (a - b) \cdot p \cdot 10 / n$$

где a — количество аммиака по графику, мг; b — количество аммиака в контроле по графику, мг; n — навеска воздушно-сухой почвы, г; p — разведение.

РЕАКТИВЫ: 1) 3%-ный раствор мочевины; 2) 1 н. раствор KCl: 74,5 г хлористого калия растворить в дистиллированной воде и довести до 1 л; 3) 30% раствор сегнетовой соли; 4) реактив Несслера; 5) стандартный раствор NH_4Cl в концентрации 0,005 мг N - NH_3 в 1 мл.

6.1.11. ФОСФОГИДРОЛАЗЫ

Фосфогидролазы — это большая группа ферментов, катализирующих гидролиз разнообразных фосфорорганических соединений по фосфоэфирным связям. В почве обнаружены различные фосфогидролазы: 1) кислые и щелочные фосфатазы, гидролизующие моноэфиры фосфорной кислоты (глицерофосфаты, сахарофосфаты и др.); 2) фитазы — специфические ферменты, отщепляющие остатки фосфорной кислоты от фитина; 3) нуклеазы (дезоксирибонуклеазы, рибонуклеазы). Последние катализуют реакции деполимеризации нуклеиновых кислот.

Фосфорорганические соединения составляют важную часть фосфора в почве (от 20 до 80 %) и представлены нуклеиновыми соединениями, производными инозитфосфорной кислоты, фосфогуминовыми комплексами и, незначительно, подвижными сахарофосфатами, глицерофосфатами. Фосфорорганические соединения почвы превращаются в доступное для растений состояние при ферментативном гидролизе с отщеплением остатков фосфорной кислоты. Активность фосфогидролитических ферментов характеризует активность биохимических процессов мобилизации органического фосфора почвы.

6.1.12. ФОСФАТАЗА

(фосфогидролазы моноэфиров ортофосфорной кислоты. КФ 3.1.3.1-2)

При определении фосфатазной активности в качестве субстрата используют различные моноэфиры фосфорной кислоты. Наиболее широко применяют водорастворимые соли фенолфталеинфосфата, фенилфосфата, глицерофосфата, α - или β -нафтилфосфата и п-нитрофенилфосфата. При их ферментативном гидролизе выделяются минеральный фосфор и органический радикал субстрата.

Методы определения фосфатазной активности почвы основаны на количественном учете неорганического фосфора (молибденово-кислым аммонием или др.) или спиртовой части гидролизованного субстрата.

Метод А.Ш. Галстяна и Э.А. Арутюнян (1966)

ХОД АНАЛИЗА. 1 г воздушно-сухой почвы помещают в колбу емкостью 50 мл, добавляют 1 мл воды, прибавляют 1 мл 1%-ного раствора фенолфталеинфосфата натрия, 1-2 капли толуола. Колбу закрывают корковой пробкой, встряхивают и ставят в термостат на 1 ч. при 30°C. После инкубации прибавляют 45 мл воды, 2 мл 10%-ного NH_4OH , взбалтывают и фильтруют через плотный фильтр. Окрашенный в розовый цвет фильтрат колориметрируют на ФЭК с синим светофильтром. В случае мутной вытяжки для просветления раствора перед аммиаком в колбу добавляют 1 мл насыщенного раствора алюмокалиевых квасцов. Контролем служит стерилизованная почва (180°C, 3 ч.) и субстрат без почвы. Количество образующегося фенолфталеина находят по калибровочной кривой, составленной с различными концентрациями спиртового раствора фенолфталеина. Найденный в фильтрате фенолфталеин пересчитывают на отщепленный фосфор. При этом исходят из того, что в фенолфталеинфосфате одна молекула фенолфталеина связана с двумя молекулами фосфорной кислоты.

Активность фосфатазы выражают в миллиграммах P_2O_5 на 100 г почвы за 1 ч.

РЕАКТИВЫ: 1%-ный водный раствор фенолфталеинфосфата натрия; 2) 10%-ный NH_4OH ; 3) насыщенный раствор алюмокалиевых квасцов; 4) стандартный раствор фенолфталеина: 0,01 г фенолфталеина растворяют в 60 мл этанола и объем доводят водой до 100 мл (в 1 мл 0,1 мг фенолфталеина). В мерные колбы емкостью 100 мл берут соответствующие количества стандартного раствора (в мл) с содержанием от 0,1 до 2 мг фенолфталеина и окрашивают как описано выше.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ «ДЫХАНИЯ» ПОЧВЫ

В качестве из одного наиболее общих показателей биологической активности почв часто называют дыхание почв — выделение углекислого газа и поглощение кислорода почвой (Мина, 1957; Карпачевский, Кисилева, 1969; Орлов, 1976; Звягинцев, 1978). Основными источниками CO_2 в почве являются жизнедеятельность микроорганизмов и почвенной фауны, дыхание корней, ферментативная активность почв, физико-химические и химические процессы, такие, как разложение карбонатов, переход бикарбонатов в карбонаты и др. Основной вклад в продукцию CO_2 почвой вносят микроорганизмы и корни растений.

Дыхание почв является одним из показателей биологической активности почв. Общая интенсивность дыхания почвы обусловлена всей ее биологической активностью и определяется количеством потребленного кислорода и количеством продуцированного диоксида углерода.

О поглощении почвой кислорода обычно судят по косвенным данным — выделению углекислого газа. Коэффициент дыхания $\text{ДК} = \text{CO}_2 / \text{O}_2$ не всегда равен 1. При недостатке кислорода ДК меньше единицы, а при анаэробных условиях углекислый газ может выделяться без поглощения O_2 .

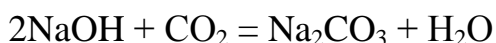
Выделение углекислого газа из почвы отражает интенсивность жизнедеятельности почвенной биоты, скорость минерализации опада и подстилки, и по многочисленным данным прямо пропорционально плодородию почв. “Дыхание” почвы привлекает логической связью с интенсивностью жизненных процессов. Однако “дыхание” почв нельзя принять при рассмотрении типовых (подтиповых...) особенностей почв в качестве независимой переменной, т.к. “дыхание” относится к лабильным современным признакам (Орлов, 1976; Орлов и др, 1979). В то же время “дыхание” в годовом цикле конечно связано с суммарной БА и является очень четким и выразительным показателем измерения скоростей процессов в сезонной динамике, при изменении погодных условий, при загрязнении почв, внесении гербицидов и т.д.

6.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ «ДЫХАНИЯ» ПОЧВЫ В ЛАБОРАТОРИИ ПО ГАЛСТЯНУ

Продуцируемый при дыхании организмов во влажной почве CO_2 поглощается раствором NaOH . Количество NaOH , оставшегося непрореагировавшим после некоторого известного периода времени, определяют титрованием стандартным раствором кислоты. Никакого специального оборудования не требуется.

Высушивание и повторное увлажнение почвы вызывают вспышку биологической активности. В идеале для получения данных, характеризующих микробиологическую активность почвы в поле, берут образец при полевой влажности, подсушивают на воздухе настолько, чтобы пропустить почву через 2-миллиметровое сито (или садовое, если нет упомянутого выше). Можно использовать также воздушно-сухую почву, просеянную через сито с диаметром отверстий менее 2 мм, в нее добавляют воду из расчета 10 г/100 г почвы и хранят в полиэтиленовом пакете в течение одной недели. Пакет не закрывают герметически, а свободно перегибают, чтобы обеспечить доступ воздуха. Каждый день пакет открывают, и содержимое встряхивают для улучшения аэрации.

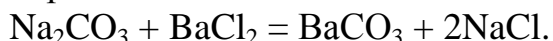
Метод основан на определении интенсивности дыхания почвы по учету количественных изменений углекислого газа в атмосфере почвы с помощью широкогорлых конических колб. Навеску свежей или увлажненной до 60% от ПВ почвы (10 г) помещают в марлевый мешочек. В плоскодонную (желательно широкогорлую) коническую колбу на 250 мл наливают 20 мл 0,1 н. раствора NaOH или KOH. (Также можно использовать 0,1 н. раствор Ba(OH)₂, но только при условии, что Ba(OH)₂ свежий.) Затем в колбу помещают марлевый мешочек с почвой на нитке, которая зажимается между пробкой и горлышком колбы так, чтобы мешочек повис в воздухе. Мешочки должны находиться на одинаковой высоте. Колбу ставят в термостат при температуре 28-30°C на 24 часа. Одновременно с опытными колбами ставят контрольные с NaOH, но без почвы, для учета углекислого газа в колбе. В течение инкубации колбы периодически осторожно встряхивают. Раствор гидроксида натрия поглощает CO₂ с образованием карбоната натрия:



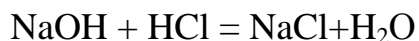
Поглощается все количество CO₂ из колбы. В контрольных колбах CO₂ поглощается из содержащегося в колбе воздуха, в опытных — к нему добавляется CO₂, выделенный почвой, который также поглощается.

После экспозиции избыток NaOH титруют 0,05 н. раствором HCl или H₂SO₄ в присутствии 1-2 капель фенолфталеина до исчезновения розовой окраски.

Смесь растворов Na₂CO₃ и NaOH нельзя непосредственно титровать HCl, потому что с ней реагируют оба вещества. Хлорид бария добавляют в раствор, чтобы осадить карбонат:



Поскольку раствор в колбе остается щелочным до тех пор, пока не будет достигнута конечная точка титрования, карбонат бария не взаимодействует с кислотой. Таким образом, кислота реагирует только с не вступившим в реакцию NaOH:



По разнице между титрованием контроля и опыта определяют количество выделившегося углекислого газа из почвы. Интенсивность продуцирования углекислого газа выражают в мг CO_2 на 100 г почвы за сутки.

РЕАКТИВЫ: 1) 0,1 н. NaOH или KOH; 2) 0,05 н. HCl или H_2SO_4 (желательно приготовленный из фиксанала); 3) спиртовой раствор фенолфталеин.

6.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ «ДЫХАНИЯ» ПОЧВЫ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ ПО КАРПАЧЕВСКОМУ, КИСЕЛЕВОЙ

В пластиковые (стеклянные) стаканчики емкостью 50 мл диаметром 4-6 см (измерить точно для последующего расчета площади поверхности жидкости) аккуратно приливают пипеткой ровно 2 мл 0,2 н. раствора KOH (или 50 мл 0,2 н. раствора KOH в чашки Петри). Стаканчики устанавливают горизонтально на ровную поверхность почвы опытного участка. Отметить время начала опыта. Через 20 мин раствор в стаканчиках оттитровать из микробюретки (можно 5 мл пипеткой) 0,05 н. раствором H_2SO_4 по фенолфталеину.

Расчет углекислого газа (в кг/га) производится по формуле:

$$\text{CO}_2 = (a - b) \cdot n \cdot 60 \cdot 10^8 \cdot 22 / (S \cdot t \cdot 10^6) = (a - b) \cdot n \cdot 6 \cdot 1000 \cdot 22 / S \cdot t$$

где a — количество H_2SO_4 , пошедшее на титрование раствора KOH, мл; b — количество кислоты, пошедшее на титрование раствора KOH после 20 мин. экспозиции, мл; n — нормальность кислоты; S — площадь поглотителя, см^2 ; t — время экспозиции, мин.

Примечание. Метод может быть рекомендован для лесных почв при условии большой повторности. В степных условиях на открытой местности часто определению мешает ветер, который искажает результаты и нивелирует разницу между участками определения. Поэтому в этих условиях рекомендуем применение изолирующего сосуда, в качестве которого в полевых условиях удобно использовать металлическое или пластмассовое ведро. Однако необходимо следить, чтобы в жаркую погоду сосуд не нагревался на Солнце.

РЕАКТИВЫ: 1) 0,2 н. NaOH или KOH; 2) 0,05 н. H_2SO_4 (желательно приготовленный из фиксанала); 3) спиртовой раствор фенолфталеина.

6.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПО РОУЭЛЛУ

Метод близок к методу Галстяна. Различие выражается в том, что почва насыпается на дно колбы, а щелочь в стаканчике повешивается над

ней. Метод удобен при модельных экспериментах в вегетационных сосудах.

ОБОРУДОВАНИЕ. Колбы для измерения интенсивности дыхания. Коническая колба на 250 мл с резиновой пробкой может быть простейшим респирометром (рис. 19). В пробку ввинчивают небольшой крючок, на который с помощью нитки подвешивают стеклянный стаканчик 2 см в диаметре и 8 см длиной так, чтобы он висел свободно, не касаясь стенок и дна.

ХОД АНАЛИЗА. Отвешивают по 50 г влажной почвы в две колбы для измерения интенсивности дыхания. Пипеткой переносят в стаканчик 10 мл 0,3 М NaOH, подвешивают его на пробку и плотно закрывают ею колбу. Чтобы избежать разлива NaOH из стаканчика, выполняют эту операцию, удерживая колбу на столе. Герметизируют пробку липкой лентой. В две контрольные колбы вместо почвы помещают 50 г песка. Замечают время, когда каждая колба была закрыта пробкой. Экспонируют колбы в течение недели в темноте при комнатной температуре или в инкубаторе при требуемой температуре.

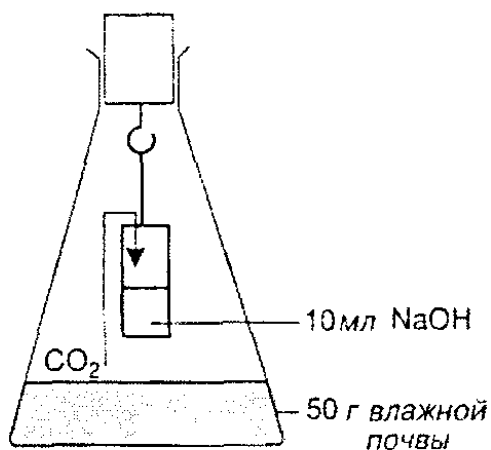
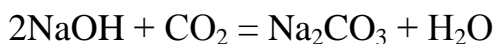


Рис. 19. Простой лабораторный респирометр

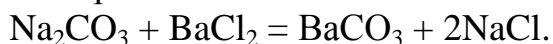
Определяют влажность почвы в момент постановки опыта.

Раствор гидроксида натрия поглощает CO₂ с образованием карбоната натрия:

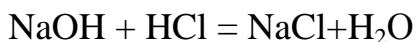


Поглощается все количество CO₂ из колбы. В контрольных колбах CO₂ поглощается из содержащегося в колбе воздуха, в опытных — к нему добавляется CO₂, выделенный почвой, который также поглощается.

Смесь растворов Na_2CO_3 и NaOH нельзя непосредственно титровать HCl , потому что с ней реагируют оба вещества. Хлорид бария добавляют в раствор, чтобы осадить карбонат:



Поскольку раствор в колбе остается щелочным до тех пор, пока не будет достигнута конечная точка титрования, карбонат бария не взаимодействует с кислотой. Таким образом, кислота реагирует только с не вступившим в реакцию NaOH :



Перед проведением измерительного титрования отбирают пипеткой 10 мл раствора 0,3 М NaOH в коническую колбу на 250 мл, приливают около 10 мл воды и пипеткой 10 мл 1 М раствора BaCl_2 . Добавляют каплю-две раствора фенолфталеина и титруют 0,1 М HCl до тех пор, пока красный раствор не станет бесцветным (примерно 30 мл, но часто меньше, поскольку раствор NaOH может поглощать CO_2 при хранении). Этот результат титрования в вычислениях не используют.

С каждой колбы по очереди удаляют липкую ленту, а затем осторожно, чтобы не расплескать раствор, достают пробку с пузырьком. Как и при постановке опыта, держат колбу на столе при вынимании пробки. Количественно переносят раствор NaOH из стаканчика в коническую колбу на 250 мл (споласкивая стаканчик дистиллированной водой в колбу) и титруют, следуя описанной выше процедуре. Записывают объем израсходованной HCl и время, когда стаканчик извлекли из колбы.

РЕАКТИВЫ. 1) Гидроксид натрия примерно 0,3 М. В химическом стакане на 250 мл растворяют 12 г NaOH в дистиллированной воде, охлаждают, переносят в мерную колбу на 1 л и доводят до метки. 2) Соляная кислота 0,1 М. 3) Хлорид бария 1 М. Растворяют 0,1 г $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в небольшом количестве воды и доводят объем до 250 мл. 4) Индикатор фенолфталеин. Растворяют 1 г фенолфталеина в 100 мл этанола.

6.3. АПЛИКАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ

Аппликационные методы используются для определения биологической активности почв, причем отличаются простотой и дают возможность приблизиться к определению интенсивности протекания процессов в природных условиях. Аппликационными методами (лат. applicatio — прикладывание) учитывают клетчаткоразрушающие свойства почвы — ее целлюлазную активность, накопление нингидринположительных веществ, главным образом, свободных аминокислот и белков, а также протеазную (или желатиназную) активность.

Аппликационные методы разработаны и рекомендованы для широкого использования Е.Н. Мишустиним, И.С. Востровым, А.Н. Петровой. Эти методы используются для определения биологической активности почв и исследования ее характеристики в зависимости от применения минеральных и органических удобрений, известкования способов обработки почвы, севооборотов и других факторов.

В почву с растительными остатками поступает значительное количество целлюлозы и почвенные микроорганизмы расщепляют ее.

6.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

Стерильную тонкую суровую льняную ткань (неотбеленную) (можно использовать и другую) пришивают к полимерной пленке или закрепляют на другой основе. Длина и ширина отрезка может варьировать в зависимости от целей исследования. В почве вырывают свежий разрез и к его вертикальной, хорошо зачищенной стенке плотно прижимают полотно. С обратной стороны полиэтилен придавливается почвой, разрез засыпается. Верхняя грань ткани должна быть на 3-5 см погружена в почву. Необходимо ставить 3-5 повторных полотен. Через месяц, а при неблагоприятных условиях для развития микроорганизмов (засуха, низкие температуры) и через более продолжительное время (2-3 мес.) полотна осторожно извлекают, отмывают от почвы и продуктов полураспада, подсушивают и взвешивают. Для определения динамики процесса повторные куски ткани извлекают последовательно через определенные интервалы времени.

Об интенсивности целлюлозоразлагающей активности почв судят по разности весов контрольного неэкспонированного в почве лоскута ткани и одинакового размера лоскутов, вырезанных из извлеченной из почвы полосы ткани; активность выражается в процентах.

6.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ НАКОПЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Метод дает возможность за сравнительно короткий отрезок времени получить представление об интенсивности некоторых процессов, проходящих в почве. Используют такие же полотна ткани, как и в предыдущем методе, но зарывают их на 10 дней (в случае неблагоприятных условий для микробиологической активности — на 30 дней). Подготовку ткани следует проводить таким образом, чтобы на нее не попали аминокислоты и белки с рук (надевать на руки резиновые перчатки). Нужно ставить контрольное

определение и, если на ткани перед опытом обнаруживаются аминокислоты, ее необходимо промыть 70% этиловым спиртом.

Ткань вынимают, просушивают, щеточкой счищают приставшую к ней почву. Затем ткань опрыскивают 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне, высушивают и оставляют в темном месте при комнатной температуре на сутки для более полного проявления окраски. Далее из ткани вырезают квадраты одинаковой площади (5x5 см), помещают в пробирку и заливают 25 мл 70% этанола. После 10-минутного извлечения пробирки встряхивают и экстракт сливают в мерную колбу на 25 мл. Экстракт в колбе доводят спиртом до метки. При очень насыщенной окраске экстрагирование следует повторить новой порцией спирта и соответственно использовать мерную колбу большего объема.

Плотность окраски полученного раствора, определенная на фотоэлектроколориметре, сравнивается с плотностью стандартных растворов. Для получения стандартных растворов раствор большой концентрации какой-либо аминокислоты (например, глицина) наносят на ткань, окрашивают нингидрином, экстрагируют этанолом, а затем путем разбавления получают серию стандартных растворов. Строят стандартную кривую и с ее помощью количество нингидринположительных веществ почвенной спиртовой вытяжки условно выражают в миллиграммах взятой в качестве стандарта аминокислоты. Расчет проводят на 1 см² поверхности ткани.

РЕАКТИВЫ: 1) 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне; 2) 70% этанол.

6.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТОДОМ ФОТОБУМАЖНОЙ АВТОГРАФИИ

Метод определения суммарной протеазной активности почв с помощью заложения в почву засвеченной фотобумаги в качестве аппликационного материала.

Листы засвеченной фотобумаги размером 18x24 прикрепляют желатиновым слоем к почве заостренными деревянными колышками на тщательно выровненную вертикальную поверхность почвенного разреза так, чтобы верхний обрез листа совпадал с нулевой точкой первого горизонта А₀ профиля почвы. Бумагу экранируют полиэтиленовой пленкой, и разрез вновь засыпают почвой.

Через три недели экспозиции фотобумагу осторожно извлекают (при этом отдельные прилипшие комочки почвы остаются на поверхности желатинового слоя), подсушивают на воздухе и промывают водой. При легком покачивании кюветы приставшие комочки почвы отделяются от желатинового слоя. Затем фотобумагу обрабатывают 2 мин в растворе стан-

дартного фенидон-гидрохинонового проявителя, промывают, в течение 15-20 мин выдерживают в растворе закрепителя, вновь промывают и высушивают. На черном фоне проявленной фотобумаги отчетливо различимы белые зоны уничтоженных микроорганизмами желатинового слоя. О протеазной активности почв судят по интенсивности развития зон разрушения желатина на листках фотобумаги. Для этого конфигурацию зон и их расположение переносят на кальку, и зоны разложения желатина на кальке вырезают ножницами. Предварительно на аналитических весах взвешивали всю площадь листа фотобумаги, приуроченной к отдельным почвенным горизонтам, затем вырезанные участки каждого горизонта. На основе этих весовых данных определяют площадь (в %) по отношению к площади листа разрушения желатина каждого почвенного горизонта в изучаемых биогеоценозах.

6.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

Из почвенного образца, просеянного через сито с отверстиями 2 мм, отбирают навеску в 100 г и помещают в стерильную коническую колбу на 250 мл. Почву смачивают до 65% общей влагоемкости, добавляют 0,1 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 0,2 г CaCO_3 , перемешивают, закрывают ватной пробкой, взвешивают и помещают в термостат при 27-28°C на 30 дней. Контролем служит почва без сульфата аммония.

Влажность почвы должна быть постоянной. Для этого каждые семь дней колбы взвешивают и стерильной дистиллированной водой доводят до первоначального уровня.

По окончании опыта содержание нитратов в опытных и контрольных образцах определяют по методу Гранваль-Ляжу или потенциометрически с помощью ионоселективного нитратного электрода.

6.5. СКОРОСТЬ РАЗЛОЖЕНИЯ МОЧЕВИНЫ ПО АРИСТОВСКОЙ, ЧУГУНОВОЙ

Экспресс-метод определения биологической активности почв (Аристовская, Чугунова, 1989) реально является показателем скорости разложения в почве мочевины и должен именно так и называться.

Методика предельно проста и может быть использована при любом уровне оснащения лаборатории, пригодна при проведении массовых анализов и обеспечивает быстрое получение результатов, не требующих пересчетов. Особенно она применима в качестве теста при исследовании воз-

действий на почву различного рода загрязнителей или мелиорантов. Недостатком метода является невысокая чувствительность, связанная с визуальным (субъективным) характером наблюдений.

ХОД АНАЛИЗА: 10-50 г почвы, увлажненной 1 % раствором мочевины до состояния густой пасты, тщательно перемешивается и распределяется по дну чашки Петри. (Хорошие результаты дает использование более концентрированного раствора мочевины). Между поверхностью почвы и крышкой чашки должно оставаться воздушное пространство. К внутренней поверхности крышки прикрепляется полоска фильтровальной бумаги, пропитанная универсальным или другим работающим в широком диапазоне pH индикатором. Опыт проводится при температуре 28-30 °С. Разложение мочевины сопровождается интенсивным образованием летучей щелочи — аммиака, в результате чего воздушная среда над почвой приобретает щелочную реакцию. Цвет индикаторной полоски меняется в соответствии с изменением pH среды. Пользуясь соответствующей колориметрической шкалой, через каждые 15-30 мин. отмечают величину pH и определяют скорость увеличения щелочности воздуха над почвой на 1,0-2,0 единицы, которая является показателем биологической активности почвы. О скорости процесса можно судить либо по времени достижения определенной величины pH, например 9,0, либо по степени изменения pH за единицу времени, например 24 ч. В качестве контроля используются чашки с мочевиной без почвы.

РЕАКТИВЫ: 1) 1-5%-ный раствор мочевины; 2) универсальная индикаторная бумага pH 0-12.

6.6. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВЫ

Под токсичностью почвы принято понимать снижение показателей, снимаемых с тест-объекта на исследуемой почве, по сравнению с контролем. Токсические свойства почвы обусловлены накоплением в ней вредных для живых организмов веществ, будь то сложные органические соединения (например, образуемые микрофлорой фитотоксины), либо простые неорганические вещества (например, тяжелые металлы).

В качестве тест-объекта в зависимости от методики определения токсичности могут использоваться различные живые организмы: микроводоросли, планктонные рачки, высшие растения. Хорошие результаты дает использование семян растений. В качестве испытуемых семян можно брать семена различных растений. Лучшие результаты дают мелкие семена, обладающие небольшим запасом питательных веществ и, следовательно, более подверженные влиянию внешней среды: кресс-салат, редис, гор-

чица, пшеница. Желательно также использовать семена тех культур, которые возделываются на изучаемых почвах.

ХОД АНАЛИЗА. Навеску почвы в количестве 20-60 г помешают в чашку Петри (опыт проводят нестерильно). Почву увлажняют водой до состояния густой пасты и тщательно размазывают по чашке Петри металлическим шпателем до получения ровной поверхности. На поверхность такой пластинки раскладывают от 10 до 50 семян испытуемого растения (в зависимости от размера семян), предварительно замоченных в водопроводной воде в течение суток. Контрольные семена замачивают в воде и раскладывают на увлажненной вате, покрытой фильтровальной бумагой. Семена проращивают 5-7 дней при температуре 25°C и каждый день почву увлажняют равным объемом водопроводной воды. Через каждые сутки отмечают количество проросших семян.

Степень токсичности почвы определяют по разнице ряда показателей в опыте и контроле.

Для всесторонней оценки степени токсичности почвы следует определять: *показатели прорастания семян* (всхожесть, энергия прорастания, дружность прорастания, скорость прорастания) и *показатели интенсивности начального роста семян* (длина корней, длина зеленых проростков, масса корней (воздушно-сухая) (г/100 семян), масса зеленых проростков (воздушно-сухая) (г/100 семян)).

Показатели прорастания:

Всхожесть — число проросших семян, выраженное в % от общего количества семян, взятых для проращивания.

Энергия прорастания — число семян проросших за первые 3-е суток, выраженное в % от общего количества семян, взятых для проращивания.

Дружность прорастания — средний процент семян, проросших за 1 день прорастания:

$$Д = П / А$$

где: Д — дружность прорастания; П — полная всхожесть; А — число дней прорастания.

Скорость прорастания — сумма средних чисел семян, прорастающих ежедневно:

$$С = а + б / 2 + в / 3 + г / 4 + ...$$

где: С — скорость прорастания; а — число семян, проросших за 1-е сутки; б — число семян, проросших за 2-е сутки; в — число семян, проросших за 3-е сутки; г — число семян, проросших за 4-е сутки и т.д.

Кроме показателей прорастания, следует определять **показатели интенсивности начального роста** семян, наиболее полно характеризующие жизнеспособность растений. Между интенсивностью начального рос-

та и продуктивностью растений существует прямая зависимость. К таким показателям относятся *длина зеленых проростков и корней*. Менее трудоемким является определение *массы сырых и (или) сухих зеленых проростков и корней*, выраженной в г или в %, в пересчете на 100 проростков. Каждый из показателей интенсивности начального роста может быть представлен в двух видах: в виде среднего от всех высаженных семян, независимо от всхожести, и в виде среднего от проросших семян.

Показатели интенсивности начального роста семян (особенно, длина или масса корней) являются более информативными, чем показатели прорастания семян (всхожесть, энергия, дружность и скорость прорастания). Последние целесообразно использовать в случае высокой фитотоксичности почвы.

Токсичными считают почвы, вызывающие угнетение прорастания семян на 20-30 % и более.

Определение токсичности почвы рекомендуется проводить на свежих образцах, так как после хранения образцов токсичность их значительно изменяется.

ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМУСОВОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ

Гумусовое состояние почвенного покрова по зонам и ландшафтам крайне разнообразно. В почвах широко варьируют количественные и качественные значения гумусового состояния (табл. 7).

Почвенный гумус отличается типичными характеристиками гидрофильных коллоидов. Он увеличивает водоудерживающую способность почв, так как способен поглощать значительное количество воды. Гумусовые вещества обладают высокой обменной поглотительной способностью. Это уникальное экологическое свойство почвы. Биофильные элементы одновременно и удерживаются коллоидами от вымывания за пределы почвы, и в то же время легко доступны корневым системам растений.

Высокая поглотительная способность гумусовых веществ обеспечивает почвам буферность, т.е. способность противостоять вредному воздействию кислотных и щелочных растворов (в том числе дождей) и поддерживать плодородие почвы на определенном уровне pH.

Гумус — главный и всеобщий критерий бонитировки почв. Это обусловлено рядом причин. Общеизвестна роль гумуса как интегрального показателя плодородия, определяющего запасы азота, частично фосфора, структурность, водно-физические свойства, тепловой режим и т.д. Изучение взаимосвязи общих запасов гумуса в т/га во всей толще гумусовых горизонтов и урожайности сельскохозяйственных культур повсеместно устанавливает высокую коррелятивную зависимость этих характеристик. Помимо запасов органического вещества в профиле почвы учитывается также и толщина (мощность) гумусовых горизонтов. Высокие коэффициенты корреляции между урожайностью и мощностью гумусовых горизонтов — несомненное тому подтверждение.

Гумусовое состояние почв не следует оценивать прямолинейно, однозначно и категорично, полагая, что чем больше в почвах органического вещества, тем выше уровень их эффективного плодородия. К примеру, на орошаемых безгумусных субтропических почвах урожайность зерновых культур может быть намного выше, чем на черноземах. Кроме того, некоторые культуры индифферентны к содержанию гумуса (гречиха), а для других высокое содержание гумуса приводит к потере качества (табак, чай, виноград и др.)

7. Характеристика гумусного состояния почв (Гришина, Орлов, 1978)

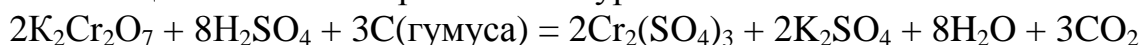
Показатели	Уровень, характер проявления	Градация показателя
Мощность подстилки (для лесных почв), см	очень мощная мощная средней мощности маломощная	>10 5-10 2-5 <5
Отношение запасов органического вещества в подстилке и в минеральном профиле	Распределение: эктоморфное мезоморфное эндоморфное	>1 Около 1 <1
Содержание гумуса в гумусовых (поверхностных) горизонтах, %	Очень высокое Высокое Среднее Низкое Очень низкое	>10 6-10 4-6 2-4 <2
Запас гумуса в слоях 0-20 см (0-100 см), т/га	Очень высокий Высокий Средний Низкий Очень низкий	>200 (>600) 150-200 (400-600) 100-150 (200-400) 50-100 (100-200) <50 (<100)
Профильное распределение гумуса в почвенной толще	Резко убывающее Постепенно убывающее Равномерное Нарастающее Бимодальное	- - - - -
Обогащенность гумуса азота, по отношению C:N	Очень высокая Высокая Средняя Низкая Очень низкая	<5 5-8 8-11 11-14 >14
Степень гумификации органического вещества, $(C_{ГК} \cdot C_{Общ}) \cdot 100\%$	Очень высокая Высокая Средняя Слабая Очень слабая	>40 30-40 20-30 10-20 <10
Тип гумуса, $C_{ГК} \cdot C_{ФК}$	Гуматный Фульватно-гуматный Гуматно-фульватный Фульватный	>2 1-2 0,5-1 <0,5
Содержание «свободных» гуминовых кислот, % к сумме ГК	Очень высокое Высокое Среднее Низкое Очень низкое	>80 60-80 40-60 20-40 <20
Содержание гуминовых кислот, связанных с Ca^{2+} , % к сумме ГК	Очень высокое Высокое Среднее Низкое Очень низкое	>80 60-80 40-60 20-40 <20
Содержание прочносвязанных гуминовых кислот, % к сумме ГК	Высокое Среднее Низкое	>20 10-20 <10
Оптическая плотность гуминовых кислот, $E_{465}^{0,001\%ГК}$	Очень высокая Высокая Средняя Низкая Очень низкая	>0,20 0,10-0,20 0,06-0,10 0,03-0,06 <0,03

7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГУМУСА ПО МЕТОДУ ТЮРИНА В МОДИФИКАЦИИ НИКИТИНА

Принцип метода основан на окислении органического вещества почвы хромовой кислотой до образования углекислоты. Количество кислорода, израсходованное на окисление органического углерода, определяется по разности между количеством хромовой кислоты, взятой для окисления, и количеством ее, оставшимся неизрасходованным после окисления.

В качестве окисления применяют 0,4 н. раствор $K_2Cr_2O_7$ в серной кислоте, предварительно разбавленной водой в соотношении 1:1.

Реакция окисления протекает по уравнению



Количество углерода определяется по изменению цвета хромовой смеси с оранжевого до бурого на фотоколориметре. В случае позеленения окраски раствора либо уменьшают навеску, либо увеличивают количество хромовой смеси.

Метод основан на окислении органического вещества почвы хромовой смесью ($K_2Cr_2O_7$) в сильноокислой среде при нагревании до $150^\circ C$ в сушильном шкафу. Углерод определяется по оптической плотности, измеренной при 590 нм, с последующим сравнением с калибровочным графиком, который строится по стандартному раствору глюкозы.

ПРИМЕЧАНИЕ. Этим методом нельзя определять гумус в почвах, сильно засоленных хлоридами, а также содержащих закисное железо и большое количество марганца (получаются завышенные результаты). Наличие в почве карбонатов не мешает определению гумуса.

Метод определения содержания гумуса по Тюрину дает хорошо воспроизводимые, но систематически заниженные результаты (до 30%) по сравнению с методом сухого сжигания на анализаторе АН 7529 при температуре $950-1000^\circ C$ (Орлов и др., 1996).

Гостированный метод определения содержания гумуса ЦИНАО, применяемый агрохимстанциями, дает в почвах Ставрополя систематически заниженные в 1,32-1,42 раза результаты по сравнению с методом Тюрина (Купречинков, Антонова, Головинов, 2001).

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ К АНАЛИЗУ. Из взятого в поле и доведенного до воздушно-сухого состояния образца взять среднюю пробу почвы 50 г.

Пинцетом тщательно собрать корни и видимые глазом органические остатки, раздавить почвенные комки и вновь тщательно отобрать корешки, используя лупу.

При подготовке почвы к анализу на содержание гумуса особое внимание следует обратить на удаление из почвы корешков и различных ор-

ганических остатков растительного и животного происхождения, которые могут существенно зависить данные.

Растереть почву в агатовой или фарфоровой ступке, среднюю пробу (5 г) пропустить через сито с диаметром отверстий 1 мм и вновь отбирать корешки, используя при этом стеклянную палочку, натертую суконкой или шерстяной тканью.

В процессе отбора корешков надо неоднократно перемешивать почву и вновь распределять ее тонким слоем.

Очищенную от органических остатков почву снова растереть в ступке и пропустить через сито с диаметром отверстий 0,25 мм. Нельзя отбрасывать трудно поддающуюся растиранию часть образца.

ХОД АНАЛИЗА. Из подготовленной почвы на аналитических весах в тарированную пробирку взять навеску по примерному расчету.

Содержание гумуса, %	Навеска почвы, г
> 10	0,1
10-5	0,2
5-1	0,3
1,0-0,5	0,4
< 0,5	0,5

На аналитических или торзионных весах взять навеску почвы 0,1-0,5 г с точностью до четвертого знака в колбы на 100 мл. Прилить из бюретки 20 мл 0,4 н. раствора $K_2Cr_2O_7$, колбы закрыть воронками, осторожно перемешать. Поставить на 20 мин. в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 150°C (время нагревания отсчитывается с момента достижения температуры 150°C). Колбы ставить в удалении от стенок на 3-4 см для обеспечения более равномерного нагрева. По истечении времени колбы вынуть из шкафа, охладить. Раствор над осадком осторожно слить в пробирки и оставить на сутки, после чего колориметрировать в кюветах на 3 см при длине волны 590 нм. Для сравнения в качестве оптического нуля используется раствор «холостой пробы», для чего в шкаф одновременно с опытными колбами поставить колбы с 20 мл хромовой смеси.

Содержимое углерода найти по калибровочному графику.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА. Отвесить на аналитических весах 2,5022 г глюкозы или 2,3771 г сахарозы и растворить в мерной колбе в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл такого раствора содержится 1 мг углерода. В 5 колб на 100 мл прилить последовательно 2,5; 5; 10; 15; 20 мл раствора глюкозы или сахарозы. Выпарить досуха (до 1 капли) сначала осторожно на плитке, затем на водяной бане или сушильном шкафу, прилить 20 мл хромовой смеси. Одновременно готовить «холостую пробу». Все колбы поместить в сушильный шкаф. После сжигания разбавить водой до 50 мл и через сутки колориметрировать. По найден-

ным значениям оптических плотностей и известному содержанию углерода строится калибровочный график.

Содержание углерода (в %) рассчитывают по формуле

$$C = a / n \cdot 100,$$

где a — содержание углерода, найденное по графику, мг; n — навеска почвы, г.

Для перевода данных в содержание гумуса процент углерода необходимо умножить на коэффициент 1,724.

РЕАКТИВЫ: 0,4 н. раствор бихромата калия: 40 г хорошо измельченного двуххромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$) растворить в 600 мл дистиллированной воды, перенести в мерную колбу на 1 л и довести дистиллированной водой до метки. Раствор из мерной колбы перелить в термостойкую колбу на 2 л или фарфоровый стакан на 2 л, прилить 1 л концентрированной серной кислоты ($\rho = 1,84$). Серную кислоту необходимо приливать очень осторожно, небольшими порциями, по 50-100 мл, с перерывами 10-15 мин. Когда вся кислота добавлена, раствор охладить до комнатной температуры и перенести в склянку с притертой стеклянной пробкой.

ВНИМАНИЕ. Готовый раствор является очень сильным окислителем, обугливающий органические вещества, поэтому при работе с ним требуются особые меры предосторожности — необходимо использовать халат, лучше клеенчатый, резиновые перчатки, очки.

7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУППОВОГО ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ГУМУСА ПО ТЮРИНУ В МОДИФИКАЦИИ ПОНОМАРЕВОЙ И ПЛОТНИКОВОЙ

Гумусовые вещества — гетерогенная система органических веществ сложного состава и строения. Поэтому всякая методика разделения гумуса на фракции до известной степени условна.

Несовершенство традиционной методики анализа качественного состава гумуса методом кислотно-щелочной экстракции привело к кризису во взглядах на природу гумусовых кислот. В настоящее время появилась точка зрения, что фульвокислоты (Орлов, 1998), и даже гуминовые кислоты (Радюкина и др., 2001) не существуют в природе как самостоятельные соединения. Д.С. Орлов сомневаясь в наличии фульвокислот как самостоятельного класса соединений, предположил, что они являются лишь частью гуминовых кислот, выявляемых в процессе кислотного гидролиза. Н.Л. Радюкина с соавт. пошли еще дальше. Они считают, что почвенный гумус является смесью неспецифических органических соединений, а гуминовые

и фульвокислоты представляют лишь группы соединений, сходных по поведению в щелочах и кислотах.

В основе изучения качественного состава гумуса лежит методика И.В. Тюрина, в настоящее время известная в нескольких модификациях Пономаревой, Плотниковой и др. Главное отличие модификации состоит в том, что исключена длительная попеременная обработка почвы кислотой и щелочью, которая приводила к частичному гидролизу гуминовых кислот и занимала достаточно длительное время определения.

Принятую в схеме Тюрина попеременную обработку почвы кислотой и щелочью для выделения прочно связанных гумусовых веществ Пономарева и Плотникова заменили однократной обработкой 0,02 н. раствором NaOH при нагревании на водяной бане.

Модифицированная схема включает следующие операции: 1) непосредственную 0,1 н. NaOH - вытяжку; 2) со второй навеской той же почвы декальцирование 0,1 н. H_2SO_4 ; 0,1 н. NaOH - вытяжку; 3) 0,02 н. NaOH - вытяжку при 6-часовом нагревании на водяной бане, определение нерастворимого остатка гумуса.

Подготовка образцов почв. Воздушно-сухие образцы растереть и просеять через сито с диаметром отверстий 1 мм. В процессе работы отделяют неразложившиеся корешки растений, пожнивные остатки.

Примечание. Определение гумуса (органического углерода) должно предшествовать определению его качественного состава, так как величина навески устанавливается исходя из его процентного содержания в почве.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОСКОСМОЛ И БИТУМОВ

Это определение авторы считают необязательным для большинства минеральных почв и рекомендуют при анализе органического вещества торфяных почв и лесных подстилок. С этой целью навески почв (10-20 г) экстрагируются в аппарате Сокслета смесью спирта и бензола (1:1) до полного выделения фракции воскосмол и битумов. Фракция определяется по весу после отгонки органического растворителя на водяной бане и высушивания остатка до постоянного веса при температуре 70-80°C. Содержание углерода в этой фракции принимается равным 72%.

Непосредственная 0,1 н. NaOH - вытяжка № 1.

В эту вытяжку переходят фракции гуминовых кислот — свободных и предположительно связанных с подвижными полуторными окислами.

Ход анализа. Взять в коническую колбу на 300-400 мл навеску почвы от 2,5 до 20 г в зависимости от общего содержания в почве гумуса.

Содержание гумуса, %	Навеска почвы, г
> 10	2,5
10-3	5-10
3-0,5	10-15
< 0,5	20

Прилить цилиндром 200 мл 0,1 н. раствора NaOH, перемешать и оставить на ночь, закрыв колбу корковой пробкой. Прилить пипеткой 50 мл насыщенного раствора Na_2SO_4 для коагуляции илистых частиц, перемешать колбы, оставить на 15-20 мин. Перемешать и отфильтровать через бумажный фильтр диаметром 15-17 см, перенося на фильтр раствор с почвой, добиваясь абсолютной прозрачности фильтрата.

В отдельных порциях вытяжки № 1 провести следующие определения.

Определение органического углерода по Тюрину

Ход анализа. Взять пипеткой 10-50 мл фильтрата в коническую колбу на 100 мл (в зависимости от окраски), прибавить на кончике скальпеля порошок прокаленной пемзы. Содержимое колбы выпарить на кипящей водяной бане.

Примечание. Следует избегать бурного кипения; выпаривать не совсем досуха (во избежание опасности разложения органического вещества при высокой температуре и растрескивания колб).

Провести окончательное досушивание остатка в сушильном шкафу при температуре 80-90°C. Определить содержание органического углерода в сухом остатке по методу Тюрина.

Определение органического углерода бурых гуминовых кислот

Ход анализа. Взять пипеткой 50-100 мл щелочной вытяжки в коническую колбу на 200 мл. Прибавить пипеткой двойное эквивалентное количество 1,0 н. раствора H_2SO_4 (концентрация свободной серной кислоты должна быть в подкисленной вытяжке около 0,05 н. и pH раствора 1,3-2,5; осаждение гуминовых кислот концентрированной серной кислотой недопустимо). Отфильтровать через беззольный фильтр.

Осадок гуминовых кислот в колбе и на фильтре промыть 2-3 раза слабым раствором серной кислоты (0,05-0,1 н. H_2SO_4). Воронку с осадком гуминовых кислот на фильтре вставить в ту же колбу, в которой проводилось осаждение, так как на их стенках всегда остаются частицы гуминовых кислот. На фильтр из промывалки приливать небольшие порции раствора 0,1 н. NaOH. Раствор перенести в мерную колбу на 100 мл щелочным раствором 0,1 н. NaOH и им же довести объем до черты, перемешать. Взять аликвоту для определения углерода гуминовых кислот по методу Тюрина.

Углерод фульвокислот вычисляют по разности между общим углеродом щелочной вытяжки и углеродом гуминовых кислот.

Последовательное выделение различных фракций гумуса

Декальцирование почвы

Ход анализа. Взять навеску почвы так же, как и для щелочной вытяжки, перенести в колбу на 250 мл. Прилить цилиндром 200 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 , периодически перемешивать раствор.

Примечание. При изучении состава гумуса почв с большим содержанием полуторных окислов (подзолистые, бурые лесные и др.) следует брать для декальцирования 0,5 н. раствор H_2SO_4 .

На следующий день вытяжку отфильтровать в колбу на 500-1000 мл через рыхлый фильтр. После того как раствор отфильтрован, в стакан с почвой добавить небольшими порциями 0,1 н. раствор H_2SO_4 , перемешать и продолжать фильтровать декантацией, перенести всю навеску на фильтр и продолжать промывание почвы на фильтре до полного вытеснения кальция. Промыть 2-3 раза водой, слабо подкисленной серной кислотой, для удаления из почвы излишней серной кислоты.

Проба на кальций. В стаканчик на 250 мл набрать свежую порцию промывных вод, нейтрализовать раствор аммиаком (если выпадает осадок полуторных окислов, его отфильтровать). Прибавить 2 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония, оставить на 15 мин. в теплом месте. Полное отсутствие белого осадка щавелевого кальция указывает на полноту осаждения. Пробу на кальций можно делать и трилонометрически.

Сернокислую вытяжку вместе с промывными водами перенести в мерную колбу на 500-1000 мл, довести до метки, перемешать.

Примечание. Анализ вытяжки нельзя делать больше 2-3 дней, так как органические вещества кислой вытяжки подвергаются микробиологическому разложению.

В вытяжке определить общее содержание органического углерода по Тюрину: взять пипеткой 50-100 мл вытяжки (в зависимости от ее окраски) в коническую колбу на 250 мл. Нейтрализовать сухой содой до начала выпадения полуторных окислов. Раствор в колбе выпарить досуха.

Примечание. Для декальцирования навесок карбонатных почв прилить к навеске почвы приблизительно эквивалентное содержанию карбонатов количество 1 н. раствора HCl или если содержание карбонатов неизвестно, то раствор соляной кислоты приливать небольшими порциями при постоянном помешивании до прекращения вскипания.

Прибавить 200-250 мл 0,1 н. HCl и проверить полноту осаждения карбонатов. Концентрация свободной HCl в растворе должна быть близка 0,1 н. На следующий день отфильтровать, промыть сначала 0,1 н. HCl до удаления Ca^{2+} , а затем 0,1 н. раствором H_2SO_4 до удаления хлора.

Наличие в солянокислой вытяжке большого количества ионов хлора, которые окисляются хромовой смесью, мешает определению углерода. Поэтому для приблизительного учета кислоторастворимой фракции органического вещества в почвах, содержащих карбонаты, отдельную навеску почвы залить 0,1 н. раствором H_2SO_4 (200 мл), как описанной выше для некарбонатных почв, и определить в вытяжке органический углерод. В

этом случае навеску почвы на воронке не промывают, и доводить фильтрат до определенного объема не требуется.

Щелочная вытяжка после декальцирования почвы (0,1 н. NaOH - вытяжка № 2).

В эту вытяжку переходят гуминовые и фульвокислоты, извлекаемые щелочью, связанные предположительно с кальцием и растворимые в щелочи только после декальцирования почвы.

Ход анализа. Сразу после декальцирования почв влажные навески тщательно и осторожно смыть с бумажного фильтра в те же колбы 200 мл 0,1 н. раствора NaOH (из промывалки). Эта операция требует большой тщательности и осторожности. Закрывать колбу воронкой диаметром 10-15 см с коротким и широким концом. Остатком щелочи обмыть широкогорлую воронку, вставленную в колбу. Если взятого количества щелочи не хватило на смывание почвы с фильтра, следует добавить в промывалку еще 50 или 100 мл раствора 0,1 н. NaOH и продолжать смывание. Колбу закрыть пробкой или стеклом и оставить на 20-24 ч, периодически встряхивая. Прилить пипеткой 50 мл насыщенного раствора Na_2SO_4 для коагуляции тонких илистых суспензий и ускорения фильтрации, перемешать и оставить на 10-15 мин. для свертывания илистых частиц. Перемешать и сразу отфильтровать через плотно пригнанный к воронке бумажный фильтр, перенося на него раствор вместе с почвой. Остатки почвы в колбе и на воронке промыть 1-2 % раствором Na_2SO_4 до полного или почти полного обесцвечивания промывных вод. Вытяжку вместе с промывными водами довести до определенного объема, перемешать.

В отдельных порциях определить содержание органического углерода и углерода гуминовых кислот по Тюрину, а содержание углерода фульвокислот — по разности между содержанием общего углерода в вытяжке и углерода гуминовых кислот. В той же вытяжке найти индекс оптической плотности гуминовых кислот, определяемый с синим светофильтром. Для определения индекса оптической плотности используется раствор гуминовых кислот в 0,1 н. NaOH с pH 12-13. Измерение проводится на фотоколориметре или спектрофотометре при длине волны 430 нм и толщине слоя раствора 1 см. Результаты выражаются индексом $E_c^{\text{мг/мл}}$, который получают путем деления показателя экстинкции E на содержание в растворе органического углерода (мг/мл).

Щелочная вытяжка при нагревании на водяной бане (0,02 н. NaOH - вытяжка № 3)

В эту вытяжку переходят гуминовые кислоты и фульвокислоты, прочно связанные с глинистыми минералами и устойчивыми формами полоторных окислов.

Ход анализа. Остаток почвы после предыдущей (щелочной) вытяжки в сыром состоянии смыть в ту же колбу на 200 мл подогретым до 70-80° 0,02 н. раствором NaOH. Колбу накрыть часовым стеклом во избежание испарения жидкости и нагревать на кипящей бане 6 ч. Охладить вытяжку до комнатной температуры. Прилить цилиндром 50 мл насыщенного раствора Na₂SO₄. Отфильтровать и промыть остаток почвы на фильтре, как описано в предыдущей вытяжке. Вытяжку вместе с промывными водами довести до определенного объема, перемешать и в ней произвести те же определения, что и в предыдущих щелочных вытяжках.

Определение остатка гумуса

Авторы метода рекомендуют определять углерод остатка по разности между общим содержанием органического углерода в почве и суммой углерода во всех выделенных фракциях гумусовых веществ, кроме углерода непосредственной щелочной вытяжки № 1. Все случайные и систематические ошибки анализа относятся в этом случае за счет негидролизующего остатка

Описанная методика дает возможность определить в составе почвенного гумуса три фракции гуминовых кислот и четыре фракции фульвокислот.

Гуминовые кислоты. Фракция 1 — растворимая непосредственно в 0,1 н. NaOH, свободная и связанная с подвижными полуторными окислами.

Фракция 2 — растворимая в 0,1 н. NaOH только после декальцирования почвы и связанная в основном с кальцием.

Фракция 3 — растворимая в 0,02 н. NaOH при 6-часовом нагревании на водяной бане, с глинистыми минералами и устойчивыми полуторными окислами.

Фульвокислоты. Фракция 1а — растворимая в 0,1 н. H₂SO₄ при декальцировании почвы, свободная и связанная с подвижными полуторными окислами (так называемая «агрессивная» фракция).

Фракция 1 — растворимая непосредственно в 0,1 н. NaOH и связанная в почве с фракцией 1 гуминовых кислот.

Фракция 2 — растворимая в 0,1 н. NaOH только после декальцирования и связанная с фракцией 2 гуминовых кислот.

Фракция 3 — растворимая в 0,02 н. NaOH при 6-часовом нагревании на водяной бане и связанная с фракцией 3 гуминовых кислот.

Количество гуминовых кислот фракций 1 и 3 находят без дополнительных пересчетов, прямо по результатам анализов непосредственной щелочной вытяжки и щелочной вытяжки при нагревании соответственно. Количество гуминовых кислот фракции 2 находят путем вычитания результата анализа непосредственной вытяжки из результата анализа щелоч-

ной вытяжки после декальцирования. Поскольку определения ведут из отдельных навесок почв, то для многих почв, не насыщенных основаниями, эта разность может оказаться отрицательной. Фракция

Фракция 1а фульвокислот соответствует результатам анализа декальцита, фракция 3 — определению содержания ФК в щелочной вытяжке при нагревании. Фракция 1 фульвокислот вычисляется как разность между содержанием ФК в непосредственной щелочной вытяжке и в декальците. Чтобы найти фракцию 2 фульвокислот, суммируют результаты определения ФК в декальците и в щелочной вытяжке после декальцирования и из этой суммы вычитают количество ФК, найденное в непосредственной щелочной вытяжке.

Результаты определения группового и фракционного состава гумуса выражаются в процентах к почве и к общему содержанию органического углерода почвы. Все расчеты ведутся по углероду.

Количество углерода гуминовых кислот и фульвокислот различных групп находят так же, как и количество общего углерода в методе Тюрина. Если вычислять содержание (в % к почве), то

$$C_{\text{гк (фк)}} = \frac{(a - б) \cdot n \cdot 0,003 \cdot 100}{n_1}$$

где а — количество соли Мора, пошедшее на титрование исходного раствора бихромата, мл; б — количество соли Мора, пошедшего на титрование избытка бихромата после окисления гумусовых веществ, мл; n. — нормальность соли Мора; n₁ — навеска почвы, соответствующая объему раствора гумусовых веществ, взятого для определения углерода, т. е. с учетом всех последовательных разбавлений.

Содержание углерода отдельных групп и фракций в процентах к общему содержанию углерода (в %) находят по формуле

$$C_{\text{гк (фк)}} = \frac{(a - б) \cdot n \cdot 0,003 \cdot 100}{n_1 \cdot \%C_{\text{общ}}}$$

Количество гумина (в % к почве) рассчитывается так же, как и общее содержание гумуса, но с поправкой на уменьшение навески в ходе анализа группового состава:

$$C = \frac{(a - б) \cdot n \cdot 0,003 \cdot 100 \cdot v_1}{n \cdot v_2}$$

где n — навеска остатка почвы, взятая для определения гумина, г; v₁ — масса почвы, взятой для группового состава гумуса, v₂ — масса остатка почвы после извлечения растворимых гумусовых веществ, г

Содержание углерода гумина (в % к C_{общ}) находится по формуле

$$C_{\text{г}} = \frac{(a - б) \cdot n \cdot 0,003 \cdot 100 \cdot v_2}{n \cdot v_1 \cdot \%C_{\text{общ}}}$$

Метод определения группового и фракционного состава гумуса имеет существенный недостаток, связанный с использованием двух разных навесок почв. Это приводит к тому, что из многих почв в непосредственную вытяжку переходит больше гуминовых кислот, а предположительно связанных с кальцием оказывается меньше нуля. Это обычно встречается в почвах, не насыщенных основаниями (дерново-подзолистые, красноземы, темно-красные ферралитные). Д.С. Орлов объясняет это следующими причинами: если в почве практически нет гуматов кальция, то согласно методике выход гуминовых кислот должен быть одинаковым как в непосредственную NaOH - вытяжку, так и в вытяжку после декальцирования. Однако обработка почвы кислотой в ходе декальцирования несколько изменяет органическую часть почвы. С одной стороны происходит частичный гидролиз ГК, от которых отщепляются боковые периферические группы, что снижает последующий выход ГК в щелочную вытяжку, с другой — растворяются, гидролизуются и элюируются из почвы такие вещества, как гемицеллюлоза, полипептиды, которые, переходя в непосредственную NaOH - вытяжку, могут затем осаждаться с ГК, особенно в присутствии минеральных коллоидов. Это может привести к кажущемуся увеличению количества ГК фракции 1. Такой эффект обычно бывает в почвах, степень насыщенности основаниями менее 50%.

7.3. УСКОРЕННЫЙ ПИРОФОСФАТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА ГУМУСА ПО КОНОНОВОЙ И БЕЛЬЧИКОВОЙ

Применение пирофосфатного метода позволяет ускорить выделение гумусовых веществ из почвы. В водной и щелочной вытяжках пирофосфаты кальция, железа и алюминия труднорастворимы. При взаимодействии пирофосфата натрия $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ с гуматами кальция и полуторных окислов образуются соединения типа $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, не растворимые в воде, но частично растворимые в избытке пирофосфата с образованием комплексных солей. Поэтому реакция образования гуматов натрия протекает с большой полнотой и выход гуматов при однократной экстракции повышается. В отличие от действия кислот при декальцировании пирофосфат не разрушает несиликатные формы полуторных окислов и не извлекает алюминий и железо из материнских пород. Наибольшее количество гумусовых веществ, по Кононовой, извлекается щелочным раствором пирофосфата натрия с pH около 13. Благодаря этому применение пирофосфата в некоторой степени заменяет декальцирование почвы.

Извлечение из почвы гумусовых веществ производится смесью пирофосфата натрия и NaOH, содержащей в 1 л раствора 44,6 г $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ и 4 г NaOH, где концентрация пирофосфата натрия в таком растворе соответствует 0,1 М и NaOH — 0,1 н. Смесью имеет рН около 13. В ускоренном пирофосфатном методе определения состава гумуса исключен длительный (особенно в случае карбонатных почв) процесс декальцирования почвы. Вместо длительного отмывания используется однократное настаивание почвы со смесью пирофосфата натрия и NaOH без последующего промывания водой, что также значительно сокращает время анализа.

При такой обработке почвы выход гумусовых веществ близок, по данным авторов, к результатам по сокращенной схеме Тюрина (гумусовые вещества, извлекаемые 0,1 н. раствором NaOH из декальцированной почвы, и вещества декальцита). В пирофосфатную вытяжку переходят вещества, свободные и связанные с несиликатными формами железа и алюминия, а также связанные с кальцием. Разграничение этих двух фракций производится путем дополнительного определения гумусовых веществ, извлекаемых из недекальцированной почвы 0,1 н. раствором NaOH.

Ход анализа. На технических весах взять 10 г почвы и перенести в коническую колбу на 250-300 мл. Прилить цилиндром 200 мл свежеприготовленного раствора пирофосфата натрия и закрыть колбу резиновой пробкой для изоляции от углекислого газа. Колбу с раствором оставить на 16-18 ч, перемешивая несколько раз. Прибавить пипеткой 50 мл насыщенного раствора Na_2SO_4 (т.е. в количестве 1/4 объема жидкости) для коагуляции илистых частиц и ускорения фильтрации, оставить на 15-20 мин, перемешать и фильтровать через гладкий бумажный фильтр диаметром 15-17 см, перенося первые порции фильтрата снова на фильтр до тех пор, пока фильтрат не будет прозрачным. Взять пипеткой от 2 до 50 мл фильтрата (в зависимости от интенсивности окраски) для определения общего углерода. Выпарить на этернитовой плитке, под конец досуха — на водяной бане и определить количество углерода по Тюрину, добавляя прокаленную пемзу. Определение ведется в двух повторностях.

Определение содержания гуминовых кислот. Взять пипеткой 20-50 мл пирофосфатной вытяжки в коническую колбу на 100 мл. Прибавить пипеткой соответственно 10 или 25 мл 1,0 н. раствора серной кислоты, доводя рН раствора до 1,3-1,5. Поставить колбу на водяную баню и при 70-80°C нагревать до образования и отстаивания хлопьев гуминовой кислоты. Теплый раствор отфильтровать через небольшой фильтр (белая лента).

Осадок гуминовых кислот в колбе и на фильтрате промыть 2-3 раза от примеси фульвокислот слабым раствором серной кислоты (0,05-0,1 н.). Воронку с осадком гуминовых кислот вставить в ту же колбу, в которой проводилось осаждение. Осадок на фильтре и в колбе растворить из про-

мывалки небольшими порциями горячего раствора 0,1 н. NaOH. Раствор охладить, перенести в мерную колбу на 100 мл, ополаскивая небольшими порциями воды, довести водой до метки, перемешать. Взять пипеткой 5-25 мл фильтрата в коническую колбу для определения углерода гуминовых кислот и определить углерод гуминовых кислот по Тюрину. Углерод фульвокислот вычисляется по разности между общим углеродом щелочной вытяжки и углеродом гуминовых кислот.

Свободные и связанные с подвижными формами R_2O_3 гуминовые кислоты определяются с помощью непосредственной щелочной вытяжки недекальцированной почвы. Ход анализа тот же, что и в методе Пономаревой и Плотниковой.

РЕАКТИВЫ: 1) Пирофосфат натрия с NaOH: 44,6 г $Na_4P_2O_7 \cdot 10 H_2O$ и 4 г NaOH растворить в небольшом количестве дистиллированной воды и довести объем до 1 л; 2) 1,0 н. H_2SO_4 : концентрированной H_2SO_4 ($d=1,84$) на 1 л водного раствора; 3) 0,05 н. NaOH: 2 г NaOH растворить в 1 л дистиллированной воды; 4) хромовая смесь (см. выше).

7.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ В ПОЧВАХ ПО МЕТОДУ ДЮБУА

ХОД АНАЛИЗА. Навеску почвы 30-100 мг помещают в центрифужную пробирку, приливают 1 мл H_2O , 1 мл 5%-ного раствора фенола (водного), 5 мл конц. H_2SO_4 для охлаждения. Затем смесь центрифугируют 10 мин. При 6000 об/мин, надосадочную жидкость сливают в кювету спектрофотометра и снимают спектр в диапазоне 470-500 нм. Находят оптическую плотность и вычисляют содержание углеводов, пользуясь градуировочным графиком, построенным по стандартным растворам глюкозы. Одновременно проводят холостой опыт для проверки реактивов на чистоту.

Согласно принятому методу, в ходе анализа определяют суммарное содержание углеводов почвы, куда входят (легкорастворимые) моносахариды, олиго- и полисахариды, а также углеводы, входящие в состав специфических гумусовых веществ. При добавлении H_2O нерастворимые олиго- и полисахариды, углеводы гумусовых кислот гидролизуются с образованием фурфурола и оксиметилфурфурола, что и позволяет найти указанным методом общее содержание углеводов.

ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ ЩЕЛОЧНО-КИСЛОТНЫХ И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ

8.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ЩЕЛОЧНО-КИСЛОТНЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ

Реакция среды имеет существенное значение для направленности почвенных процессов, в том числе биологических, и уровня почвенного плодородия. Под кислотностью почв понимают способность почвы подкислять почвенный раствор, вследствие наличия в составе почвы кислот (актуальная кислотность), а также обменных катионов водорода, алюминия и некоторых других металлов (потенциальная кислотность). Под щелочностью почв подразумевают способность почвы подщелачивать почвенный раствор, вследствие наличия в составе почвы гидролитически щелочных солей (актуальная щелочность), а также обменного натрия (потенциальная щелочность). Важным показателем устойчивости почвы к воздействию внешних факторов является буферность почв. Под буферностью понимают способность почвы противостоять изменению концентрации почвенного раствора, а, следовательно, и щелочно-кислотного состояния, окислительно-восстановительного состояния и др.

Количественно кислотность может быть выражена в м.-экв. водорода на 100 г почвы и величиной рН. При нейтральной реакции раствора $pH=7$, при кислой $pH<7$, при щелочной $pH>7$.

Для суждения о кислотности почвы определяют рН водного и солевого растворов. Величина рН водного раствора характеризует актуальную, а солевого — потенциальную кислотность почвы. Обычно рН солевой вытяжки ниже рН водной вытяжки.

8.1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ (рН) ПОЧВ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Для определения рН почвы потенциометрическим методом используют стеклянный измерительный электрод и хлорсеребряный электрод сравнения. В зависимости от типа электродов можно работать при температуре от 0 до 100°C. Электрод должен подходить по электрическому сопротивлению к используемому прибору, а при настройке прибора следует знать изопотенциальную точку электрода. Интервал измерения рН от 0 до 12—14. Крутизна характеристики 59,1 мВ на 1 ед. рН.

Рабочей частью стеклянного электрода является стеклянная мембрана. При измерении рН между мембраной и раствором (суспензией) возникает разность потенциалов, которая зависит от активности ионов водорода в растворе. По разности потенциалов на стеклянном электроде и электроде сравнения определяют рН. Приборы откалиброваны в единицах рН и окислительно-восстановительного потенциала (ОВП). Детальное описание и схема устройства их даны в прилагаемой к каждому прибору инструкции.

Для определения рН необходимо: 1) подготовить почву или суспензию для измерения; 2) подготовить прибор для измерения; 3) подготовить электроды для измерения. При подготовке электродов их вымачивают в 0,1 н. HCl 5—7 сут. до установления постоянного потенциала асимметрии. Перед опусканием в суспензию электроды тщательно обмывают дистиллированной водой. При подготовке прибора следует после включения его в сеть и подключения электродов установить изопотенциальную точку, соответствующую электроду, температурную компенсацию, настроить прибор по буферным растворам. рН определяют в почве, суспензии и в различных вытяжках (чаще в водной и в вытяжке 1 н. KCl).

ХОД АНАЛИЗА. 5 г почвы взвешивают на весах с точностью до 0,1 г и переносят в колбу. К навеске прибавляют такое количество воды, чтобы отношение почва : раствор составило 1:2,5 (при определении рН солевой суспензии к почве приливают 1 н. KCl). Колбочку со смесью закрывают пробкой и встряхивают 5 мин на ротаторе. В суспензию помещают стеклянный измерительный электрод и хлорсеребряный электрод сравнения. Измеряют рН на потенциометре. В торфяных почвах и лесных подстилках соотношение почва : раствор 1 : 25.

Подготовка к работе стеклянных электродов для измерения рН. Перед эксплуатацией индикаторный шарик электрода вымачивают 24 ч в 0,1 н. HCl. При настройке прибора проверяют его показания по буферным растворам с рН при 25°C 1,68; 3,86; 4,01; 6,86; 9,18. Прибор настраивают ежедневно перед началом работы.

Подготовка к работе хлорсеребряных вспомогательных электродов типа ЭВЛ-1-М1, ЭВЛ-1-М3. Перед эксплуатацией осторожно удаляют пробку, промывают электрод дистиллированной водой и заливают насыщенным при 20°C раствором KCl. Выдерживают в насыщенном растворе KCl в течение 48 ч. В процессе работы пробка должна быть удалена).

РЕАКТИВЫ: H₂O дистиллированная свежeproкипяченная (рН 7), 1 н. KCl, буферные растворы на рН.

8.1.2. ОЦЕНКА ВЕЛИЧИНЫ pH

Жизнь животных и растений может протекать при pH от 2,5-3 до 10-10,5. За пределами этих концентраций ионов водорода проявление жизни крайне ограничено. Этот же, и даже несколько больший, размах pH встречается в почвах.

При различных pH в почве складываются разные условия (по Валькову с соавт, 2001):

pH 4,0-5,5. Резкокислая реакция среды. Характерна для почв, сильно промытых от извести, калия, бора, серы, цинка, кобальта, йода. Доступность фосфатов, часто экранированных железом, понижена. Железо, алюминий и марганец подвижны и оказывают на многие растения (кроме чая) токсическое воздействие. Деятельность бактерий подавлена, наблюдается повышенная активность грибов. Многие сельскохозяйственные растения нуждаются в изменении реакции среды.

pH 6,0-6,5. Слабокислая реакция среды. Фосфаты находятся в доступном состоянии, токсичность алюминия и марганца понижена или отсутствует, дефицит серы, кальция, калия, бора, кобальта, йода невысокий. Условия минерального и азотного питания близки к оптимальным. Высокий уровень жизнедеятельности микроорганизмов и нитрификационной активности.

pH 6,5-7,5. Нейтральная реакция среды. Благоприятные физические условия, прекрасная оструктуренность, интенсивная микробиологическая деятельность, оптимальные условия фосфорного, азотного и вообще минерального питания, высокий уровень плодородия.

pH 7,5-8,5 (8,7). Слабощелочные условия. Фосфаты, железо, цинк и марганец могут быть в дефиците. Легко возникает антагонизм между обеспеченностью фосфором, цинком и медью. При систематическом применении фосфора возникает цинковая и медная недостаточность. Возможен хлороз растений, чаще в относительно более влажных условиях. Микробиологическая деятельность, нитрификационная способность, условия азотного питания, доступность многих зольных элементов хорошие.

pH 8,5(8,7)-10,0. Сильнощелочные почвы. Щелочность, не отражаясь существенно на полевых культурах, неблагоприятна для деревьев.

pH 10-12. Резкощелочные почвы. Доступность фосфатов понижена, железо и марганец в дефиците, возможен избыток бора. Характеризуются крайне неблагоприятными физическими условиями, обесструктуренностью и подавленной деятельностью микроорганизмов.

Наиболее благоприятной для большинства растений в физиологическом отношении является реакция почвенного раствора, близкая к нейтральной, слабокислой или слабощелочной. Повышенная кислотность или щелочность отрицательно влияет на рост и развитие растений, действуя

негативно физиологически и через снабжение растений питательными веществами. При pH менее 3 и выше 9 повреждается протоплазма клеток в корнях большинства растений. В щелочных условиях при pH выше 8,5 (8,7) возможен дефицит нитратов и фосфатов, избыток легкорастворимых солей, недостаток двухвалентных форм железа и марганца, дефицит меди и цинка. В кислых почвах также мало нитратов из-за подавленной нитрификационной способности, наблюдается связывание фосфатов в недоступные растениям трехвалентные формы железа и алюминия, ощущается недостаток кальция, магния, калия, серы. Кроме этого, избыток подвижных соединений алюминия и марганца оказывает на растения токсическое действие.

В таблице 8 дана сводка требовательности некоторых растений и микроорганизмов к реакции почвенной среды.

8. Значения pH почвы, оптимальные для некоторых растений и микроорганизмов

Растения	pH	Растения	pH
Чайный куст	4,8-6,3	Грибы	3,5-6,0
Картофель	5,3-8,0	Азотобактер	6,8
Пшеница	6,6-7,5-8,5	Нитрификаторы	6,0-8,0
Рис	6,0-8,7	Денитрификаторы	7,0-8,0

8.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ

В почве широко развиты окислительно-восстановительные процессы. Основным окислителем в почве выступает молекулярный кислород почвенного воздуха и почвенного раствора. Поэтому развитие окислительно-восстановительных процессов в почвах тесно связано с условиями их аэрации. Главные условия, определяющие интенсивность и направленность окислительно-восстановительных процессов — состояние увлажнения и аэрации почв, содержание в них органического вещества и температура, при которой протекают биохимические реакции.

Окислительно-восстановительные условия оказывают существенное влияние на направленность и интенсивность трансформации растительных и животных остатков, превращения биофильных элементов и других биохимических процессов. Между окислительно-восстановительными условиями в почве и интенсивностью биологических процессов и свойств существует тесная взаимосвязь и взаимозависимость.

Для количественной характеристика окислительно-восстановительного состояния почвы, так же как в других сред, пользуются определением окислительно-восстановительного потенциала (ОВП).

8.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА (E_h) ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Величина ОВП характеризует преобладание процессов окисления или восстановления, протекающих в почве. Она определяется уравнением:

$$E_{ов} = E_0 + (RT/nF)(\ln[\text{окисл}]/[\text{восст}])$$

где R — универсальная газовая постоянная, Дж; T — абсолютная температура, К; F — число Фарадея, Кл; n — число зарядов, переносимых одной частицей (ионом); $[\text{окисл}]$ и $[\text{восст}]$ — концентрация окислителей и восстановителей дайной системы.

ОВП, определенный по отношению к водороду, называют E_h . Потенциал вычисляют (при 20°C) относительно стандартного электрода (водородный электрод):

$$E_h = 0,029 \lg [H^+]^2/[H_2]$$

При наличии в почве нескольких окислительно-восстановительных систем потенциал приобретает некоторое среднее значение.

Окислительно-восстановительный потенциал определяют в почве (в поле и в лаборатории), в почвенных растворах и в природных водах. Для определения в исследуемый субстрат вставляют измерительный электрод (как правило, платиновый или платинированный, реже графитовый) и электрод сравнения (чаще хлорсеребряный или каломельный). Через определенный промежуток времени по достижении равновесия измеряют на потенциометре E_h в мВ, равное разности потенциалов между измерительным и вспомогательным электродами, и пересчитывают полученные на приборе показания на показания стандартного водородного электрода. При знаке измерительного электрода плюс (+) величина $E_h = E_{всп} +$ отсчет прибора. При знаке измерительного электрода минус (-) величина $E_h = E_{всп} -$ отсчет прибора, где $E_{всп}$ — величина E_h вспомогательного электрода, которая берется для температуры измерения из справочников (потенциал насыщенного каломельного электрода при 20 °C равен 0,247 В, хлорсербряного — 0,201 В).

ХОД АНАЛИЗА. В полевых условиях или модельных опытах плотно вставляют электроды в почву на глубину 5-7 см на расстояние 8-10 см друг от друга. Измерения проводят в середине каждого генетического горизонта. Через 20 мин определяют ОВП по показанию потенциометра (одновременно определяют температуру и pH).

В лабораториях ОВП определяют в образцах почв с ненарушенным сложением, которые берут в цилиндры, применяемые для определения плотности почвы. Длительное нахождение почвы в цилиндрах ведет к изменению первоначального потенциала.

Возможно измерение E_h и в суспензии почв. При этом принимают время установления сорбционного равновесия, равное 5 мин.

Как правило, измерения проводят несколько раз (3-10) и вычисляют среднеарифметическую величину при выбраковке резко отличающихся данных согласно методам вариационной статистики.

Измерительные электроды перед началом работы должны быть проверены по буферным растворам с известным значением ОВП. Применяют смесь 0,1 М растворов красной и желтой кровяных солей в отношении 1 : 1. E_h такой смеси равен +0,36 В. Молекулярная масса $[K_3[Fe(CN)_6]]$ равна 329,26, $[K_4[Fe(CN)_6]]$ — 422,41.

8.2.2. ОЦЕНКА ВЕЛИЧИНЫ E_h

К важным окислительным процессам в почве относится минерализация поступающих в почву органических веществ. Гумификация также в целом процесс окислительный. Избыточное увлажнение и низкие значения ОВП замедляют разложение растительных остатков, способствуют образованию наиболее подвижных и активных форм органических веществ, переходу гуминовых кислот в фульвокислоты. С развитием окислительно-восстановительных процессов связано также превращение соединений азота, серы, фосфора, железа, марганца и других элементов. Большая часть реакций окисления и восстановления этих элементов имеет биохимическую природу и тесным образом связана с микробиологическими процессами в почве. Например, оптимальные условия для нитрификации при $E_h = 350-500$ мВ, при резком падении потенциала развивается денитрификация.

Напряженность окислительно-восстановительных процессов в почвах в определенной мере связана с условиями реакции среды (рН): реакция среды влияет на интенсивность и направленность микробиологических процессов; от нее зависит переход в раствор компонентов некоторых окислительно-восстановительных систем почвы и т.п. Поэтому для получения сравнимых данных по окислительно-восстановительным условиям в средах с различной величиной рН используется показатель rH_2 :

$$rH_2 = E_h/30 + 2pH$$

Таким образом, количественная характеристика окислительно-восстановительного состояния почвы может быть выражена через E_h (в милливольтках) и через условную величину rH_2 . В подзолистых и дерново-

подзолистых почвах нормального увлажнения ОВП (Eh) составляет 550-750 мВ, в черноземах — 400-600 мВ, в сероземах — 350-450 мВ. При $rH_2 > 27$ преобладают окислительные процессы, при $rH_2 < 27$ — восстановительные, при $rH_2 < 20$ — интенсивные восстановительные процессы.

ГЛАВА 9. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Биологические свойства почвы характеризуются высокой степенью варьирования. Поэтому для получения достоверных данных обязательна их тщательная статистическая обработка (см. главу 1.3.6.). Некоторые показатели биоразнообразия, используемые в диагностике и мониторинге, приведены в разделе 6.3.

Как бы тщательно ни выполнялся анализ, какое бы точное современное оборудование ни использовали, результаты никогда не будут абсолютно точными. Они всегда содержат некоторую ошибку.

Ошибки подразделяют на систематические и случайные. **Систематические ошибки** вызываются факторами, действующими одинаковым образом при многократном повторении анализа. Примером такой ошибки может служить взвешивание на весах с помощью гири. Если гиря имеет ошибку в 0,1 г, то результат взвешивания будет всегда заниженным или завышенным на эту величину, как бы мы тщательно ни взвешивали.

Источниками систематических ошибок могут быть дефекты или неисправности измерительной аппаратуры; индивидуальные особенности экспериментатора (субъективные); ошибки, обусловленные методом анализа.

Выявление и анализ систематических ошибок можно провести только на основе тщательного изучения как самого метода определения элемента или вещества, так и всей измерительной аппаратуры.

Случайные ошибки связаны с факторами, претерпевающими незначительные изменения за время опыта (определения, измерения). Например, на результат взвешивания на весах будут влиять многие факторы, в том числе и такие, как колебание чашек весов, изменения в соответствии органов чувств, участвующих в измерении, колебания в освещенности рабочего места и т.д.

Совокупное действие большого числа такого рода факторов приводит к тому, что многократное воспроизведение одного и того же измерения всякий раз дает несколько разных значений. Результат отдельного измерения будет зависимым от случая, т.е. является случайной величиной. Следовательно, и ошибку измерения, вызванную этими факторами, можно рассматривать как случайную величину. При таком подходе влияние случайных ошибок на результат анализа можно количественно оценить при помощи математической статистики. Поэтому случайную ошибку называют также статистической. Она зависит от количества определений $E = 1/n$.

Следовательно, при увеличении повторностей анализа, при увеличении количества параллельных образцов случайная ошибка может составлять сколь угодно малую величину.

Подразделение ошибок на систематические и случайные условно и справедливо для конкретных условий каждого измерения.

Если источник систематической ошибки известен, и устранить его невозможно, то влияние фактора, вызывающего эту ошибку на результат измерений можно оценить статистически. Для этого необходимо, чтобы этот фактор действовал случайным образом.

К систематическим ошибкам относятся погрешности измерительных приборов, которые определяются классом точности прибора. Если на приборе указан класс точности 1, то это означает, что показания прибора правильны с точностью до 1 % от всей действующей шкалы прибора. Иначе говоря, прибор, шкала которого имеет 100 делений, дает ошибку в измерении не более 1 деления. Очевидно, нет никакого смысла брать отсчет менее 1 деления. Приборы характеризуются классом точности в пределах от 0,05 до 4. Более грубые приборы обозначения класса не имеют.

Каждый измерительный прибор, вне зависимости от класса точности, обладает определенным интервалом чувствительности, т.е. наименьшим значением измеряемой величины, которое прибор в состоянии различить. Этот интервал чувствительности ограничивает разрешающую способность прибора.

Грубые ошибки или промахи. Под промахами понимается ошибка, сделанная вследствие неверной записи показаний прибора, неправильно прочитанного отсчета и т.п.

Результаты анализа выражаются количественными данными. Повторные анализы или анализы параллельных образцов дают ряд величин, представляющих собой выборку. В задачу статистической обработки входит:

1) определение основных параметров выборки (средняя арифметическая \bar{x} (M), дисперсия S^2 (σ^2), среднее квадратическое отклонение S (σ), коэффициент вариации V , ошибка средней $S_{\bar{x}}$ (m));

2) соотнесение выборочных параметров с параметрами генеральной совокупности или с некоторой конкретной измеряемой величиной.

Имея некоторую выборку, необходимо произвести следующие вычисления:

Средняя арифметическая $\bar{x} = X/n$,

Дисперсия $s^2 = \sum (X - \bar{x})^2 / (n - 1)$

Среднее квадратическое отклонение $s = \sqrt{\sum (X - \bar{x})^2 / (n - 1)}$

При больших повторностях более 30 проб, величину $n-1$ можно заменить на n .

Следует учесть, что s может приниматься при более или менее нормальном распределении. При больших выборках (более 30 проб), s может применяться независимо от характера реального распределения. В этом случае в границах $x \pm s$ находится примерно 68% генеральной совокупности, в границах $x \pm 2s$ — 95%, а в границах $x \pm 3s$ — 99,7%.

Ошибка средней $s_x = \sqrt{s^2/(n-1)}$.

В границах от $x-2s_x$ до $x+2s_x$ генеральная средняя находится с вероятностью 95%. В границах от $x-3s_x$ до $x+3s_x$ генеральная средняя находится с вероятностью 99,7%.

Для оценки точности полученных данных применяют процент ошибки от средней. Эта величина называется *относительной ошибкой* ($s_x\% = s_x/x \cdot 100\%$). В почвенно-зоологических и микробиологических исследованиях, даже при самых больших повторностях, ошибка средней редко бывает менее 10%. Чаще всего для видов со средним уровнем численности она лежит в пределах 15-40%. Величина 20% для количественной оценки закономерностей распределения почвенных беспозвоночных считается приемлемой. При ошибке 50% и более данные могут использоваться только для ориентировочных оценок, но не для сравнительных анализов.

Коэффициент вариации $V = s/x \cdot 100\%$,

Считается что, если V не превышает 10% — изменчивость незначительна, выше 10 — средняя изменчивость, более 20% — значительная изменчивость.

Приложения

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ИНСТРУКЦИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЧВ

Успех любой экспедиции (полевого выхода) зависит от ее продуманности и проработанности. В исследованиях выделяют несколько этапов.

ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Необходимо продумать маршрут экспедиции, транспорт, определить необходимых набор снаряжения, продуктов и вещей и денег. Необходимо заранее составить план работ. Особое внимание необходимо уделить реальному объему выполняемых работ и роли каждого участника.

Изучение литературных данных, характеризующих район исследований, топографической основы, методик исследований. Особый упор необходим на изучении почвообразующих факторов: климат, включая сезонные особенности; рельеф; особенности растительного и животного мира и т.д.

Подготовка лабораторного оборудования и реактивов:

- приготовление питательных сред;
- стерилизация чашек Петри, пипеток и пробирок,
- обезжиренные предметные стекла для микроскопии;
- подготовка пробирок и колб для определения активности ферментов;
- приготовление химических реактивов для определения дыхания: 0,1 н. раствор КОН, 0,05 н. раствор H_2SO_4 или HCl, спиртовой раствор фенолфталеина,
- подготовка реактивов и оборудования для анализов привезенных образцов.

Подготовка полевого снаряжения:

- штыковая и, особенно при глубоких разрезах желательно совковая, лопаты
- саперная лопата
- прочный нож, лопатка или широкая стамеска
- рюкзак
- клеенчатый метр
- холщовые мешочки или крафт-бумага для образцов
- этикетки
- 10% раствор HCl в пластиковом флаконе с носиком
- простой мягкий карандаш

- полевой дневник
- завязки для мешочков
- оборудование для определения дыхания почв: 4-5 пластиковых стаканчика объемом 50 мл, 5 мл пипетка для кислоты, 2 мл пипетка для щелочи, дистиллированная вода, раствор фенолфталеина
- термометры (лучше Савинова)
- алюминиевые бюксы для определения влажности почвы
- пробирки и пузырьки с пробками для сбора мезофауны
- 70% раствор спирт для фиксации беспозвоночных
- морилка с эфиром
- клеенка для разбора зоологических проб
- пресс с листьями для гербария

ПОЛЕВОЙ ПЕРИОД

- Рекогносцировка.
- Определение мест заложения разрезов.
- Определение полевого дыхания почв.
- Заложение почвенных разрезов, полуям и прикопок.
- Изучение морфологических свойств почв, определение мощности отдельных горизонтов и почвы в целом.
- Измерение температуры воздуха и почвы на разной глубине.
- Отбор почвенных образцов из генетических горизонтов или сплошной колонкой через 10 см.

Изучение флоры и растительности

Визуальная оценка характера растительности и флоры. Составление геоботанического описания. Определение по характеру растительности особенности почвенного покрова (однородность, комплексность, переходы и т.д.) и по видам-индикаторам свойств почвы.

Биомасса общая, надземная, подземная, растительные остатки и характер поступления их в почвообразовательный процесс. Скорость разложения растительных остатков: ежегодный опад, соотношение между ежегодным опадом и процессами минерализации и гумификации, формирование надземных органогенных горизонтов (лесная подстилка, степной войлок и др.).

Изучение фауны

Определение численности и биомассы почвенной мезофауны методом послойных раскопок по всему почвенному профилю (насекомые и их личинки, черви, многоножки) и методом ловушек. Отбор почвенных об-

разцов металлической рамкой или буриком объемом 125 см³ для последующего выделения микроартропод методом эклекторной выгонки (клещи, ногохвостки и др).

КАМЕРАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Растительность и флора

Определение флористического состава по гербариям, собранным в полевых условиях. Определение фитомассы и долевого участия в ней отдельных групп и видов растений. Вещественный и химический состав растительных остатков: целлюлоза, лигнин, сахара, воска, смолы, белки, дубильные соединения, зола и др.

Почвенная альгофлора (водоросли)

Структурный, родовой, видовой состав, общее обилие, распределение по профилю почвы.

Фауна

Разбор собранного материала и идентификация мезофауны с помощью определителей. Эклекторная выгонка микроартропод с последующим определением количественного и качественного состава.

Микробоценозы почв

Количественный и качественный состав микрофлоры.

Определение структуры микробных сообществ по:

- определению скорости радиального роста грибов;
- микробному коэффициенту $K = \frac{\text{бактерии}}{\text{грибы}}$ (прямое микроскопирование) / бактерии (на МПА).

Определение качественного состава микробоценозов по Добровольской с соавторами (2001).

Основные группы почвенных микроорганизмов, выделяемых методом посева:

бактерии:

- сапрофитные (аммонификаторы) на МПА;
- олиготрофы на разбавленном в 100 раз МПА;
- споробразующие на МПА при пастеризации суспензии при 80°C;
- амилолитические на КАА;
- бактерии рода *Azotobacter* на Эшби;
- целлюлозоразлагающие на фильтровальной бумаге;
- *актиномицеты* на КАА, казеин-глицериновом агаре, или среде с пропионатом Na;
- *дрожжи* на кислой среде с дифенилом (0,05-0,01%);

- *грибы* на Чапеке, подкисленном молочной кислотой (4 мл/л);

Биохимические показатели

- дыхание почвы полевое и потенциальное (ПДС);
- коэффициент микробного дыхания = $\frac{\text{дыхание}_{\text{с глюкозой}}}{\text{дыхание}_{\text{с водой}}}$;
- определение микробной массы кинетическим методом;
- интенсивность нитрификации;
- целлюлозолитическая активность;
- накопление свободных аминокислот;
- протеазная активность;
- экспресс-метод Аристовской (уреазная активность).

Ферментативная активность почв

Профильное распределение ферментов в почве.

Оксидоредуктазы:

- каталаза;
- дегидрогеназа;
- ферриредуктаза;
- полифенолоксидаза;
- пероксидаза.

Гидролазы:

- инвертаза;
- фосфатаза;
- уреаз;
- протеаза.

Гумусовое состояние почв

- общий гумус по Никитину или сухим сжиганием на АН 7529;
- запасы гумуса;
- водорастворимый гумус;
- щелочнорастворимый гумус;
- фракционно-групповой состав гумуса;
- оптические свойства гуминовых кислот;
- углеводы.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. НЕКОТОРЫЕ КОЭФФИЦИЕНТЫ — ПОКАЗАТЕЛИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПОЧВЕ

Применение индексов и коэффициентов широко распространено в почвенной микробиологии. Некоторые авторы поддерживают их использование (Андреюк, 1981), другие отрицают их высокую информативность.

- Индекс учитываемости или инертности = численность микробов прямым микроскопированием / численность микробов на питательных средах (Никитин, 1972).
- Индекс педотрофности = численность микробов на почвенном агаре / численность микробов на МПА (Никитин, 1972).
- Индекс олиготрофности = численность микробов разбавленных в 10-100 средах / численность микробов на полноценных средах (Аристовская, 1980).
- Коэффициент минерализации и иммобилизации = численность микроорганизмов на КАА / численность микроорганизмов на МПА (Мишустин, 1956).
- Коэффициент олиготрофности = олиготрофы / общее количество бактерий
- Инвертаза / гумус (Галстян).
- Гидролазы / оксидоредуктазы.
- ПФО / ПО — индекс гумификации.
- Запас энергии в гумусе:
 $Q = 517,2 \cdot \text{запас гумуса}$ (Алиев, 1978)
 $Q = 517,2 \cdot \text{запас гумуса} \cdot C_{\text{гк}}/C_{\text{фк}}$ (Козин, 1990).
- Коэффициент микробиологической активности:
 $KMA = P/M + C/M = 1/M (P + C)$,
где P — общая протеазная активность (мг), C — целлюлазная активность, мг, M — суммарная биомасса микроорганизмов (мг) на 1 см^2 соответствующего почвенного слоя.
- $N-NH_4^+/N-NO_3^-$
широкое отношение показателя характерно для климаксных устойчивых экосистем, а сужение о нарушении природного равновесия (Scujins, Klubek).
- $C_{\text{микробов}}/C_{\text{гумуса}}$, мкг С/г (Благодатская, Ананьева, 1996; Демкина, Ананьева, 1998).
- $C_{\text{микробов}}/C_{\text{роу}}$, мкг С/г, где $роу$ — растворимый в 0,5 н. K_2SO_4 вытяжке органический углерод (Благодатская, Ананьева, 1996; Демкина, Ананьева, 1998).
- Коэффициент микробного дыхания (показатель стресса):

$$Q_R = V_{\text{basal}} / V_{\text{SIR}}$$

где V_{SIR} — субстрат индуцированное дыхание, V_{basal} — нативное дыхание.

Относительный коэффициент микробного дыхания применяют для оценки устойчивости почв. Низкие значения показателя (0,2-0,3) свидетельствуют об отсутствии сильных нарушений в почве (Благодатская, Ананьева, 1996; Демкина, Ананьева, 1998).

- Метаболический коэффициент:

$$Q_{\text{CO}_2} = V_{\text{basal}} / C_{\text{mic}}$$

Углерод микробной биомассы (C_{mic}) рассчитывается по скорости субстрат индуцированного дыхания с использованием коэффициента пересчета 40,04.

Высокие значения $C_{\text{роу}}/C_{\text{mic}}$ при низких значениях V_{sir} могут также как и Q_R , указывать на стрессовое состояние почв

$$Q^1_R = Q_{R \text{ агроценоз}} / Q_{R \text{ целина}}$$

При $Q^1_R < 2$ ценозы оцениваются как слабонарушенные; при $Q^1_R > 2$ — средненарушенные (Благодатская, Ананьева, 1996; Демкина, Ананьева, 1998).

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ШКАЛЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

1. Шкала для оценки степени обогащенности почв микроорганизмами (люминесцентно микроскопический метод) (по Звягинцеву, 1978)

Степень обогащенности почв	Общее количество бактерий		Сухая биомасса бактерий, <i>кг/га</i>	Длина гиф грибов		Сухая биомасса грибов, <i>кг/га</i>
	<i>млрд/г</i>	<i>млрд/см²</i>		<i>м/г</i>	<i>м/см²</i>	
1. Очень бедная	<1	<50	<42	<30	<750	<120
2. Бедная	1-2	50-100	42-85	30-100	750-2500	120-400
3. Средняя обогащенность	2-5	100-200	85-170	100-300	2500-7500	400-1200
4. Богатая	5-10	200-400	170-340	300-1000	7500-25000	1200-4000
5. Очень богатая	>10	>400	>340	>1000	>25000	>4000

2. Шкала для оценки степени обогащенности почв микроорганизмами (метод посева на питательные среды) (по Звягинцеву, 1978)

Степень обогащенности почв	Количество бактерий на МПА		Количество бактерий на средах Эшби, Чапека, КАА	
	<i>млн/г</i>	<i>млн/см²</i>	<i>млн/г</i>	<i>млн/см²</i>
1. Очень бедная	<1	<25	<2	<50
2. Бедная	1-2	25-50	2-4	50-100
3. Средняя обогащенность	2-5	50-125	4-10	100-250
4. Богатая	5-10	125-250	10-20	250-500
5. Очень богатая	>10	>250	>20	>500

4. Шкала для оценки степени обогащенности почв ферментами (расчет на весовые единицы почвы) (по Звягинцеву, 1978)

Степень обогащенности почв	Каталаза, <i>О₂ см³/г за 1 мин</i>	Дегидрогеназа, <i>мг ТФФ на 10 г за 24 часа</i>	Инвертаза, <i>мг глюкозы на 1 г за 24 часа</i>	Уреаза, <i>мг NH₃ на 10 г за 24 часа</i>	Фосфатаза, <i>мг P₂O₅ на 10 г за 24 часа</i>
1. Очень бедная	<1	<1	<5	<3	<0,5
2. Бедная	1-3	1-3	5-15	3-10	0,5-1,5
3. Средняя обогащенность	3-10	3-10	15-50	10-30	1,5-5,0
4. Богатая	10-30	10-30	50-150	30-100	5-15
5. Очень богатая	>30	>30	>150	>100	>15

5. Шкала для оценки степени обогащенности почв ферментами
(расчет на 1 см² поверхности почвы) (по Звягинцеву, 1978)

Степень обогащенности почв	Каталаза, O ₂ см ³ /г за 1 мин	Дегидрогеназа, мг ТФФ на 10 г за 24 часа	Инвертаза, мг глюкозы на 1 г за 24 часа	Уреаза, мг NH ₃ на 10 г за 24 часа	Фосфатаза, мг P ₂ O ₅ на 10 г за 24 часа
1. Очень бедная	<25	<2,5	<125	<7,5	<1,2
2. Бедная	25-75	2,5-7,5	125-375	7,5-25,0	1,2-3,8
3. Средняя обогащенность	75-250	7,5-25	375-1250	25-75	3,8-12,5
4. Богатая	250-750	25-75	1250-3750	75-250	12,5-38,0
5. Очень богатая	>750	>75	>3750	>250	>38

6. Шкала сравнительной оценки биологической активности
почвы (Гапонюк, Малахов, 1985)

Активность	Выделение CO ₂ , мг CO ₂ /10 г почвы	Каталаза, см ³ O ₂ /г за 1 мин	Дегидрогеназа, мг ТФФ на 10 г за 24 часа	Фосфатаза, мг P ₂ O ₅ на 10 г за 24 часа	Уреаза, мг NH ₃ на 10 г за 24 часа	Протеаза, мг альбумина/10 г за 24 часа	Инвертаза, мг глюкозы на 1 г за 24 часа
Очень слабая	0-5	<1	0-3	>0,5	>3	0-0,5	>5
Слабая	5-10	1-3	3-7	0,5-1,5	3-10	0,5-1,0	5-15
Средняя	10-15	3-10	7-15	1,5-5,0	10-30	1-2	15-50
Высокая	15-25	10-30	15-22	5-15	30-100	2-3	50-150
Очень высокая	>25	>30	>22	>15	>100	>3	>150

7. Оценка воздействия загрязняющих веществ на биологическую
активность (Гапонюк, Малахов, 1985)

Период восстановления контролируемого параметра, дни		Оценка последствий
Лабораторные условия	Полевые условия	
15	30	Не оказывает влияния
15-30	30-60	Незначительное влияние, но возможны отрицательные последствия
>30	>60	Существенное влияние, возможны серьезные экологические последствия

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамян С.А. Изменение ферментативной активности почв под влиянием естественных и антропогенных факторов // Почвоведение. 1992. № 7. С.70-82.
2. Агрохимические методы исследования почв. М.: Наука. 1975. 656 с.
3. Андреюк Е.И. Методические аспекты изучения микробных сообществ почвы / Микробные сообщества и их функционирование в почве. Киев: Накова думка, 1981. С. 13-23.
4. Аннотированный перечень аттестованных методик выполнения измерений содержания загрязняющих веществ в объектах окружающей среды. Под ред. Конопелько Л.А. С.-Пб., 1998.
5. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во МГУ. 1970. 488 с.
6. Аристовская Т.Г. Микробиология процессов почвообразования. М.: Наука, 1980. 187 с.
7. Аристовская Т.В., Чугунова М.В. Экспресс-метод определения биологической активности почвы // Почвоведение. 1989. № 11. С. 142-147.
8. Бабьева М.А., Зенова Н.К. Биология почв. М.: Изд-во МГУ, 1989. 336 с.
9. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем / Под ред. Р. Шуберт. М.: Мир, 1988.
10. Бирюкова О.Н., Орлов Д.С. Период биологической активности почв и его связь с групповым составом гумуса // Биологические науки. 1978. №6. С. 119.
11. Благодатская Е.В., Ананьева Н.Д. Оценка устойчивости микробных сообществ в процессе разложения поллютантов в почве // Почвоведение. 1996. №11. С. 1341-1346.
12. Вальков В.Ф. Системно-биологический подход при изучении почв // Научная мысль Кавказа. 1995. № 4. С. 6-10.
13. Вальков В.Ф., Казадаев А.А., Гайдамакина Л.Ф., Паремузова Л.И., Пелипенко О.Ф., Стась А.А., Нечепуренко В.Э. Биологическая характеристика чернозема обыкновенного // Почвоведение. 1989. № 7. С. 67-74.
14. Вальков В.Ф., Казадаев А.А., Креница А.М., Супрун В.А., Суханова В.М., Тациев С.С. Влияние сжигания стерни на биоту чернозема // Почвоведение. 1996. № 12. С. 1517-1522.
15. Вальков В.Ф., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Географические аспекты биологической активности почв Северного Кавказа // Эколого-географический вестник Юга России. 2000. № 1. С.42-49.
16. Вальков В.Ф., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Методология исследования биологической активности почв на примере Северного Кавказа // Научная мысль Кавказа. Изд-во СКНЦ ВШ. 1999. № 1. С. 32-37.
17. Вальков В.Ф., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Очерки о плодородии почв. Ростов н/Д: Изд-во СКНЦ ВШ, 2001. 240 с.

18. Вальков В.Ф., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Почвы юга России: классификация и диагностика. Ростов н/Д: Изд-во СКНЦ ВШ, 2002. 168 с.
19. Вальков В.Ф., Колесников С.И., Казеев К.Ш. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на фитотоксичность чернозема // Агрохимия. 1997а. № 6. С. 50-55.
20. Вальков В.Ф., Колесников С.И., Казеев К.Ш., Тациев С.С. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на микроскопические грибы и *Azotobacter* чернозема обыкновенного // Экология. 1997б. № 5. С. 388-390.
21. Вернадский В.И. Об участии живого вещества в создании почв. / Труды по биогеохимии и геохимии почв. М.: Наука, 1992, с. 282-301.
22. Гаврилюк Ф.Я. Полевые исследования и картирование почв. Ростов-на-Дону. Изд-во РГУ, 1990. 224 с.
23. Гайдамакина Л.Ф. Динамика общей численности и месячная продукция почвенных микроорганизмов на территории Нижне-Донского стационара // Известия СКНЦ ВШ. Естественные науки. 1975, №3, с. 30-33.
24. Галстян А.Ш. Об устойчивости ферментов почв // Почвоведение. 1982. №4. С. 108-110.
25. Галстян А.Ш. Унификация методов исследования активности ферментов почв // Почвоведение. 1978. № 2 С. 107-114.
26. Галстян А.Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван: Айастан, 1974. 275 с.
27. Гапонюк Э.И., Малахов С.В. Комплексная система показателей экологического мониторинга почв // Миграция загрязняющих веществ в почвах и сопредельных средах: Труды 4 Всесоюзного совещания. Обнинск, июнь 1983. Л.: Гидрометеиздат, 1985. С. 3-10.
28. Гельцер Ю.Г. Биологическая диагностика почв. М.: Изд-во МГУ, 1986. 82 с.
29. Гиляров М.С. Диагностика и география почв в свете почвенно-зоологических исследований // Успехи современной биологии. 1949. № 28. Вып.3(6). С. 339-353.
30. Гиляров М.С. Зоологический метод диагностики почв. М.: Наука. 1965. 228 с.
31. Гиляров М.С. Учет крупных почвенных беспозвоночных (мезофауны) // Методы почвенно-зоологических исследований. М. 1975. С. 12-29.
32. Гиляров М.С., Криволуцкий Д.А. Жизнь в почве. Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1995, 240 с.
33. Голербах М.М. , Штина Э.А. Почвенные водоросли. Л.: Наука. Ленингр. отд., 1969, 228 с.
34. Гришина Л.А., Орлов Д.С. Система показателей гумусного состояния почв // Проблемы почвоведения. М., 1978. С. 42-47.
35. Громыко Е.П. Микроорганизмы черноземов СССР // Черноземы СССР. Т. 1. М.: Колос, 1974. 560 с.
36. Даденко Е.В., Казеев К.Ш. Методические аспекты применения ферментативной активности при диагностике антропогенного воздействия / Деграда-

- ция почвенного покрова и проблемы агроландшафтного земледелия. Материалы 1 международной конференции. Ставрополь. 2001. С. 63-65.
37. Демкина Т.С., Ананьева Н.Д. Влияние длительного применения удобрений на дыхательную активность и устойчивость микробных сообществ почвы // Почвоведение. 1998. №11. С. 1382-1389.
 38. Дергачева М.И. Органическое вещество почв: статика и динамика (на примере Западной Сибири). Новосибирск, 1984. 152 с.
 39. Державин Л.М., Фрид А.С., Янишевский Ф.В. О мониторинге плодородия земель сельскохозяйственного назначения // Агрохимия. 1999. № 12. С. 19-30.
 40. Джогман Р.Г.Г., Тер Браак С.Дж.Ф., Ван Торгерен О.Ф.Р. Анализ данных в экологии сообществ и ландшафтов. М.: РАСХН, 1999. 306 с.
 41. Дмитриев Е.А. Математическая статистика в почвоведении. М.: Изд-во МГУ, 1995. 320 с.
 42. Добровольская Т.Г., Лысак Л.В., Звягинцев Д.Г. Почвы и микробное биоразнообразие // Почвоведение. 1996. № 6. С. 699-704.
 43. Добровольская Т.Г., Лысак Л.В., Зенова Г.М., Звягинцев Д.Г. Бактериальное разнообразие почв: оценка методов, возможностей, перспектив // Микробиология. 2001. Т. 70. №2. С. 149-167.
 44. Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. М.: Изд-во МГУ, 1989. 53 с.
 45. Добровольская Т.Г., Чернов И.Ю., Звягинцев Д.Г. О показателях структуры бактериальных сообществ // Микробиологи, 1997. Т.66, №3 с. 408-414.
 46. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1979. 416 с.
 47. Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука, 1968. 268 с.
 48. Заварзин Г.А. Микробная биогеография // Журнал общей биологии. 1994. Т. 55. №1. С. 5-12.
 49. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. М.: Книжный дом «Университет», 2001. 256 с.
 50. Захаров С.А. Курс почвоведения. М., 1931, 550 с.
 51. Звягинцев Д.Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых ее показателей // Почвоведение. 1978. № 6. С. 48-54.
 52. Звягинцев Д.Г. Биология почв и их диагностика // Проблемы и методы биологической диагностики и индикации почв. М.: Наука, 1976.
 53. Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М., Лысак Л.В., Полянская Л.М., Чернов И.Ю. Структурно-функциональная организация микробных сообществ / Экология в России на рубеже XXI века (наземные экосистемы). М.: Научный мир, 1999. С. 147-180.
 54. Звягинцев Д.Г. и др. Разнообразие грибов и актиномицетов и их экологические функции // Почвоведение. 1996. № 6. С. 705-713.
 55. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ, 1987. 256 с.
 56. Звягинцев Д.Г. Успехи и современные проблемы почвенной микробиологии // Почвоведение. 1987. № 10. С. 44-52.

57. Звягинцев Д.Г., Голимбет В.Е. Динамика микробной численности, биомассы и продуктивности микробных сообществ в почвах // Успехи микробиологии. 1983. Вып. 18. С. 215-231.
58. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А., Манучарова Н.А. Практикум по биологии почв. М.: Изд-во МГУ, 2002. 120 с.
59. Зенова Г.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. М.: Изд-во МГУ, 1990. 78 с.
60. Казеев К. Ш., Колесников С.И. Биологическая диагностика почв. Биохимические методы // Методические рекомендации для научно-исследовательской работы студентов. Ростов-на-Дону: РГУ УПЛ. 1998. 23 с.
61. Казеев К. Ш., Колесников С.И. Биологическая диагностика почв. Микробиологические методы // Методические рекомендации для научно-исследовательской работы студентов. Ростов-на-Дону: РГУ УПЛ. 1998. 19 с.
62. Казеев К.Ш. Изменение биологической активности почв предгорий Северо-Западного Кавказа при антропогенном воздействии. Диссертация канд. биол. наук. Краснодар. 1996. 133 с.
63. Казеев К.Ш., Колесников С.И. Применение разных биоиндикаторов в диагностике антропогенных воздействий на почвы юга России // Устойчивость почв к естественным и антропогенным воздействиям. М., 2002. С. 50.
64. Казеев К.Ш., Колесников С.И. Проблемы и перспективы исследования биологии и экологии почв / Экология и биология почв юга России. Ростов н/Д: Изд-во ЦВВР, 2001. С. 4-7.
65. Калакуцкий Л.В., Шарая Л.С., Актиномицеты и высшие растения // Успехи микробиологии, 1990, №24, С. 26-65.
66. Карпачевский Л.О., Кисилева Н.К. О методике определения и некоторых особенностях выделения CO₂ из почв под широколиственно-еловыми лесами // Почвоведение. 1969. № 7. С. 32-42.
67. Кириленко Т.С. Атлас родов почвенных грибов (Ascomycetes и Deiteromycetes). Киев: Наукова думка, 1977, 126 с.
68. Кириленко Т.С. Выделение грибов из почвы / Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка, 1973, с. 175-195.
69. Кириленко Т.С. Определитель почвенных сумчатых грибов. Киев: Наукова думка, 1978, 263 с.
70. Клесов А.А., Березин И.В. Ферментативный катализ. М.: Изд-во МГУ, 1980. Ч. 1. 264 с.
71. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Биоэкологические принципы мониторинга и нормирования загрязнения почв. Ростов-на-Дону: Изд-во ЦВВР, 2001а. 65 с.
72. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Новые принципы экологического нормирования загрязнения почв (на примере тяжелых металлов) // Научная мысль Кавказа. Изд-во СКНЦ ВШ. 2001с. № 4. С. 40-46.

73. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Экологические последствия загрязнения почв тяжелыми металлами. Ростов-на-Дону: Изд-во СКНЦ ВШ, 2000а. 232 с.
74. Колесников С.И., Казеев К.Ш. Оценка и прогноз состояния почвенного покрова и наземных экосистем в целом на основе осуществления почвой экологических функций // Устойчивость почв при антропогенном воздействии. Тезисы докладов Всероссийской конференции. Москва. 2002. С. 49.
75. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Биоэкологические аспекты загрязнения почв тяжелыми металлами // Научная мысль Кавказа. Изд-во СКНЦ ВШ. 2000б. № 4. С. 31-39.
76. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на щелочно-кислотные и окислительно-восстановительные условия в черноземе обыкновенном // Агрохимия. 2001б. № 9. С. 54-59.
77. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на микробную систему чернозема // Почвоведение. 1999. № 4. С. 505-511.
78. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на эколого-биологические свойства чернозема обыкновенного // Экология. 2000с. № 3. С. 193-201.
79. Количественные методы в почвенной зоологии / Ю.Б. Бызова, М.С. Гиляров, В. Дугнер и др. М.: Наука, 1987. 288 с.
80. Контроль химических и биологических параметров окружающей среды. Энциклопедия «Экометрия» / Под ред. Исаева Л.К. СПб.: Эколого-аналитический информационный центр «Союз», 1998.
81. Криволуцкий Д.А. Почвенная фауна в экологическом контроле. М. Наука, 1994, 270 с.
82. Криволуцкий Д.А., Покаржевский А.Д., Сизова М.Г. Почвенная фауна в кадастре животного мира. Ростов-на-Дону. Изд-во РГУ, 1985, 96 с.
83. Купревич В.Ф. Почвенная энзимология // Научные труды. Т. 4. Минск: Наука и Техника. 1974. 404 с.
84. Купревич В.Ф., Щербакова Т.А. Почвенная энзимология. Минск: Наука и Техника. 1966. 275 с.
85. Купречинков М.Т., Антонова Т.Н., Головинов А.А. Оценка методов определения органического вещества почв / Дegrаdация почвенного покрова и проблемы агроландшафтного земледелия. Материалы 1 международной конференции. Ставрополь, 2001. С. 124-125.
86. Кураков А.В. Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем. М.: МАКС Пресс, 2001, 92 с.
87. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. 293 с.
88. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов Л.: Наука, 1967. 303 с.
89. Литвинов М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука, 1969, 124 с.

90. Марфенина О.Е. Микологический мониторинг почв: возможности и перспективы // Почвоведение, 1994, №1, с. 75-80.
91. Методические рекомендации: основные микробиологические и биохимические методы исследования почвы. Л.: ВНИИСХМ, 1987. 47 с.
92. Методы полевых и вегетационных опытов с удобрениями и гербицидами. М., 1967. 183 с.
93. Методы почвенной микробиологии и биохимии // Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ. 1991. 304 с.
94. Микробиологический мониторинг наземных экосистем. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-е, 1991. 222 с.
95. Мина В.Н. Биологическая активность лесных почв // Почвоведение. 1957. №10.
96. Миноранский В.А. Видовое разнообразие фауны понтийских степей и проблемы его сохранения. Методические указания, Ростов-на-Дону, 1998, 42 с.
97. Миркин Б.М., Наумова Л.Г., Соломещ А.И. Современная наука о растительности. М.: Логос, 2001, 264 с.
98. Мирчинк Т.Г. Возможности использования грибов как индикаторов почвенных условий / Биологическая диагностика почв. М., Наука, 1976, с. 155-156.
99. Мишустин Е.Н. Микроорганизмы и плодородие почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1956. 246 с.
100. Мониторинг и методы контроля окружающей среды: Учеб. пособие в двух частях. Часть 1. Общая. Часть 2. Специальная. М.: Изд-во МНЭПУ, 2001.
101. Моргун Л.В. Биохимические показатели почв как индикаторы загрязненности их пестицидами. М.: ВАСХНИЛ, 1990, 49 с.
102. Муравьев А.Г. Оценка экологического состояния природно-антропогенного комплекса: Учебно-методическое пособие. СПб.: «Крисмас+», 2000. 128 с.
103. Муравьев А.Г., Каррыев Б.Б., Ляндсберг А.Р. Оценка экологического состояния почвы. Практическое руководство. СПб.: «Крисмас+», 1999.
104. Никитин Б.А. Методика определения содержания гумуса в почве // Агрохимия. 1972. №3. С. 123-125.
105. Никитин Е.Д. Почва как биокосная полифункциональная система, разнообразие и взаимосвязь почвенных экофункций // Структурно-функциональная роль почвы в биосфере. М.: Геос, 1999. С. 74-81.
106. Омелянский В.Л. Микроорганизмы как химические реактивы. 1924. Научн. хим.-тех. изд-во.
107. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. Т. 1, 2.
108. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во МГУ, 1990. 325 с.
109. Орлов Д.С. Органическое вещество почв России // Почвоведение, 1998. №9. С. 1049-1057.
110. Орлов Д.С., Бирюкова О.Н. Гумусное состояние почв как функция их биологической активности // Почвоведение. 1984. № 8. С. 39-48.

111. Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Садовникова Л.К., Фридланд Е.В. Использование группового состава гумуса и некоторых биохимических показателей для диагностики почв // Почвоведение. 1979. № 4. С.10-22.
112. Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Суханова Н.И. Органическое вещество почв Российской Федерации. М.: Наука, 1996, 256 с.
113. Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по биохимии гумуса. М. 1981. 271 с.
114. Орлов Д.С. О возможности использования некоторых биохимических показателей для диагностики и индикации почв. Проблемы и методы биологической диагностики почв. М.: Наука, 1976. С 4-15.
115. Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Садовникова Л.К., Фридланд Е.В. Использование группового состава гумуса и некоторых биохимических показателей для диагностики почв // Почвоведение, 1979. №4. С.10-22.
116. Орлов Д.С., Садовникова Л.К., Садовников Ю.Н. Углеводы в почвах // Агрохимия. 1975. № 3. С. 139-152.
117. Охрана природы. Почвы. Сборник ГОСТов. М: Издательство стандартов, 2000.
118. Паринкина О.М. Микрофлора тундровых почв. Л.: Наука. 1989. 160 с.
119. Паринкина О.М., Ключева Н.В. Микробиологические аспекты уменьшения естественного плодородия почв при их сельскохозяйственном использовании // Почвоведение, 1995, №5, с. 573-581.
120. Пейве Я.В. Биохимия почв. М. 1961. 422 с.
121. Перечени предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно допустимых количеств (ОДК) химических веществ в почве / Утв. Зам. Главного государственного санитарного врача СССР 19.11.91. № 6229-91. М., 1993. 14 с.
122. Перечень основных действующих методических документов по методам контроля химических веществ в объектах среды, воздухе рабочей зоны, пищевых продуктах и добавках. Минздрав России. М., 1998.
123. Полянская Л.М., Головченко А.В., Звягинцев Д.Г. Определение жизнеспособности спор и мицелия грибов в почве // Микробиология. 1998. Т. 67. №6. С. 832-836.
124. Полянская Л.М., Мирчинк Т.Г., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Изменение структуры комплекса почвенных микромицетов в ходе микробных сукцессий // Микробиология. 1990, Вып. 2, с. 349-354.
125. Пономарева В.В., Плотникова Т.А. Методика и некоторые результаты фракционирования гумуса черноземов // Почвоведение. 1968. № 11. С. 104-117.
126. Почвы СССР: Справочник-определитель / Афанасьева Т.В., Василенко В.И., Терешина Т.В., Шерemet Б.В. Отв. Ред. Г.В. Добровольский. М.: Мысль, 1979. 380 с.
127. Практикум по агрохимии / Под ред. В.Г. Минеева. М.: Изд-во МГУ, 1989. 304 с.
128. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во МГУ, 1976. 307 с.

129. Практикум по почвоведению / Под ред. И.С. Кауричева. М.: Колос, 1986.
130. Практикум по почвоведению с основами геоботаники / А.А. Яскин и др. М.: Колос, 1999. 256 с.
131. Пузаченко Ю.Г. Методологические основы географического прогноза и охраны среды. М.: Изд-во УРАО, 1998. 212 с.
132. Радюкина Н.Л., Софьин А.В., Кудрявцева Н.Н., Карпачевский Л.О., Зубкова Т.А. Современные представления о биохимических процессах в почве. Вестник МГУ. Сер. 17. Почвоведение. 2001. № 2. С. 13-19.
133. РД 52.18.595-96. Федеральный перечень методик выполнения измерений, допущенных к применению при выполнении работ в области мониторинга загрязнения окружающей природной среды / Утв. Росгидрометом 15.10.96 Госстандартом РФ 20.12.96. М., 1997. 48 с.
134. Рис Э., Стенберг М. От клеток к атомам: Иллюстрированное введение в молекулярную биологию. М.: Мир, 1988. 144 с.
135. Роуэлл Д.Л. Почвоведение: Методы и использование. М. Колос, 1998. 486 с.
136. Руководство к практическим занятиям по микробиологии // Под. ред. Н.С. Егорова. М.: МГУ, 1983. 221 с.
137. Санитарные нормы допустимых концентраций химических веществ в почве СанПиН. 42-128-4433-87. М., 1998.
138. Скворцова И.Н. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий рода *Bacillus*. М.: Изд-во МГУ, 1981. 77 с.
139. Стриганова Б.Р. Структура и функции сообществ почвообитающих животных // Структурно-функциональная роль почвы в биосфере. М.: Геос, 1999. С. 135-143.
140. Сэги И. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 296 с.
141. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Агропромиздат, 1987. 239 с.
142. Умаров М.М. Современное состояние и перспективы исследований микробной азотфиксации. Перспективы развития почвенной биологии: Труды всероссийской конф. М.: МАКС Пресс, 2001. С. 47-56.
143. Фомин Г.С., Фомин А.Г. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. Справочник. М.: Изд-во «Протектор», 2001. 304 с.
144. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука. 1990. 189 с.
145. Хазиев Ф.Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М.: Наука. 1982. 203 с.
146. Хазиев Ф.Х. Ферментативная активность почв. М. 1976. 180 с.
147. Химическое загрязнение почв и их охрана: Словарь-справочник / Д.С. Орлов, М.С. Малинина, Г.В. Мотузова, Л.К. Садовникова, Т.А. Соколова. М.: Агропромиздат, 1991. 303 с.
148. Хоружая Т.А. Методы оценки экологической опасности. М.: Экспертное бюро-М, 1998. 224 с.

149. Чернов Ю.И. Основные синэкологические характеристики почвенных беспозвоночных и методы их анализа / Методы почвенно-зоологических исследований. М.: Наука, 1975, с. 160-216.
150. Шугалей В.С., Кесслер Р.М. Ферментология. Ростов н/Д: Изд-во Рост. ун-та, 1986. 93 с.
151. Яковлев А.С. Биологическая диагностика и мониторинг состояния почв // Почвоведение. 2000. № 1. С. 70-79.
152. Burns R.G. Soil enzymology. Sci. Progr., 1977. V. 64. № 254.
153. Gresta J., Olszowskij. The effect of fertilization on the biological activity of the soil of former open casts. Ecol. pol.. V. 22. №2. 1974.
154. Rondon M.R., Goodman R.M., Handelsman J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity // Trend Biotechnol. 1999. V. 17. P. 403-409.
155. Scujins J., Klubek B. Soil biological properties of a mountain forest sere: corroboration of Odum's postulates // Soil Biology and biochemistry. 1982. V. 14. № 5. P. 505-513.

Учебно-научное издание

Казеев Камиль Шагидуллович,
Колесников Сергей Ильич,
Вальков Владимир Федорович

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА И ИНДИКАЦИЯ ПОЧВ:
МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**