МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Факультет физико-математических и естественных наук

Кафедра «Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология
Магистерская программа Ботаника и физиология растений
Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«БИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧВ В АГРОЦЕНОЗЕ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГЕРБИЦИДОВ»

Студент _____ Демехина Ирина Анатольевна

Научный руководитель _____ Карпова Г.А.

Нормоконтролёр _____ Клыченков С.В.

Рецензент _____ Кошеляев В.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 19.05.23 № 12)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично
(протокол заседания ГЭК от 21.06.23 № 2)

Секретарь ГЭК _____ Клыченков С.В.

Пенза, 2023

СОДЕРЖАНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ.....3
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....5
1.1 Почва как биологическая система.....5
1.2 Ассоциативная азотфиксация в био- и агроценозах.....15
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....27
ГЛАВА 3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ В ЛУГОВОМ БИОГЕОЦЕНОЗЕ И АГРОЦЕНОЗЕ ПШЕНИЦЫ.....38
3.1 Подбор микробиологических сред для определения азотфиксирующих микроорганизмов в агроценозе пшеницы и естественном ценозе.....38
3.2 Определение количества микроорганизмов в луговом биогеоценозе и агроценозе пшеницы при использовании гербицидов.....49
3.3 Анализ биологического состояния почв по наличию бактерии рода Azotobacter.....52
3.4 Содержание микробных клеток в естественном ценозе и агроценозе пшеницы под действием гербицидной обработки.....53
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....58

ВВЕДЕНИЕ

Биологическое состояние почвы характеризуется ее активностью, то есть совокупностью процессов, протекающих в данной среде. Способность всех живых организмов почвы осуществлять процессы разложения и синтеза веществ определяется их количественным и качественным составом (бактерий, актиномицетов, дрожжей, простейших, водорослей, червей и др.) и является наиболее существенным показателем почвенного плодородия.

В агроценозах видовое разнообразие и количество микроорганизмов снижается, так как зависит в определенной степени от монокультуры, с которой они находятся в непосредственном взаимодействии.

Большое влияние на биологическое состояние почв в агроценозах оказывают интенсивные технологии возделывания сельскохозяйственных растений. Механическая обработка почвы, искусственное орошение, внесение минеральных удобрений создают неблагоприятные условия для существования почвенного бактериоценоза. Влияние гербицидной обработки растений в период вегетации на биологическое состояние почв в агроценозах мало изучено. С учетом широкого применения средств защиты растений в посевах зерновых культур, исследования в данной области являются актуальными.

Цель исследований – изучение биологического состояния почв в агроценозе озимой пшеницы при обработке растений гербицидами в период вегетации.

Задачи исследований:

- на основе литературных источников изучить совокупность биологических процессов, протекающих в почве, отметив роль ассоциативной азотфиксации в сохранении почвенного плодородия;

- для изучения биологического состояния почв в агроценозе озимой пшеницы и естественном ценозе провести анализ материалов и отбор методов исследования;

- осуществить подбор микробиологических сред для определения

азотфиксирующих микроорганизмов в агроценозе пшеницы и луговом биогеоценозе;

- определить количество микроорганизмов в луговом биогеоценозе и агроценозе пшеницы при использовании гербицидов;

- провести анализ биологического состояния почв по наличию бактерии рода Azotobacter;

- определить содержание микробных клеток в естественном ценозе и агроценозе пшеницы под действием гербицидной обработки.

Научная новизна:

Впервые изучено биологическое состояние почв в агроценозе озимой пшеницы сорта Фотинья при обработке растений гербицидами в период вегетации. Показано, что применение средств защиты растений вызывает снижение количества бактерий в прикорневой зоне растений, которое может быть восстановлено при использовании препарата Альбит.

Практическая значимость:

Результаты проведенных исследований могут служить справочным материалом при разработке технологий возделывания зерновых культур в Пензенской области с целью отбора эффективных и экологически безопасных средств защиты растений.

Методы исследований, представленные в работе, могут быть использованы в образовательном процессе при подготовке бакалавров по направлениям 06.03.01 Биология и 44.03.05 Педагогическое образование.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Почва как биологическая система

Почва играет важную роль в экосистемах, так как является звеном, которое связывает абиотические и биотические факторы биогеоценоза.

Почва состоит из четырех частей (фаз). Твердая фаза состоит из минералов, песка, глины и органических веществ. Жидкая фаза – это почвенный раствор. Вода поступает с грунтовыми водами и атмосферными осадками. Она содержит минеральные и органические вещества. Почвенный раствор – источник питания растений. Продукты функционирования жидкой фазы обновляются в течение суток. Газообразная фаза состоит из воздуха, заполняющего пространство между почвенными комочками. Почвенный воздух состоит из азота, кислорода, углекислого газа. Но отличается от атмосферного воздуха большим содержанием углекислого газа. Живая фаза – это почвенная биота, то есть организмы, которые населяют почву. К почвенной биоте можно отнести бактерии, водоросли, грибы, почвенную микрофауну, простейших, дождевых червей, насекомых [19].

Для поддержания жизни на нашей планете, существует два главных процесса. С помощью процесса фотосинтеза создается органическое вещество высшими растениями. Затем происходит его разложение микроорганизмами в почве.

Биогеоценоз – это система, которая сложилась исторически из биоценоза (биотического сообщества) и биотопа (абиотической среды). То есть, биогеоценоз складывается из живой и неживой частей. Биогеоценоз – это пространственно более определенное понятие, в отличие от экосистемы. Почва является компонентом, который присутствует у всех наземных биогеоценозов. Она является средой жизни или местообитанием почвенных организмов. Для микроорганизмов почва – это система с противоположными условиями. На ее поверхности могут быть одни условия pH, влажности, воздухообмена, наличия каких-либо элементов питания, а внутри почвы – совершенно другие. Особенностью жизни микроорганизмов в почве является

их адсорбция. Микроорганизмы располагаются небольшими колониями, которые обычно разобщены. Взаимодействия между колониями микроорганизмов происходит в отдельных локусах, а не во всей почвенной системе. Еще одной особенностью почвенных микроорганизмов является то, что некоторая часть их имеется в почве в виде цист, спор, вегетативных клеток, то есть в неактивном состоянии. Вместе они составляют пул или микробный запас, который обеспечивает гомеостаз этой системы. Микробный пул поддерживается с помощью непрерывного поступления доступных веществ в виде корневых выделений, также за счет гидролитических ферментов, содержащихся в почвенном гумусе. Любая почва характеризуется определенным запасом микроорганизмов. На то, как они распределены в почве, влияет запас органического вещества. Наибольшее количество микроорганизмов находится в верхних слоях почвы. В глубине их становится меньше, в зависимости от типа почвы. Но в летний период, когда происходит иссушение почвы, наибольшая численность микроорганизмов может быть обнаружена там, где сохраняется влага, то есть на некоторой глубине [6, 14].

На распределение микроорганизмов в почве огромное влияние оказывают корни растений. Они являются источником органических веществ. На поверхности корней находится больше микроорганизмов, чем в окружающем их почвенном слое. Организмы перемещаются в почве активно и пассивно. Простейшие и микроскопические животные перемещаются во влажной среде по почве по заполненным водой капиллярам. Бактерии, которые имеют жгутики, также активно перемещаются, так как обладают таксисами. Таксис – это направленная двигательная реакция в ответ на какой-либо фактор. Хемотаксис – это движение микроорганизмов в ответ на определенный химический раздражитель. Различают положительный хемотаксис и отрицательный хемотаксис. Положительный хемотаксис – движение по градиенту концентрации. Отрицательный хемотаксис – движение против градиента концентрации. Вещества – аттрактанты (сахара, аминокислоты и др.) вызывают положительный хемотаксис. Вещества-репелленты (кислоты, щелочи, спирты)

вызывают отрицательный хемотаксис. Разновидность хемотаксиса зависит также и от абсолютных показателей концентрации вещества. Хлорид натрия отрицательный таксис вызывает в концентрированных растворах, а положительный таксис – в слабом растворе. Пассивно микроорганизмы могут перемещаться с почвенными животными, с корнями растений, с почвенной влагой.

Микроорганизмы, которые живут на поверхности растений, называются эпифитными. Они питаются выделениями листьев. На поверхности корня микроорганизмы образуют микроколонии. Корни выделяют органические кислоты, аминокислоты, различные активные соединения. Покрытая слизистыми выделениями (муцигелем) поверхность корня является пищей для микроорганизмов. Область почвы, которая примыкает к корню, называют ризосферой. В ризосфере микроорганизмов больше, чем в части почвы, не примыкающей к корню. Существует такой термин – «ризосферный эффект». Он выражается в воздействии корня на повышение количества микроорганизмов в ризосфере по сравнению с контролем. Чем больше глубина, где количество микроорганизмов уменьшается, тем выше ризосферный эффект.

Твердая фаза почвы имеет огромное значение для микроорганизмов. В почвенных частицах (на поверхности) находятся питательные вещества (гумус, органические и минеральные коллоидные системы, катионы магния и кальция). Их концентрация в твердой части намного выше, чем в почвенном растворе. Микроорганизмы располагаются на поверхности почвенных частиц. Это имеет огромное значение для их жизнедеятельности. В состав твердой фазы почвы входят в основном минеральные соединения, которые представлены мелкими частицами минералов. Адсорбция клеток на поверхностях этих минералов, предупреждает их вымывание. Такое адсорбированное состояние увеличивает устойчивость микроорганизмов к влиянию различных неблагоприятных факторов, а также способствует тому, что в почве сохраняется стабильность процессов круговорота веществ. Почвенный раствор заполняет капилляры, при этом образуются водные пленки вокруг частиц поч-

вы. Когда все пространства и поры заполнены раствором, кроме пор с защемленным воздухом, то происходит развитие анаэробных процессов. Развитие микроорганизмов происходит при наличии в почве нужного количества влаги и концентрации почвенного раствора. В летний период концентрация увеличивается за счет усиленного испарения влаги с поверхности почвы, а в осенний период – уменьшается.

В почвенный раствор входят органические, минеральные и органоминеральные вещества. Их соотношение меняется по горизонтам и по сезонам года в почвах разных типов. В болотных почвах много органических веществ, в черноземах примерно одинаковое соотношение минеральных и органических веществ, в сероземах и каштановых почвах количество минеральных веществ выше, чем органических. Концентрация органических веществ больше в верхних горизонтах, чем в нижних. Из минеральных веществ меньше всего азота и фосфора. Также огромное значение для развития микроорганизмов, растений и животных в почве имеет то, сколько микроэлементов содержится в почвенном растворе. Например, молибден увеличивает фиксацию азота. Бор стимулирует нитрификацию. Тяжелые металлы (свинец, ртуть) понижают азотфиксацию, а также тормозят развитие микроорганизмов. В почвенном растворе есть органические вещества, оказывающие действие в небольших концентрациях. Это витамины, ауксины, гиббереллины, ферменты, которые вырабатываются микроорганизмами почвы или поступают с корневыми выделениями. В ризосфере их больше всего [22].

В почвенных порах, которые не заполнены водой, имеется почвенный воздух. Содержание воздуха зависит от влажности почвы. Ведь вода и газ являются антагонистами. Почвы регулируют газовый состав атмосферного воздуха [20].

Происходит газообмен между атмосферой и почвой. При этом выделяется углекислый газ и поглощается кислород. Это явление называется «дыхание почвы». Оно происходит как следствие минерализации органических веществ микроорганизмами. Также в почве создаётся возможность для одно-

временного развития анаэробных и аэробных организмов. Выделяемые газы способствуют связи микрозон друг с другом, так как газовая фаза почвы является наиболее подвижной фазой. Существуют внешние факторы, которые не связаны с состоянием почвенных фаз. Но они оказывают большое влияние на развитие почвенных организмов. Таким фактором является температура. В почвах различных экосистем суточная и сезонная температура сильно различается. Например, в пустыне на поверхности почвы температура может быть выше 70 градусов, а амплитуда изменений температуры достигает 50 градусов. А на глубине 20 см снижается до 1 градуса. Сезонные колебания отличаются от суточных тем, что охватывают весь почвенный горизонт. Температура также оказывает влияние на скорость биохимических реакций.

В температурном интервале роста организмов выделяют три зоны (минимальную, оптимальную, максимальную), которые могут сдвигаться из-за других факторов, например из-за влажности. При оптимальной влажности почвенные организмы реагируют на изменение температуры не так, как когда влаги недостаточно или в избытке. Выделяют мезофильные, термофильные, психрофильные, термотолерантные микроорганизмы. Большая часть почвенных микроорганизмов являются мезофилами с оптимальной температурой роста 26-30 градусов. Среди бактерий и актиномицетов существуют термофилы. Их оптимальная температура роста 50-60 градусов. Малая часть бактерий могут развиваться и при температуре выше 80 градусов.

Дрожжи относятся к низкотемпературной группе. Оптимальной температурой для них – 12-15 градусов, а при температуре больше 20 градусов рост их прекращается.

Почва неоднородна. Поэтому для различных почвенных микроорганизмов она является разной средой. Они включают в себя микроорганизмы, которые различаются между собой по функциям и форме. Большинство их сосредоточены в верхних горизонтах почвы, которые богаты органическими веществами. В нижнем почвенном горизонте количество микроорганизмов снижено.

Большое значение для повышения плодородия почвы и урожайности имеют особая группа микроорганизмов-антагонистов. Они вырабатывают биологически активные вещества, которые подавляют развитие патогенной микрофлоры. Аэробные микроорганизмы являются главным поставщиком питательных веществ. Эти бактерии не могут развиваться без кислорода. Питательные вещества поступают при повышении рыхлости почвы, благоприятной температуре, наиболее оптимальной влажности. Как следствие, стимулируется рост растения и происходит увеличение урожайности. Больше всего заселены микроорганизмами плодородные почвы. Численность микроорганизмов зависит от содержания органических веществ. При наблюдении за количеством микроорганизмов в почве их количество уменьшается после минерализации органических веществ. Это связано, скорее всего, с уменьшением питательных веществ. Также численность микроорганизмов уменьшается при высушивании почвы. Более приспособлены к высушиванию микобактерии и актиномицеты. Но даже в условиях сильной засухи, полностью бактерии не вымирают. В почве с нейтральной реакцией или слабощелочной микроорганизмов больше, чем в кислых почвах. То есть на их численность влияет кислотность почвенного раствора. За малый промежуток времени, количество микроорганизмов может изменяться. Это происходит от колебаний влажности, температуры, содержания органических веществ. Также изменение количества микроорганизмов в почве зависит от сезона года, условий климата, растительности и т.д. [17, 21, 26].

Плодородие почвы зависит от сапротрофных микроорганизмов. Без таких микроорганизмов полезные вещества быстро закончатся. Для того, чтобы повысить плодородие почвы, сельскохозяйственные поля обрабатывают и вносят различные органические удобрения. Это приводит к повышению активности полезных микроорганизмов. В почвах с более активнопротекающими процессами господствуют бациллы, которые используют кроме органического, еще и минеральный азот. А в почвах, где процессы минерализации протекают слабо, преобладают спорообразующие микроорга-

низмы, для которых очень важен органический азот. В этом и заключается связь физиологии микроскопических организмов со средой их обитания. Некоторые бактерии защищают растения от фитопатогенов с помощью выделения антибиотических веществ, а также синтезируют стимуляторы роста. Другие же бактерии могут осуществлять денитрификацию. Это приводит к уменьшению количества азота в почве.

В почве находятся корневые системы высших растений, а водоросли развиваются в верхних слоях почвы. Одни организмы живут в почве постоянно, обитая в её порах, другие изменяют сложение почвы, когда проделывают в ней норы и ходы. А некоторые организмы используют почву в качестве места для зимнего покоя. Простейшие обитают в основном водной части почвы. Микроорганизмы образуют колонии, прикрепляясь к поверхности почвенных частиц. Живые организмы, которые обитают в почве, называются почвенные биотой. Для прокариот характерны такие процессы, как анаэробная жизнь, хемосинтез, азотфиксация. В экосистемах прокариоты и грибы выступают как редуценты. Они разлагают отмершие останки живых организмов и превращают их в неорганические, а также в простейшие органические соединения. Все прокариоты являются микроскопическими организмами. Они имеют малые размеры. Так как отношение поверхности к объему очень большое, то интенсивность метаболизма очень высокая [24].

Царство прокариоты делятся на два подцарства: архебактерии и эубактерии. К архебактериям относится метаногенные бактерии. Они превращают продукты брожения (углекислый газ, муравьиную кислоту), которые были образованы иными микроорганизмами, в метан. Тем самым они выполняют в трофической цепи функцию конечного звена. Эубактерии объединяют грамотрицательные и грамположительные бактерии. Грамотрицательные бактерии при использовании окраски микроорганизмов по методу окрашивания по Граму не окрашиваются кристаллическим фиолетовым. А грамположительные бактерии сохраняют фиолетовый цвет и после промывания спиртом. Грамотрицательные бактерии полностью обесцвечиваются. После промыва-

ния растворителя добавляют контрастный краситель. Он окрашивает бактерии в розовый или красный цвет. Это происходит, так как у них имеется внешняя мембрана, которая не даёт проникать внутрь клетки. Представителем грамотрицательных почвенных микроорганизмов являются азоспириллы, азотобактер, агробактерии, клебсиелла и другие. Представителями грамположительных почвенных микроорганизмов являются бациллы, клостридии. Спорообразующие грамположительные бактерии являются обычными обитателями почвы. Они способны образовывать эндоспоры, которые устойчивы к нагреванию, ультрафиолету, радиации. Бациллы – свободноживущие аэробные палочковидные подвижные микроорганизмы [9].

Азотобактер – крупные палочковидные и кокковидные бактерии, способные в результате фиксации азота переводить газообразный азот в форму, которая доступна для растений [4, 12]. Клубеньковые бактерии – подвижные палочки, которые не образуют спор. Они могут внедряться в корни бобовых растений, затем размножаться в их клетках и превращаться в бактероиды (неподвижные палочки). Именно на этой стадии они способны фиксировать азот. Под действием клубеньковых растений ткань корня разрастается, затем образуются клубеньки. Также в почве встречаются анаэробные спорообразующие микроорганизмы палочковидной формы. Они являются возбудителями масляно-кислого брожения. Их споры долго сохраняются даже тогда, когда вегетативные клетки погибают. Выделяют четыре группы спорообразующих анаэробных бактерий:

1.Сульфатредуцирующие бактерии. Они окисляют органические кислоты с использованием сульфатов.

2. Пуринолитические бактерии. Они сбраживают пурины и пирамидины.

3. Клостридии которые разлагают белки в анаэробных условиях. К ним относятся возбудители столбняка, гангрены, ботулизма.

4. Сахаролитические бактерии сбраживают простые углеводы, целлюлозу, крахмал, пектин. Они также способны фиксировать молекулярный азот.

Анаэробные спорообразующие микроорганизмы в почве очень разнообразны. Но выделять и культивировать их достаточно трудно. Они принимают участие в превращениях азота, углерода, серы. Артробактерии участвуют в процессах минерализации органических веществ, происходящих в аэробных условиях. Эти бактерии в основном можно обнаружить в почвах тундры и пустынь. В лесных почвах основную массу составляют грибы, микромицеты. При достаточном увлажнении и недостатке кислорода происходят активные процессы с участием маслянокислых клостридий [8, 23].

Таким образом, все живые организмы в почве взаимодействуют друг с другом. Такие отношения называют пищевой сетью почвы. Происходят сложные процессы при взаимодействии различных групп почвенной биоты. Это приводит к тому, что ускоряется обмен веществ, образуется гумус и увеличивается продуктивность биогеоценозов [29].

Жизнь на поверхности земли зависит от подземной жизни. Больше всего взаимодействуют с почвенными организмами растения. Тесно связано производство сельскохозяйственных культур и качество почвы. Здоровой почвы является устойчивой к изменению климата, также она считается более плодородной. Поэтому культуры, которые выращиваются на здоровых почвах боли урожайны и в них содержится большое количество питательных веществ. Почвенные бактерии играют большую роль в циклах углерода и азота. Они делают эти питательные вещества легкоусвояемыми для растений. Почвенные бактерии увеличивают образование углерода в почве. Это улучшает структуру почв, что тем самым приводит к удержанию влаги и соответственно почва становится более устойчивой к эрозии. Также почвенные биота даёт растениям такие необходимые питательные вещества, как цинк и фосфор. Кроме этого, почвенные микроорганизмы повышают функционирование экосистемы, а также снижают численность вредителей (клещей, насекомых, сорняков, возбудителей болезни у растений). Кроме того, почвенная биота может применяться в производстве лекарственных средств. Например, антибиотиков.

Почвенные бактерии играют ведущую роль в регулировании климата. Это способствует понижению уровня выбросов парниковых газов. В результате использования синтетических удобрений, неправильного управления земельными ресурсами, выбросов метана от содержания сельскохозяйственных животных сельское хозяйство ответственно за 10-12% в год антропогенных выбросов парниковых газов. Почвенная биота улучшает доступ к азоту и углероду. Вследствие этого могут уменьшить спрос сельского хозяйства на синтетические удобрения, которые образуют парниковые газы. Во время использования таких удобрений почвенная биота помогает снизить испаряемость, снижая выбросы парниковых газов, преобразовывая питательные вещества. Активное ведение сельского хозяйства может отрицательно воздействовать на образование почвенных организмов. Удобрения и пестициды оказывают вред почвенным организмом. В частности, хлорид калия, содержит высокую концентрацию хлорида, который убивает почвенную биоту. Также на биоразнообразие почвы оказывают влияние и пестициды. Они могут наносить вред и полезным организмам. Хотя разнообразие почв помогает в борьбе с изменением климата, потепление создаёт противоречивую ситуацию. Это может привести к уменьшению биоразнообразия почв. Избыточное количество углекислого газа в атмосфере увеличивает фотосинтез. Поэтому спрос на питательные вещества становится выше. Тем самым усиливается конкуренция за нужные ресурсы между растениями и почвенными организмами. Кроме того изменения климата вызывает экстремальные условия. То есть происходят лесные пожары, засухи, обильные осадки. А также возникают резкие колебания сезонной температуры и опустынивания. Всё перечисленное влияет негативно на биоразнообразие почвы. Меняется абиотическое и биотическое состояние почвы. Соответственно почвенная биота находится под угрозой. Например, происходит недостаток или переизбыток влаги, уменьшение количества растительности и почвенных питательных веществ. Засоление почв, то есть накопление в почве солей или ионов отрицательно сказывается на состоянии окружающей среды. Оно может возникнуть естест-

венным путём или в результате деятельности человека (чрезмерное использование удобрений и нерациональные методы полива). Высокое количество соли приводит к уменьшению питательных веществ, ухудшает главные жизненные функции почвенных организмов-дыхание и рост. В результате происходит гибель почвенной биоты. Даже если концентрация соли является безопасной для растений, засоление почвы представляет угрозу всему биоразнообразию экосистемы.

Таким образом, почвенные микроорганизмы играют огромную роль в структуре биоценозов. Они непрерывно разлагают органические вещества до минеральных. При этом почва обогащается нужными питательными веществами и улучшаются ее физические свойства. Соответственно, микроорганизмы почвы участвуют в таком процессе, без которого невозможно нормальное существование биоценозов [17, 30].

1.2 Ассоциативная азотфиксация в био- и агроценозах

О том, насколько активно протекают процессы, которые связаны с превращением и с усвоением соединений азота, можно оценить на примере многообразия микробиологических процессов. То есть можно прогнозировать плодородие почвы. В почве находятся анаэробные и аэробные азотфиксирующие микроорганизмы, аммонификаторы и денитрификаторы, азотфиксаторы, связанные с растением симбиотически. Их наличие в почве дает представление о том, что органические соединения превращаются в минеральные, а также об активности азотфиксирующих процессов. В почве образуются минеральные формы азота. Нитратная, нитритная, аммонийная формы азота легко усваиваются растениями и составляют не более 5 % от общего азота. Растения используют азот в виде NO_3 (нитратов) и NH_4 (солей аммония). Аммоний неподвижен в почве. Его называют «долгим» азотом. Он не вымывается, длительное время переходит в нитратную форму и неподвижен в почве. Наличие этих микроорганизмов связано с плодородием почв, то есть с тем, что минеральный азот доступен для растений.

Азот является главным элементом, который входит в состав белков и нуклеиновых кислот живых организмов. Поэтому он имеет огромное значение для жизни. Живые организмы, которые населяют нашу планету, содержат в среднем 15-20 млрд т азота. В 30-сантиметровом слое почвы находится примерно 5-15 т азота [35] .

Определяют следующие этапы в круговороте азота в природе, которые происходят с участием микроорганизмов:

1. Азотфиксация – усвоение атмосферного азота.
2. Аммонификация – процесс разложения содержащих азот органических веществ с выделением аммиака.
3. Нитрификация – микробиологический процесс окисления аммиака до нитритов и нитратов.
4. Денитрификация – процесс восстановления окисленных соединений азота (нитратов и нитритов) до молекулярного азота.

Наиболее изученные микроорганизмы, осуществляющие процесс азотфиксации:

1. Бактерии рода Rhizobium, живущие в симбиозе с бобовыми культурами.
2. Ассоциативные азотфиксирующие бактерии. К ним относятся Clostridium, Azotobacter, Azospirillum, Beijerinckia.
3. Некоторые актиномицеты.

Главной особенностью бактерий, перечисленных выше, является наличие нитрогеназы. Это ферментный комплекс, который является катализатором азотфиксации. Выделено более 46 родов микроорганизмов – активных ассоциативных азотфиксаторов. Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы относятся к родам: Azotobacter, Klebsiella, Arthrobacter, Azospirillum, Acinetobacter, Bacillus, Beijerinckia, Clostridium, Corynebacterium, Enterobacter, Flavobacterium, Mycobacterium, Pseudomonas, Serratia, и др.

Эта группа ассоциативных азотфиксаторов постоянно пополняется по мере того, как изучаются новые микроорганизмы. Также исследуются свой-

ства вышеперечисленных азотфиксаторов, их взаимоотношения с растениями. Наиболее изучены из диазотрофов – Azotobacter, Pseudomonas, Clostridium, Beijerinckia [5, 15, 43] .

В 1904 г немецкий ученый Лоренц Гильтнер обнаружил с помощью метода посева большое содержание микроорганизмов в части почвы, прилегающей к корню травянистых растений. Он предположил, что это явление связано с жизнедеятельностью корней и предложил новое название ризосфера. Этот термин обозначал часть почвы, прилегающую к корням с большой концентрацией микроорганизмов.

В 1926 г российский ученый С.П. Костычев обнаружил в прикорневой зоне табака неклубеньковую азотфиксирующую бактерию – азотобактер. В 1938 г он сделал публикацию о том, какое влияние оказывают на растения микроорганизмы в части почвы, прилегающей к корням. Это была одна из первых работ в области изучения ризосферы. Но исследования по изучению ризосферных микроорганизмов и по взаимодействию с ними растений получили развитие в 20 столетии в 50-70 годах. В 70-80 годы накапливались данные и формировались представления о взаимодействиях микроорганизмов прикорневой зоны и высших растений. Появлялись новые данные о взаимоотношениях почвенных микроорганизмах с растениями.

Органы растений – это особые экологические ниши, которые заселены микроорганизмами. Эти ниши обозначают:

1. Филлосфера – надземные части растения.
2. Филлоплана – поверхность листьев.
3. Ризосфера – узкий слой почвы, прилегающий к корням растений.
4. Ризоплана – поверхность корней растений.
5. Спермосфера – зона, окружающая семя.

Жизнедеятельность микроорганизмов в этих экологических нишах обуславливается выделениями растений в течение жизни. Эти выделения используются микроорганизмами как питательные субстраты. В частности, листья и стебли выделяют органические кислоты и углеводы. Микроорганизмы,

находясь на поверхности органов растений (эпифитное сообщество), внедряются в ткани (эндофитное сообщество). В результате растения являются центром формирования микробных сообществ [31].

Корни растений активно выделяют в окружающую среду различные органические соединения, почвенные микроорганизмы обеспечиваются питательными веществами. Создаются оптимальные условия для их существования в зонах ризопланы и ризосферы. Корневые выделения – это низкомолекулярные органические вещества. Они представляют собой продукты фотосинтеза и метаболизма растений. К ним относятся органические кислоты, сахара, ферменты, витамины, флавоноиды и др. Питание микроорганизмов в ризосфере высших растений обеспечивается за счет не только корневых экссудатов, но и за счет высокополимерной слизи, утраченных частей растения, к которым относятся отмершие участки корня, корневые волоски. Явление более высокой концентрации микроорганизмов в прикорневой зоне вследствие потребления корневых выделений, называется ризосферным эффектом. В ризосфере в больших количествах находятся различные бактерии, микромицеты. Они повышают содержание таких же организмов в почве, которая свободна от корней.

Существует величина R/S. R – rhizosphere (ризосфера). S – soil (почва). Отношение R/S показывает, во сколько раз количество микроорганизмов в ризосфере определенного растения выше количества этих же микроорганизмов в почве. Эта величина для бактерий изменяется от 10 до 100.

Ризосферу населяют грамотрицательные бактерии родов Pseudomonas, Klebsiella, Enterobacter, Azospirillum, грамположительные бактерии родов Streptomycesи др., микроскопические грибы родов Penicillium, Talaromyces и др. Бактерии, которые населяют ризосферу, образуют с корневой системой растений ассоциации. Такие взаимоотношения бактерий с растениями можно охарактеризовать понятиями: ассоциативные взаимоотношения, ассоциативные бактерии, ассоциативный симбиоз. Взаимоотношения ассоциативных бактерий с растениями не приводят к образованию на корнях растений клу-

беньков. Образуются определенные бактериальные соединения, которые способствуют присоединению бактерий к корням [7, 40, 43].

Различают стадии формирования ассоциаций:

1. Перемещение бактерий с помощью хемотаксиса к корням растения.
2. Прикрепление к корням растения.
3. Образование на поверхности корней микроколоний.
4. Проникновение бактерий внутрь корня.
5. Колонизация межклеточного пространства.

Микроколонии, находящиеся на поверхности корней покрыты слизистым слоем полисахаридной природы, который образуется на корнях и корневых волосках – муцигелем. Он защищает колонию от неблагоприятных условий. От качественного и количественного состава корневых выделений зависит то, насколько разнообразно ризосферное микробное сообщество. Этот состав зависит от возраста, вида и условий, в которых выращивается растение, а также от типа почвы, температуры окружающей среды, освещенности, осадков и др. Например, в процессе вегетации можно наблюдать смену бактериального состава ризосферы. На это еще в 50-60 годах 20 века указывали отечественные исследователи. В процессе своего развития у растения изменяется состав корневых выделений, что влияет на ризосферные бактерии. У молодых растений в ризосфере преобладают грамотрицательные бактерии родов Pseudomonas, Azotobacter и др. Эти бактерии по мере того, как растение стареет, сменяются грамположительными бактериями рода Bacillus и бактериями родов Streptomices и Mycobacterium [25].

Таким образом, бактерии, которые питаются корневыми выделениями, меняются на бактерии, образующие гидролитические ферменты, которые разлагают старые корни, корневой опад. Количественное содержание бактерий увеличивается после прорастания семени, затем достигает своего максимума в период цветения. Количество микроорганизмов нарастает в области

верхушечных корней, так как там происходит наибольшее выделение различных органических соединений [42].

Азотфиксация, которая осуществляется ассоциативными микроорганизмами, называется ассоциативной. Этот процесс протекает почти во всех почвах в прикорневой зоне растений различных мест произрастания. Ассоциативная азотфиксация в зоне умеренного климата – 50-150 кг/га молекулярного азота в течение вегетационного периода. Так как ассоциативная азотфиксация широко распространена, были сделаны выводы о том, что она является способом получить доступный азот растениями. При наличии растений показатель азотфиксации выше, чем без них. Причиной этого является то, что корневые выделения служат субстратом для бактерий-азотфиксаторов. Следовательно, были получены новые данные о почвенных бактериях-диазотрофах при исследовании ассоциативной азотфиксации. Связь ассоциативных микроорганизмов с растениями оказалась более тесной, чем считалось ранее, так как бактерии колонизируют корни растений, а также проникают в ткани [13, 15, 28, 45].

Существует два типа механизмов положительного влияния бактерий прикорневой зоны на жизнедеятельность растений:

1. Опосредованная стимуляция роста растения благодаря тому, что подавляется развитие почвенных фитопатогенов. Например, микроскопических грибов.

2. Непосредственная (прямая) стимуляция роста растений благодаря образованию стимуляторов роста. Например, фитогормонов, витаминов.

Ростом и развитием растений управляют фитогормоны. Это вещества, которые вырабатываются в процессе обмена веществ. Также они оказывают в малых количествах регуляторное воздействие и координируют различные физиологические процессы. Поэтому их называют природными регуляторами роста. Гормоны могут передвигаться по растению и регулируют его рост и развитие. Гормоны помогают растению адаптироваться к условиям внешней среды. К ним относятся цитокинины, гиббереллины, ауксины и др. Цито-

кинины влияют положительно на всхожесть семян и на все растение, которое находится в неблагоприятных условиях. Ауксины активизируют развитие корневой системы, то есть являются стимуляторами роста. Гиббереллины влияют на вегетативный рост, стимулируют прорастание семян. Цитокинины, гиббереллины, ауксины необходимы растениям для развития и широко распространены у бактерий ризосферы. Довольно хорошо изучен гормон класса ауксинов – ИУК (индолил3уксусная кислота). ИУК положительно влияет на корневую систему растений (развиваются боковые корни). Это способствует улучшению усвоения питательных веществ растением. Также ускоряется рост растения, формируется устойчивость растения к стрессам. Для того, чтобы образовалась ИУК, ризосферным бактериям надо присутствие в корневых экссудатах L-триптофана. Академик Холодный Н.Г. проводил исследования, которые показали, что рост растений и органов одного и того же растения управляется одним и тем же гормоном. Это ауксин, который значительно распространен в растениях. Особенно много ауксинов в растущих частях растений. Это верхушки стебля, почки, растущие части листьев, семена. Ауксины двигаются от верхушки побега к его основанию, то есть вниз. А затем от основания к окончанию корня. Движение ауксинов идет по проводящим пучкам. Но движение по флоэме медленное, если сравнивать его с движением ассимилятов. Передвижение ауксинов замедляет недостаток кислорода, а также сдерживание такого процесса, как дыхание. При затемнении количество ауксинов увеличивается, а при освещении – уменьшается. Микроорганизмы положительно влияют на образование ауксинов. В процессе онтогенеза содержание ауксинов колеблется. В фазу цветения в листьях достигает своего максимума. Большое содержание ауксинов находится в прорастающих семенах и почках. Ауксины способны образовывать связи с белками. Существует связывающий белок-рецептор, который проявляет активность на поверхности клеток и в эндоплазматическом ретикулуме.

Гиббереллины, как и ауксины являются естественными фитогормонами и обладают большой физиологической активностью. Известно более 80 ве-

ществ, которые относятся к гиббереллинам. Их обозначают ГА 1, ГА 2, ГА 3 и т.д. Самым распространенным гиббереллином считается ГА 3 – гибберелловая кислота. Гиббереллины образуются в основном в растущих частях растения. Но главное место, где синтезируются гиббереллины – листья. Гиббереллины могут связываться с сахарами, в частности, с глюкозой. Затем они накапливаются в семенах. Отличительной особенностью гиббереллинов является то, что они перемещаются из листьев и вниз и верх, а также и по флоэме, и по ксилеме. Внешние условия среды также воздействуют на образование гиббереллинов. Например, при освещении синтез гиббереллинов увеличивается. Содержание гиббереллинов снижается при улучшении азотного питания растительного организма, а образование ауксинов наоборот повышается. То есть происходят противоположные изменения в образовании гиббереллинов и ауксинов. Но при пониженной влажности почвы уменьшается содержание и гиббереллинов и ауксинов. В процессе онтогенеза при прорастании семян в значительной степени увеличивается и образование гиббереллинов.

Цитокинины находятся в растениях как в свободном состоянии, так в тРНК. Много цитокининов в клетках меристем и апикальных побегов. В основном цитокинины синтезируются в корнях растений, а затем по ксилеме поступают в надземные органы. Но также имеются данные о том, что цитокинины образуются еще в развивающихся плодах и в зародышах в семенах. Регулирование распада цитокининов происходит с помощью фермента цитокининоксидазы.

Продуценты фитогормонов найдены у бактерий родов Bacillus, Clostridium, Klebsiella, Enterobacter, Pseudomonas, Azotobacter, Azospirillum.

Для лучшего фосфорного питания важно растворить почвенные фосфаты, которые труднодоступны. Фосфор находится в почве как в неорганических соединениях, так и в органических. Из общего числа фосфорных соединений растениям доступны только 5 %. Не усваивается растениями фосфорные органические соединения, которые находятся в почве в форме нуклеино-

вых кислот, фитина и фосфолипидов. Ризобактерии образуют ферменты (фосфотазы, фосфолипазы, нуклеазы, фитазы), чтобы образовался доступный растениям фосфатный ион. То есть происходит минерализация нуклеиновых кислот, фитина, а также фосфолипидов [38].

80-90 % почвенных бактерий способны к тому, чтобы фиксировать атмосферный азот. Обычно в прикорневой зоне растения находится смешанная популяция микроорганизмов. Ризосферные бактерии родов азотобактер создают ассоциации с микроорганизмами рода Bacillus. Azotobacter потребляет продукты распада полимеров Bacillusi в то же время снабжает их атмосферным азотом. Таким образом, происходит стимулирование азотфиксации. Ризосферные бактерии, которые образуют АЦК (1-аминоциклопропан-1-карбоксилат) деаминазу, обладают антистрессовым эффектом. Бактерии используют АЦК в виде источника питания. Это приводит к тому, что ее содержание снижается в растениях и как следствие, понижается синтез этилена в корнях растения.

Существуют различные биопрепараты, которые созданы на основе ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов. Биопрепарат Биоплант-К и Ризобактерин созданы на основе штамма, который относится к роду Klebsiella. (Klebsiella Planticola). Они разработаны для повышения урожайности зерновых культур. Биопрепарат Миколин создан на основе рода Bacillus cereus var. Micoides. Биопрепарат Ризоэнтерин разработан на основе штамма, который принадлежит роду Enterobacter (Enterobacter aerogenes). Он применяется для увеличения урожайности озимой пшеницы. Основой биопрепарата Псевдобактерин являются бактерии рода Pseudomonas (Pseudomonas Fluorescens).

Фиксация атмосферного азота является восстановительным биологическим процессом. Его продукт – аммиак. Аммиак включается в азотистые соединения, которые используют другие организмы. Азотфиксация играет огромную роль в круговороте азота, а также в обогащении азотом водоемов и почвы. Азотфиксирующие бактерии - уникальные организмы, которые могут

осуществлять этот процесс. Эти микроорганизмы называют также диазотрофами. Они используют и молекулярный азот, и связанные формы азота. Катализатором для восстановления молекулярного азота до аммиака выступает фермент нитрогеназа. В хромосоме (у клебсиеллы) или мегаплазмиде (у ризобиум) находятся nif – гены, которые детерминируют синтез нитрогеназы. Помимо этих генов в процессе азотфиксации участвуют продукты fix-генов. Существуют различные типы ферментов нитрогеназ. Самый распространенный содержит молибден. А в других типах имеется железо или ванадий. Существуют диазотрофы, которые могут синтезировать два или три типа нитрогеназ. Это, например Azotobacter. Все типы нитрогеназ содержат два белковых компонента. Первым компонентом является сама нитрогеназа или молибдоферредоксин (MoFe-белок). Вторым компонентом является Fe-белок (FeS-белок). MoFe-белок связан с MoFe-кофактором, который выполняет роль каталитического сайта восстановления молекулярного азота. Fe-белок принимает электроны от флаводоксина или ферредоксина, которые восстанавливаются. А затем передает электроны на MoFe-белок. Нитрогеназа очень чувствительна к молекулярному кислороду. Этот фермент на воздухе инактивируется. А также синтез нитрогеназы заканчивается в аэробных условиях. Следовательно, азотфиксация является анаэробным процессом. Несмотря на это эти микроорганизмы могут осуществлять фиксацию азота при небольшом содержании кислорода в среде из-за наличия у них особых защитных механизмов (дыхательная защита, конформационная защита и др.) [11, 32, 36].

Ученые считают, что ассоциативная азотфиксация имеет огромную экологическую значимость. Именно таким образом в природных экосистемах происходит пополнение доступным азотом. Ассоциативные микроорганизмы играют большую роль в посевах культур, в том числе злаковых. Кроме главной своей функции – фиксировать атмосферный азот, микроорганизмы вырабатывают различные активные вещества – гиббереллины, ауксины, цитокинины. Они способствуют увеличению массы корней, оказывают влияние на репродуктивные органы и подавляют рост фитопатогенов. Несимбиотическая

азотфиксация происходит с помощью гетеротрофных организмов, которые обитают на стеблях и корнях растений [27, 34]. Азотфиксирующая способность проявляется примерно у 70 % микроорганизмов в ризосфере и более 50 % - в филлосфере. Практическое использование азотфиксирующих микроорганизмов в сельском хозяйстве началось в начале 20 века. Особое внимание уделялось азоспириллам, так как установили, что они имеют фермент нитрогеназу. С помощью этого фермента осуществляется процесс азотфиксации.

Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы развиваются при водородном показателе среды, равном 5,6-7,0. Азотфиксация возрастает при повышении влажности почвы, но падает, когда она полностью насыщена влагой. То есть максимальное поступление азота вследствие его связывания бактериями ризосферы у злаковых культур, зависит от наиболее благоприятного уровня влажности.

Многие азотфиксирующие микроорганизмы являются анаэробами, потому что не обладают механизмами «дыхательной защиты» нитрогеназы. Это объясняет то, что эта группа бактерий находится в прикорневой зоне растений, так как корни уменьшают концентрацию кислорода, активно его поглощая.

Содержание в почве минерального азота – важный экологический фактор, который определяет активность азотфиксации. Азотные удобрения оказывают влияние на усвоение атмосферного азота азотфиксирующими микроорганизмами. Обнаружение такой зависимости имеет большое значение, так как дает возможность установить нужные нормы азотных удобрений, которые не будут мешать интенсивной азотфиксации. Активность нитрогеназы азотфиксирующих бактерий сдерживается нитратами, потому что микроорганизмы обладают нитратредуктазами. Факторами, от которых зависит действие минерального азота на нитрогеназную активность, являются формы и нормы удобрений, а также концентрация в среде органического, легкодоступного вещества и присутствие растений.

Активными азотфиксирующими бактериями, которые обитают в ассоциации с корневой системой растений (системой злаковых), являются около 50 видов микроорганизмов. Они отнесены как к определенным растительным сообществам, так и к почвам разных климатических зон. Ризосферные азотфиксирующие микроорганизмы неоднородны по своим физиологическим свойствам. Их развитие, а также усвоение азота идет в большом интервале температуры, влажности и кислотности среды. Большинство азотфиксаторов относится к анаэробам и активно развивается при небольшом количестве минерального азота в почвенном растворе. Ризосферные микроорганизмы для осуществления азотфиксации в качестве главного источника энергии используют большой набор углеводов и расходуют около трети всех продуктов фотосинтеза. Нитрогеназная активность в прикорневой зоне злаковых культур меняется в зависимости от вида растительности, а также почвенно-климатических условий и составляет 12-90 кг/га азота в год.

Анализ вопроса по фиксации атмосферного азота посевами злаковых культур с помощью деятельности ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов позволяет сделать вывод о целесообразности постановки исследований по этой теме. Внедрение этих разработок в практику сельского хозяйства будут способствовать улучшению азотного питания растений [10].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа была выполнена при закладке полевых опытов на опытном участке ФГБНУ «Пензенский НИИСХ» и лабораторных опытов на базе бактериологического отделения ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии Пензенской области».

Объект исследования – почвы естественного лугового биогеоценоза района р.п. Лунино Пензенской области и агроценоза озимой пшеницы сорта Фотинья.

В агроценозе озимой пшеницы были изучены почвенные образцы в соответствии со схемой опыта при обработке растений различными гербицидами.

Схема опыта:

1. Биогеоценоз
2. Контроль (агроценоз пшеницы без обработки)
3. Калибр
4. Хакер
5. Агрокиллер
6. Бис-300
7. Лазурит
8. Калибр+Альбит

В варианте биогеоценоза были взяты почвенные образцы из естественной природной полосы (лугово-черноземные почвы). Лугово-черноземные почвы почти не отличаются от черноземных почв морфологическим строением, а также по химическим и физико-химическим свойствам. Но pH в зоне оглеения понижается, гидролитическая кислотность повышается и уменьшается степень насыщенности основаниями. Содержат немного меньше гумуса в пахотном слое. Кислотность пахотного слоя почти такая же, как у черноземов.

Лугово-черноземные почвы, как и черноземы подвержены дегумификации, преобладанию минерализации органических веществ и уплотнению.

Гербициды – это химические вещества, которые применяют для уничтожения растительности. Основная область применения – уничтожение сорной растительности в сельскохозяйственных посевах культур. По характеру действия на растения, в зависимости от их вида, гербициды подразделяются на 2 группы: сплошного и избирательного действия. Гербициды сплошного действия воздействуют на все виды растений. Гербициды избирательного или селективного действия в определенных дозах поражают одни виды растений и сравнительно безопасны для других видов. Также различают системные и контактные гербициды. Попадая через наземные органы растения или корни, системные гербициды передвигаются по растению, нарушают рост и клеточное деление и оказывают поражающее действие в различных органах растений. Контактные гербициды вызывают в местах попадания на органы растений ожоги, омертвение тканей и как следствие гибель растения.

В ходе работы использовались гербициды: агрокиллер, БИС – 300, калибр, хакер, лазурит.

Агрокиллер – универсальный препарат от сорняков. Имеет повышенное содержание действующего вещества. Действующее вещество: глифосат кислоты (изопропиламинная соль). При контакте с сорняком гербицид проникает через листья и другие части в растения, переносится по всем органам и достигает их корневой системы. Блокирует синтез аминокислот. Это приводит к поражению точек роста и полному отмиранию надземных и подземных органов. Уничтожает трудноистребимые сорняки, в том числе борщевик Сосновского.

БИС-300 – системный гербицид против многолетних двудольных сорняков семейства астровых на посевах зерновых, сахарной свеклы, рапса и других культур. Действующее вещество – клопиралид. Уничтожает наземную и подземную часть сорняков. Он поглощается листьями, переносится в точку роста, корни, перемещается по растениям, прекращая их рост. Уничтожает осоты почти на всех стадиях развития.

Патрон – высокоэффективный премиум-гербицид для уничтожения

двухдольных сорняков в посевах зерновых культур. Действующие вещества: тифенсульфурон и трибенурон-метил. Считается безопасным для последующих культур севооборота.

Хакер – системный послевсходовый гербицид. Применяется для борьбы с некоторыми однолетними и многолетними двудольными. Уничтожает трудноискоренимые виды (бодяк полевой, осот, ромашка и др.) в посевах свеклы и льна. Действующее вещество: клопиралид. Хакер поглощается листьями сорных растений, переносится в корень, нарушает процесс деления клеток и рост растения прекращается. Не является фитотоксичным для зерновых культур, рапса, свеклы, капусты льна, газонных трав. На рост и развитие культурных растений отрицательного действия не отмечено.

Лазурит – системный гербицид для защиты кукурузы, картофеля и др. культур от однолетних двудольных и злаковых сорняков. Диапазон применения – до или после всходов культуры. Препарат действует на сорняки через корни и листья. Действующее вещество: метрибузин.

В процессе исследования почвы применяли следующее оборудование и материалы:

Бокс микробиологический

Термостат (рисунок 1)

Водяная баня

Плита электрическая

Весы лабораторные

pH-метр

Микроскоп

Стерилизатор паровой (рисунок 2)

Стерилизатор сухо-воздушный

Холодильник

Пробирки лабораторные

Воронки

Пипетки

Бактериологическая петля

Шпатели

Спиртовка стеклянная

Стекла предметные

Чашки Петри

Штативы для пробирок

Флаконы

Рисунок 1. Термостат

Рисунок 2. Стерилизатор паровой

При культивировании микроорганизмов для их роста необходимо создать благоприятные условия. Главный фактор культивирования – свойства и состав питательной среды. Среды должны быть:

1. Питательными, то есть содержать вещества, которые будут удовлетворять энергетические и пищевые потребности.
2. Стерильными, так как посторонняя микрофлора мешает росту микроорганизмов, которые изучаются.

3. Изотоничными для бактериальной клетки. Это значит, что осмотическое давление в среде должно быть одинаковым с осмотическим давлением внутри клетки.
4. С постоянным количеством ингредиентов, т.е. быть унифицированными.
5. С оптимальной концентрацией водородных ионов – pH. Микроорганизмы могут усваивать питательные вещества исключительно при оптимальном pH.
6. С оптимальной для микроорганизмов консистенцией и влажностью.

Этапы приготовления питательных сред:

1. Взвешивание компонентов питательной среды на аналитических весах.
2. Растворение компонентов питательной среды в дистиллированной воде.
3. Варка питательной среды в течение установленного времени.
4. Установление pH среды с помощью pH-метра. Сначала готовят более щелочной раствор, так как при стерилизации pH снижается на 0,2.
5. Фильтрация жидких и горячих плотных питательных сред через ватно-марлевый фильтр.
6. Розлив питательных сред в стеклянные флаконы и пробирки с заполнением их не более чем на 3/4, так как могут намокнуть ватно-марлевые пробки и среда будет уже не стерильной.
7. Стерилизация сред автоклавированием при режиме, установленном для каждой питательной среды и указанном в ее рецептуре.
8. Розлив плотных питательных сред в стерильные чашки Петри с соблюдением асептических условий.
9. Контроль стерильности питательных сред. Часть от каждой приготовленной среды ставят в термостат на 2 суток, а затем просматривают.

При проведении исследований почвы использовали следующие питательные среды:

1. *Питательный агар - ГРМ-агар* (для подсчета общего микробного числа).
2. *Среда Эшби* (для обнаружения бактерий рода *Azotobacter*).
3. *Жидкая среда Виноградского* (для обнаружения масляно-кислых клостридий - *Clostridium pasteurianum)*
4. *MYP-агар* (для обнаружения *Bacillus cereus)*
5. *Среда Эндо* (для обнаружения бактерий рода *Klebsiella*)
6. *Цетримидный агар* (для обнаружения бактерий рода *Pseudomonas*)
7. *Среда Клиглера.* (для биохимической идентификации энтеробактерий)
8. *Среда Хью-Лейфсона* (для биохимической идентификации псевдомонад)
9. *Сульфитный агар* (для обнаружения сульфит-редуцирующих клостридий).

Почва отбиралась с соблюдением асептических условий. Отбор проб проводился стерильными инструментами. При подготовке к бактериологическому анализу почву растирали в стерильной ступке. Образцы почвы, которые отбирались с соблюдением асептических правил, переносили на стерильный лист из плотной бумаги. Затем очень тщательно перемешивали с помощью стерильного шпателя. Если попадались какие-либо примеси (например, неперегнившие растительные остатки, различные твердые предметы), то их удаляли. Образец почвы нужной массы (навеску) 10 г растирали в стерильной ступке. Далее готовили первое разведение почвенной суспензии (1:10). Для этого добавляли к почве стерильную воду (10 г почвы растворяли в 90 $см^3$ воды) (рисунок 3). Затем производили предварительную обработку почвы с помощью ручного перемешивания почвенной суспензии в течение 3 минут. Из первого разведения, которое находится во флаконе почвенную суспензию переносят в пробирку с содержанием стерильной воды 9 $см^3$ (ри-

сунок 4). В процессе приготовления разведений использовали стерильные пипетки [1].

Рисунок 3. Разведение 10^{-1}

Рисунок 4. Разведения 10^{-2} – 10^{-4}

Количество необходимых разведений выбиралось с учетом предполагаемого нахождения в почве микроорганизмов. При использовании питательных сред и реактивов, входящих в их состав, соблюдались способ приготовления и сроки хранения, которые указал изготовитель.

КОЕ (колониеобразующие единицы) – количество бактерий (клеток), обнаруживаемое в 1 г почвы. Использовался метод прямого посева на различные агаризованные питательные среды. Среды разливали в чашки Петри на горизонтальной поверхности, чтобы получился ровный слой. Для того, чтобы удалить конденсационную воду, чашки помещали в сушильный шкаф, нагретый до температуры 60-70^{0}С. Там чашки открывали, переворачивали вверх дном и подсушивали до появления муарового рисунка примерно в течение 20 минут. На подсушенных чашках колонии не сливаются друг с другом, что удобнее для подсчета.

Из выросших на питательных средах колонии, делали мазки и окрашивали их по Граму. Для этого на фиксированный над пламенем спиртовки мазок клали фильтровальную бумагу. Смачивали ее с помощью 1мл раствора генциан фиолетового в течение 1 минуты. Затем снимали бумагу, сливали краску. Не промывая стекла водой, наливали на мазок 1 мл раствора Люголя на 1 мин. Потом сливали раствор Люголя со стекла и погружали его в 96 % этиловый спирт (до обесцвечивания мазка примерно на 30-60 секунд). Далее промывали мазок дистиллированной водой и заливали раствором фуксина на 1минуту. Затем сливали краску, промывали дистиллированной водой и высушивали мазок с помощью фильтровальной бумаги. Грамположительные бактерии окрашивались в фиолетовый или синий цвет, а грамотрицательные – в красный или розовый [16].

Содержание микроорганизмов в 1 г сырой почвы вычисляли по формуле: среднее число колоний при посеве в данном разведении умножали на коэффициент разведения, равный десяти в степени порядкового номера разведения, из которого произвели посев. И делили на объем суспензии, взятой для посева (0,1 мл) [2].

Для того чтобы определить общую численность почвенных микроорганизмов (ОМЧ) навеску почвы, использовалась для приготовления первого разведения сначала в течение 5 минут растирали с помощью малого количества стерильной воды до пастообразного состояния. Затем готовили первое разведение 1:10. Далее почвенную суспензию охлаждали при температуре 5-7^0 С в течение 20 минут. И уже после охлаждения делали разведения обычным способом. Затем производили посев по 0,1 мл на чашки Петри со стерильным питательным агаром и с помощью стерильного шпателя растирали по поверхности. Потом чашки с посевами ставили в термостат при температуре 28-30^0 С в течение 72 часов. Затем чашки просматривали, отмечали и подсчитывали количество колоний, выросших в разведениях, отмечая их маркером по стеклу. Для правильного расчета КОЕ (колониеобразующих

единиц), обнаруживаемых в 1 г сырой почвы колонии подсчитывали только на тех чашках, где их выросло не менее 10 и не более 250 [2,3].

Для того чтобы обнаружить бактерии рода *Azotobacter* в почве использовали метод почвенных комочков. Сначала навеску почвы увлажняли водой до пастообразного состояния. Затем иглой раскладывали параллельно на две чашки на среду Эшби рядами (на каждую чашку – 50 комочков). Далее помещали в термостат с температурой 30^0С. Примерно через 5 суток подсчитывали, сколько комочков обросло слизистыми колониями азотобактера. Из них делали мазок и микроскопировали.

Чтобы обнаружить в почве анаэробных азотфиксирующих бактерий рода *Clostridium* мы пользовались методом накопительной культуры. Для этого использовали среду жидкую Виноградского. Ее наливали в пробирки высокими столбиками, засевали почвой в разведениях с 10^{-1} по 10^{-4}. Затем пастеризовали при температуре 80^0 С для того, чтобы освободить от аэробных бесспоровых микроорганизмов. Развитие анаэробных споровых бактерий можно определить по помутнению и выделению пузырьков газа в пробирках. То есть происходит маслянокислое брожение. Глюкоза превращается в углекислый газ и масляную кислоту. В пробирках появляется много пены. Также можно почувствовать запах уксусной и масляной кислот. Уксусная кислота тоже является продуктом маслянокислого брожения. Этот метод мы использовали для обнаружения клеток *Clostridium pasteurianum*. Их мы увидели при микроскопировании осадка [2, 39].

Для того чтобы определить в почве анаэробных сульфитредуцирующих клостридий, мы произвели посев в пробирки с сульфитным агаром. Пробирки, разлитые высоким столбиком, прогрели на водяной бане в течение 10 минут. Затем остудили и произвели посев пипеткой в разведениях с 10^{-1} по 10^{-4}. Потом пробирки с посевами поставили в термостат при температуре 37^0 С на 24 часа. При положительном результате внутри среды наблюдали колонии черного цвета [3].

Для того, чтобы обнаружить в почве бактерию *Klebsiella planticola*, производили посев на среду Эндо и ставили в термостат при температуре 37^0С на 24 часа. Затем выросшие крупные, выпуклые, слизистые колонии микроскопировали, пересевали на агар Клиглера, а затем проводили биохимическую идентификацию с помощью тест-системы ПБДЭ. Для этого готовили микробную суспензию. Для приготовления суспензии, 2-3 петли с культурой растворили в фосфатно-буферном растворе. Затем добавили пипеткой по 0,15 мл микробной суспензии во все лунки пластины. Для того, чтобы создать анаэробные условия, в лунки № 4 (для определения лизиндекарбоксилазы), № 5 (для определения аргиниидегидролазы), № 6 (для определения орнитиндекарбоксилазы), № 10 (для определения уреазы), № 11 (для определения сероводорода) добавили 1-2 капли стерильного вазелинового масла. Закрывали пластину крышкой и ставили в термостат при 37 ^{0} С на 24 часа. После окончания инкубации в лунку № 7 (для выявления фенилаланиндезаминазы) добавляли 1 каплю 10 % раствора хлорида железа, в лунку № 9 (для определения ацетилметилкарбинола) добавляли 1 каплю 6 % раствора альфа-нафтола и 1 каплю 40 % раствора гидроксида калия, в лунку № 8 (для выявления индола) добавляли 1-3 капли реактива Эрлиха.

Для того, чтобы выявить в почве бактерии рода *Pseudomonas* мы произвели посев на цетримидный агар. Для дальнейшего исследования были отобраны колонии, при микроскопировании которых увидели грамотрицательные палочки. Затем мы провели тест на оксидазу и каталазу. Для этого колонию проверяли с помощью тест-полосок на оксидазу. Принцип действия: в присутствии цитохромоксидазы N, N-диметил-1,4-фенилендиамин вступает в цветную реакцию альфа-нафтолом с образованием индофенолового синего. Тестируемый штамм микробиологической петлей втирают в диагностическую зону полоски. Цветную реакцию учитывают через 0,5-1 минуту. Тест считается положительным при появлении полосы синего цвета. Каталазный тест: колонии размазывают на чистом стекле, наносят на этот мазок несколько капель 3 % перекиси водорода и сразу наблюдают за результатом.

При положительной реакции выделение кислорода сопровождается появлением пузырьков. При отрицательной реакции пузырьки не образуются. Принцип теста на каталазу: фермент каталаза гидролизует перекись водорода с образованием воды и кислорода. Затем произвели посев культуры на среду Клиглера. На следующий день выполнили посев на среду Хью – Лейфсона. Эта среда используется для дифференциации грамотрицательных микроорганизмов в зависимости от наличия у них ферментативного или окислительного метаболизма углеводов. «Ферментирующие» микроорганизмы продуцируют кислоту в тех и других условиях. «Окисляющие» образуют кислоту только в открытой среде, а под слоем масла растут слабо, не изменяя цвет среды. Используют две пробирки. Стерильной петлей касались колонии и прокалывали среду на глубину половины столбика агара. Заливали одну пробирку стерильным маслом слоем в 1 см. Инкубировали при температуре 35 ^{0} С и проверяли в течение 72 часов. Положительной реакция (образование кислоты) – желтый цвет, отрицательная реакция – изменения цвета не происходит, то есть среда остается зеленого цвета.

Для того, чтобы обнаружить в почве *Bacillus cereus* был произведен посев на MYP – агар (маннитоловый агар с яичным желтком и полимиксином). MYP - агар – селективная и дифференциальная среда. Диагностические характеристики среды зависят от неспособности *Bacillus cereus* потреблять маннит и способности большинства штаммов продуцировать фосфолипазу. Среда становится селективной за счёт добавления полимиксина В. Мы произвели посев по 0,1 мл из разведений с 10^{-2} по 10^{-4} на чашки подготовленной среды и поставили в термостат при температуре 30 ^{0} С на 24 часа. После инкубации промикроскопировали подозрительные колонии. В мазке мы увидели грамположительные палочки. И произвели подсчет типичных колоний на чашках [37].

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ В ЛУГОВОМ БИОГЕОЦЕНОЗЕ И АГРОЦЕНОЗЕ ПШЕНИЦЫ

3.1. Подбор микробиологических сред для определения азотфиксирующих микроорганизмов в агроценозе пшеницы и естественном ценозе

Для исследования биологической активности почв в естественных ценозах и агроценозах нами было осуществлен подбор различных методик фиксации деятельности микроорганизмов. С этой целью были опробированы различные среды, наиболее информативные для отдельных штаммов микроорганизмов.

На питательном агаре подсчитывали общее количество выросших колоний в различных разведениях (рисунок 5, 6). Питательный агар (ГРМ-агар) готовили следующим образом: 38,5 г сухой среды размешивали в 1 литре дистиллированной воды. Затем кипятили 2 минуты, чтобы агар полностью расплавился. Потом фильтровали через марлевый фильтр и разливали в стерильные флаконы. Среду стерилизовали при температуре 121^0 С в течение 15 минут. После автоклавирования среду охлаждали до 50^0 С и разливали в стерильные чашки Петри. После термостатирования при 30 ^{0} С производили подсчет выросших колоний в разведениях 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} степени и КОЕ в 1 г сырой почвы.

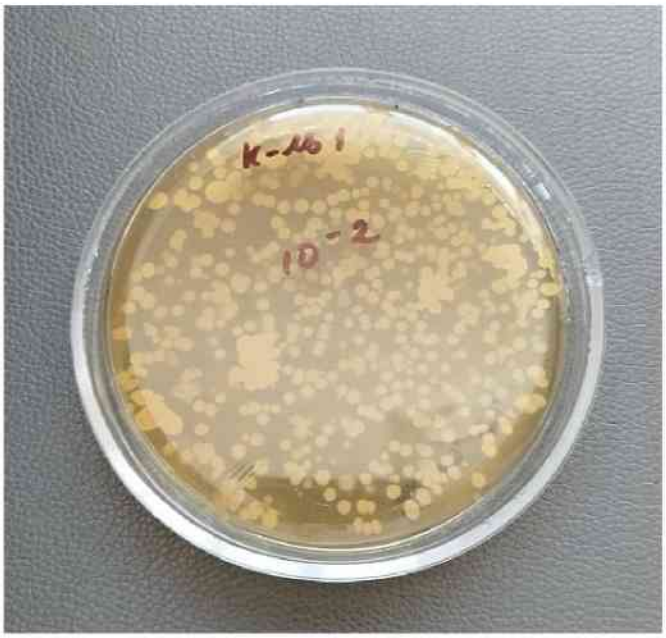

Рисунок 5. Колонии микроорганизмов на питательном агаре

Рисунок 6. Колонии микроорганизмов на питательном агаре

Для обнаружения маслянокислых клостридий использовали жидкую среду Виноградского. Ее готовили следующим образом. В 1 литре дистиллированной воды растворяли 20 г глюкозы, 0.1 г K_2HPO_4, 0,5 г Mg SO_4 семиводного, 20 г Ca CO_3, следы Mg SO_4, NaCl, Fe SO_4. Кипятили до их полного растворения. Затем доводили объем дистиллированной водой до первоначального и разливали в пробирки высоким столбиком.

Среду стерилизовали в автоклаве при 110 ^{0} С в течении 20 минут. *Clostridium pasteurianum* – облигатный анаэроб, то есть они развиваются без доступа кислорода. Имеют форму палочек с перитрихально расположенными жгутиками. Имеют овальные споры, которые окружены капсулой. На среде Виноградского положительным результатом, то есть присутствием маслянокислых клостридий, считали помутнение среды, выделение газа, образование пены (рисунок 7). При микроскопировании содержимого среды в мазках обнаружили грамположительные палочки (рисунок 8).

Рисунок 7. Среда Виноградского

Рисунок 8. Грамположительные палочки (клостридии)

Для обнаружения в почве азотобактера использовали среду Эшби. Ее готовили таким образом: в 1 литре дистиллированной воды растворяли 20 г сахарозы, 0.2 г K_2HPO_4, 0,2 г $Mg\ SO_4$, 0,2 г NaCl, 0,1 г $K_2\ SO_4$, 5 г $Ca\ CO_3$, 20 г агара бактериологического. Сначала замачивали до набухания агара. Затем кипятили до их полного растворения. Далее доводили объем жидкости дистиллированной до первоначального. В конце фильтровали через марлевый фильтр. Среду разливали в стеклянные флаконы, а затем стерилизовали в автоклаве при $110\ ^0$ С в течении 20 минут. Остывшую до 50^0С среду разливали по чашкам Петри. Через 5 суток после посева комочки почвы обросли слизистыми колониями азотобактера (рисунок 9). Азотобактер – это род бактерий, которые живут в почве. Они способны фиксировать молекулярный азот, а затем переводить его в форму, которая доступна для растений. Азотобактер является грамотрицательной бактерией от палочковидной до кокковидной формы, которые могут располагаться по одиночке, цепочкой и парами (рису-

нок 10). Колонии азатобактера могут быть бесцветными и пигментированными.

Для обнаружения бактерий рода *Klebsiella* использовали среду Эндо. Среду Эндо готовили следующим образом: 36,5 г сухой среды размешивали в 1 литре дистиллированной воды, кипятили 2 минуты до полного расплавления агара. Затем фильтровали через марлевый фильтр. Потом снова доводили до кипения. Охлаждали до температуры 50^0 С и разливали в чашки Петри.

Рисунок 9. Колонии азотобактера на среде Эшби

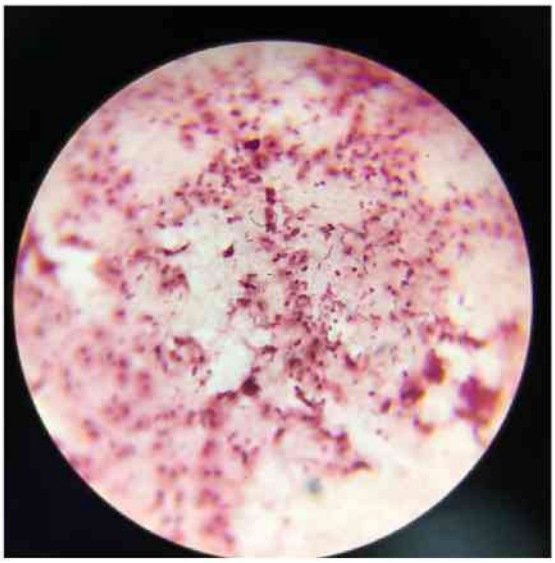

Рисунок 10. Клетки азотобактера под микроскопом

Klebsiella planticola – грамотрицательная палочковидная бактерия, факультативный анаэроб, неподвижна, спор не образует. Имеет капсулу. Утилизирует глюкозу, лактозу, маннит, сахарозу, инозит, сорбит, арабинозу, мальтозу, цитрат натрия, маланат натрия. Не образует индол (в отличие от *Klebsiella oxytoca)* и сероводород. На среде Эндо *Klebsiella planticola* образует крупные, слизистые, розовые колонии (рисунок 11). Их микроскопировали (в мазках грамотрицательные палочки). Затем пересевали на агар Клиглера (рисунок 12).

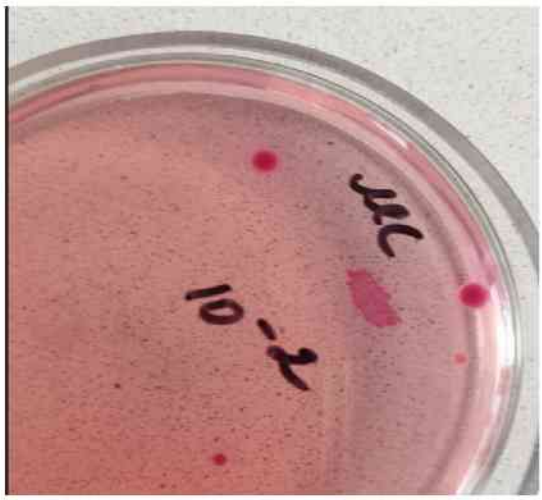

Рисунок 11. Колонии Klebsiella planticola на среде Эндо

Рисунок 12. Klebsiella planticola на среде Клиглера

Со среды Клиглера производили пересев на обыкновенный косяк и на среду ЛПС с поплавком. В отличие от *Klebsiella pneumoniae* ферментация лактозы происходит с образованием кислоты, но без газообразования при температуре 44^0С (рисунок 13).

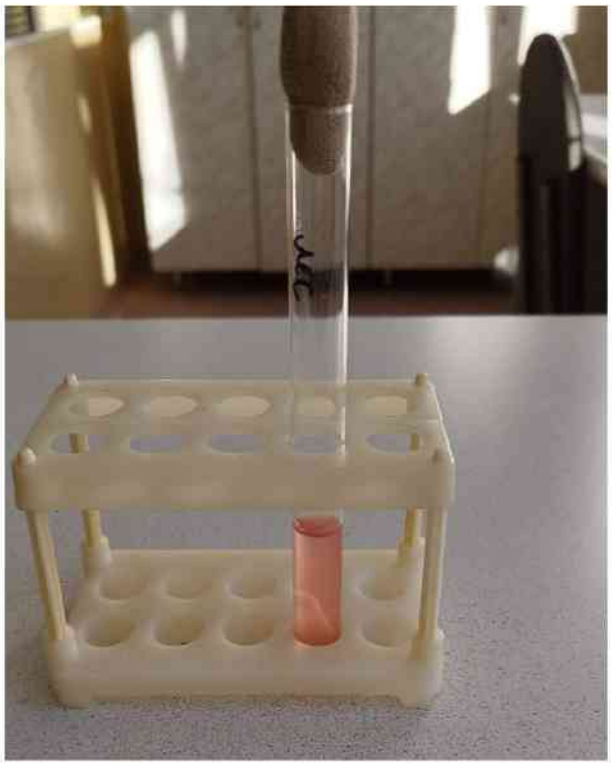

Рисунок 13. Ферментация лактозы с образованием кислоты, без газа на среде ЛПС

Затем определяли ферментативную активность и дифференциацию до вида с помощью тест-системы ПБДЭ *(пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии)* (рис.14).

Учет результатов производили в соответствии с цветовым указателем и таблицей биохимических свойств энтеробактерий для тест-систем ПБДЭ (рисунок 15, 16).

Рисунок 14. Биохимические свойства бактерий Klebsiella planticola на тест-системе ПБДЭ

Цветовой указатель

№ Лунки и теста	Наименование теста	Цвет среды в сухом виде	Цвет среды в растворенном виде	Положительная реакция	Отрицательная реакция
1	2	3	4	5	6
1	Утилизация цитрата натрия	Желтый, светло-зелёный	Желтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
2	Утилизация малоната натрия	Жёлтый	Жёлтый	Тёмно-зёленый, синий	Жёлтый, светло-зёленый
3	Утилизация цитрата натрия с глюкозой	Жёлтый, коричневый	Жёлтый, коричневый	Фиолетовый, бурый	Жёлтый, коричневый
4	Наличие лизиндекарбоксилазы	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
5	Наличие аргининдегидролазы	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
6	Утилизация орнитиндекарбоксилазы	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
7	Наличие фенилаланиндезаминазы	Бесцветный	Бесцветный	Тёмно-зелёный	Жёлтый
8	Образование индола	Бесцветный	Бесцветный	Розовый	Бесцветный
9	Образование ацетилметилкарбинола	Бесцветный	Бесцветный	Розовый, малиновый	Бесцветный
10	Наличие уреазы	Жёлтый	Жёлтый	Малиновый, красный	Жёлтый
11	Образование сероводорода	Бесцветный	Бесцветный	Черный, темно-серый, коричневый	Жёлтый
12	Утилизация глюкозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
13	Наличие β-галактозидазы	Бесцветный	Бесцветный	Жёлтый	Бесцветный
14	Утилизация лактозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
15	Утилизация маннита	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
16	Утилизация сахарозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
17	Утилизация инозита	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
18	Утилизация сорбита	Красный	Красный	Желтый, желто-оранжевый	Красный
19	Утилизация арабинозы	Красный	Красный	Желтый, желто-оранжевый	Красный
20	Утилизация мальтозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный

Рисунок 15. Цветовой указатель

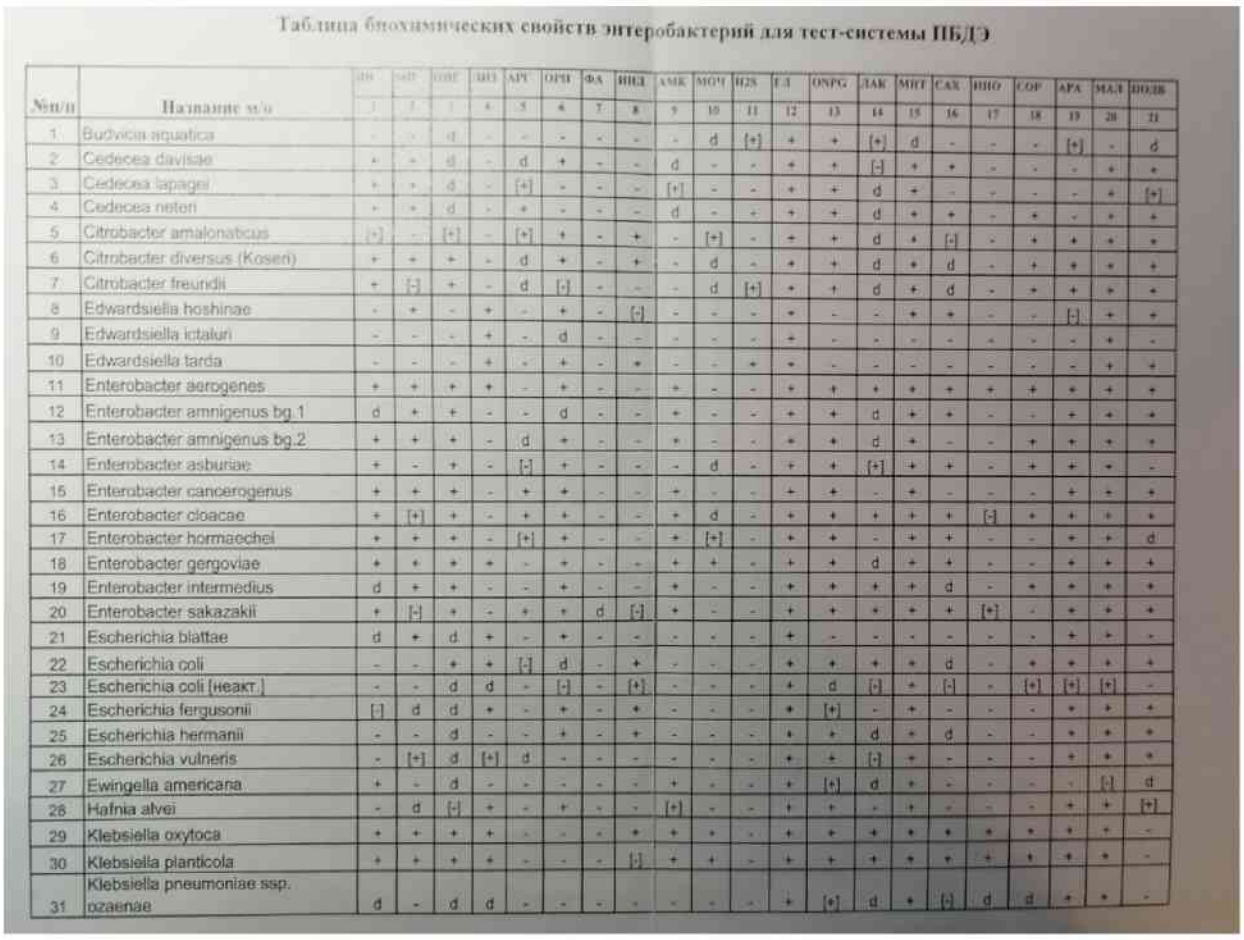

Таблица биохимических свойств энтеробактерий для тест-системы ПБДЭ

№п/п	Название м/о	ЛЖ	МЖ	ОЖЕ	ЦИ	АРГ	ОРН	ФА	ИНД	АМК	МОЧ	Н2S	Е.Х	ONPG	ЛАК	МИТ	САХ	ИНО	СОР	АРА	МАЛ	ПОДЗ
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	Budvicia aquatica	-	-	d	-	-	-	-	-	-	d	[+]	+	+	[+]	d	-	-	-	[+]	-	d
2	Cedecea davisae	+	-	d	-	d	+	-	-	d	-	-	+	+	[-]	+	+	-	-	-	+	+
3	Cedecea lapagei	+	+	d	-	[+]	-	-	-	[+]	-	-	+	+	d	+	-	-	-	-	+	[+]
4	Cedecea neteri	+	+	d	-	+	-	-	-	d	-	-	+	+	d	+	+	-	+	-	+	+
5	Citrobacter amalonaticus	[+]	-	[+]	-	[+]	+	-	+	-	[+]	-	+	+	d	+	[-]	-	+	+	+	+
6	Citrobacter diversus (Koseri)	+	+	+	-	d	+	-	+	-	d	-	+	+	d	+	d	-	+	+	+	+
7	Citrobacter freundii	+	[-]	+	-	d	[-]	-	-	-	d	[+]	+	+	d	+	d	-	+	+	+	+
8	Edwardsiella hoshinae	-	+	-	+	-	+	-	[-]	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	[-]	+	+
9	Edwardsiella ictaluri	-	-	-	+	-	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
10	Edwardsiella tarda	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
11	Enterobacter aerogenes	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Enterobacter amnigenus bg.1	d	+	+	-	-	d	-	-	+	-	-	+	+	d	+	+	-	-	+	+	+
13	Enterobacter amnigenus bg.2	+	+	+	-	d	+	-	-	+	-	-	+	+	d	+	-	-	+	+	+	+
14	Enterobacter asburiae	+	-	+	-	[-]	+	-	-	-	d	-	+	+	[+]	+	+	-	+	+	+	-
15	Enterobacter cancerogenus	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
16	Enterobacter cloacae	+	[+]	+	-	+	+	-	-	+	d	-	+	+	+	+	+	[-]	+	+	+	+
17	Enterobacter hormaechei	+	+	+	-	[+]	+	-	-	+	[+]	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	d
18	Enterobacter gergoviae	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	d	+	+	-	-	+	+	+
19	Enterobacter intermedius	d	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+
20	Enterobacter sakazakii	+	[-]	+	-	+	+	d	[-]	+	-	-	+	+	+	+	+	[+]	-	+	+	+
21	Escherichia blattae	d	+	d	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
22	Escherichia coli	-	-	+	+	[-]	d	-	+	-	-	-	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+
23	Escherichia coli [неакт.]	-	-	d	d	-	[-]	-	[+]	-	-	-	+	d	[-]	+	[-]	-	[+]	[+]	[+]	-
24	Escherichia fergusonii	[-]	d	d	+	-	+	-	+	-	-	-	+	[+]	-	+	-	-	-	+	+	+
25	Escherichia hermanii	-	-	d	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	d	+	d	-	-	+	+	+
26	Escherichia vulneris	-	[+]	d	[+]	d	-	-	-	-	-	-	+	+	[-]	+	-	-	-	+	+	+
27	Ewingella americana	+	-	d	-	-	-	-	-	+	-	-	+	[+]	d	+	-	-	-	-	[-]	d
28	Hafnia alvei	-	d	[-]	+	-	+	-	-	[+]	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	[+]
29	Klebsiella oxytoca	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
30	Klebsiella planticola	+	+	+	+	-	-	-	[-]	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
31	Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae	d	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	+	[+]	d	+	[-]	d	d	+	+	-

Рисунок 16. Таблица биохимических свойств энтеробактерий для тест-систем ПБДЭ

Для обнаружения бактерий рода *Pseudomonas* использовали цетримидный агар (рисунок 17). Цетримидный агар готовили следующим образом: 40 г сухой среды растворили в 1 л дистиллированной воды, прокипятили 2 минуты, профильтровали через ватно-марлевый фильтр и разлили во флаконы. Простерилизовали автоклавированием при температуре 121^0 С в течение 15 минут. Затем в асептических условиях разлили в стерильные чашки Петри. Псевдомонады — род грамотрицательных аэробных неспорообразующих бактерий. Псевдомонады подвижны и имеют форму прямых или изогнутых палочек и два полярно расположенные жгутика. В мазках они расположены в виде отдельных клеток или цепочек. При культивировании большинство видов не нуждается в дополнительных органических факторах. Как правило, псевдомонады окисляют глюкозу и другие углеводы. В кислой среде (pH 4,5)

бактерии не растут. Диапазон температур для роста -от 5 до 42°С; при этом оптимальный температурный режим — 30-37°С. Многие виды способны синтезировать пигменты.

Рисунок 17. Бактерии рода Pseudomonas на цетримидном агаре

Из выросших на чашках подозрительных колоний сделали мазки. В мазках мы увидели грамотрицательные палочки. Затем колонии проверили с помощью оксидазного и каталазного теста. Тест на оксидазу положительный (синее окрашивание тест-полоски) (рисунок 18). Тест на каталазу также положительный (выделение пузырьков газа).

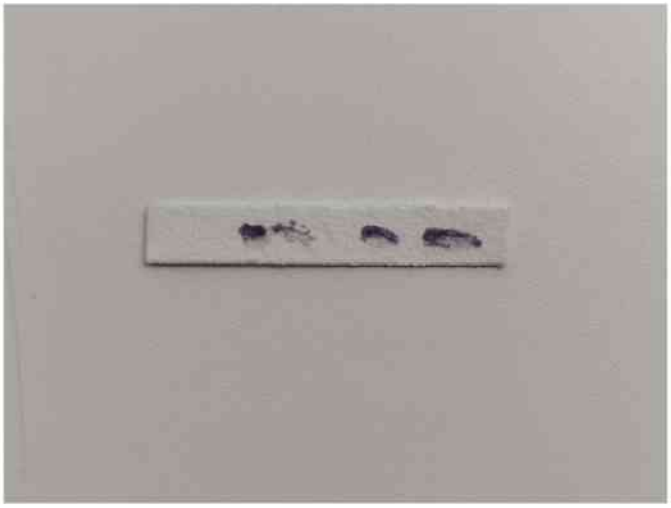

Рисунок 18. Оксидазный тест положительный

Среду Клиглера готовили следующим образом: 57,5 г сухой среды растворили в 1 л дистиллированной воды. Прокипятили в течение 1 минуты и разлили в пробирки. Затем простерилизовали автоклавированием при температуре 110^0С в течение 20 минут. После стерилизации пробирки студили пробирки в таком положении, чтобы получить скошенную часть и столбик высотой 2,5 см.

На среде Клиглера столбик и косяк красного цвета (ферментации глюкозы и лактозы не происходит) (рисунок 19). На среде Хью – Лейфсона в пробирке без масла – желтое окрашивание среды (происходит окисление), в пробирке с вазелиновым маслом – зеленое окрашивание среды. То есть тест окисление / ферментация +/-.

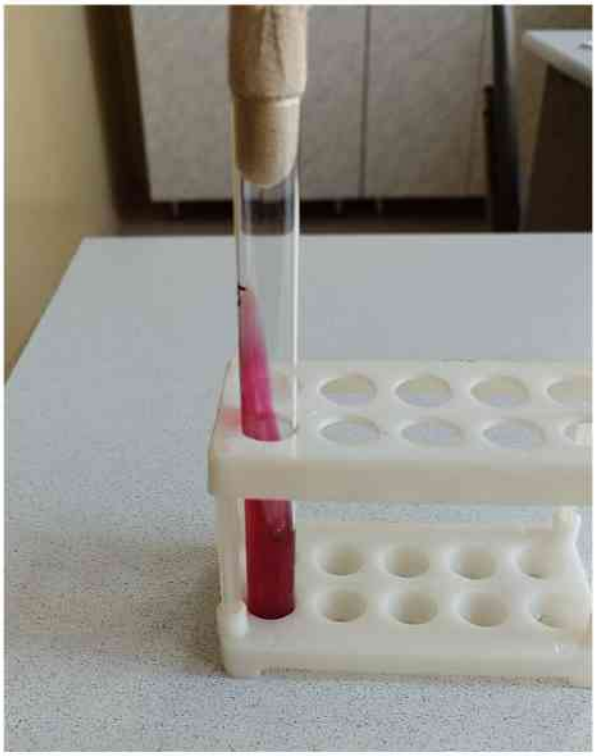

Рисунок 19. Pseudomonas на среде Клиглера

Для обнаружения сульфитредуцирующих клостридий использовали сульфитный агар. Совокупность компонентов, входящих в состав этой питательной среды, обеспечивает питательные потребности для роста клостридий и их идентификации по сульфитредуцирующему признаку: способности редуцировать сульфит до сульфида, который с ионами железа образует черный

преципитат. Сульфитный агар готовили следующим образом: В 1 литре дистиллированной воды растворяли 42 г сухой среды. Затем кипятили 2 минуты, стерилизовали автоклавированием при температуре 121 ^{0} С 15 минут. Затем разливали пробирки высоким столбиком. Сульфитредуцирующие клостридии - анаэробные грамположительные спорообразующие микроорганизмы, основным представителем которых является *Clostridium perfringens*. Широко распространены в окружающей среде. Вегетативные клетки неподвижны, лишены жгутиков. Капсулы наиболее выражены у вирулентных штаммов. На плотных средах *Clostridium perfringens* образует S- и R-колонии. S-колонии круглые, куполообразные, с гладкими ровными краями, в начале роста прозрачные, напоминающие капли росы, позднее – мутные, серовато-белые. R-колонии неправильной формы, бугристые, с шероховатыми неровными краями. Положительным результатом, то есть присутствием сульфитредуцирующих клостридий считали наличие колоний черного цвета в столбике среды (рисунок 20).

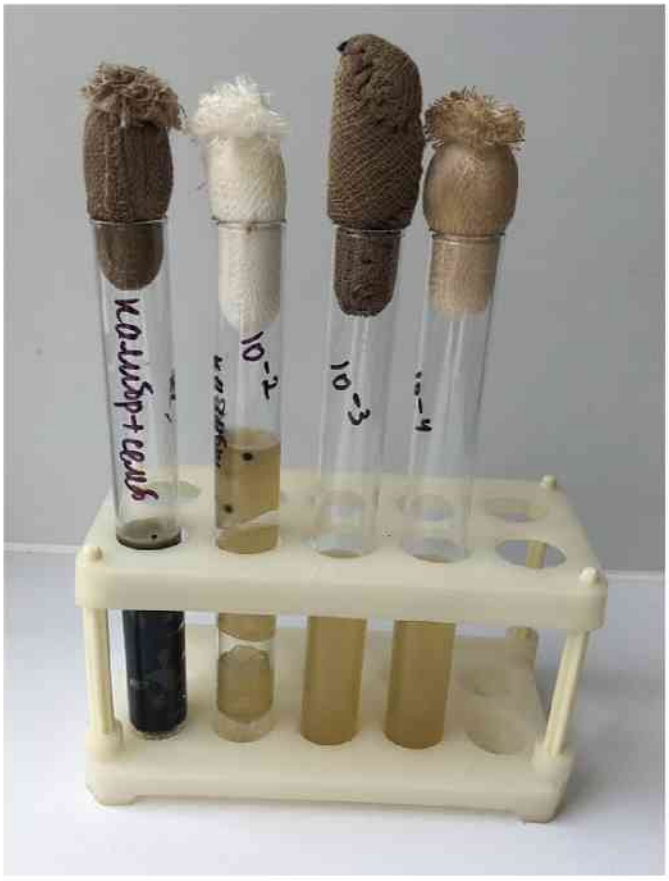

Рисунок 20. Сульфитредуцирующие клостридии на сульфитном агаре.

Для обнаружения бактерий *Bacillus cereus* использовали MYP – агар. Его готовили следующим образом: в 450 мл растворили 23 г сухой среды. Флаконы со средой автоклавировали 15 минут при температуре 121^0 С, охладили до 45 -50^0С и добавили 50 мл стерильной яично-желтковой эмульсии и содержимое 1 флакона селективной добавки для Bac.cereus. Чашки (с яичным желтком) равномерно мутны и имеют слегка оранжевый цвет (красный без яичного желтка). *Bacillus Cereus* грамположительные почвенные бактерии. Оптимальная температура роста – 30-32°С. Растут на простых питательных средах, на плотных питательных средах образует плоские, мелкобугристые, слегка вогнутые, матовые колонии. Край волнистый. Клетки крупные 1 × 3—4 мкм, эндоспоры расположены центрально, не превышают размер клетки. Положительным результатом, то есть присутствием *Bacillus Cereus* считали наличие на чашках типичных колоний розового цвета и волнистым краем с зоной преципитации вокруг колоний (рисунок 21). В мазках – крупные грам-положительные палочки (рисунок 22). На цитратном агаре Симмонса цвет среды изменяется из зеленого в синий, что свидетельствует о способности изучаемых штаммов B. cereus утилизировать цитрат натрия. *Bacillus Cereus* дают положительную реакцию на каталазу и оксидазу.

Рисунок 21. Колонии Bacillus Cereus на MYP – агаре

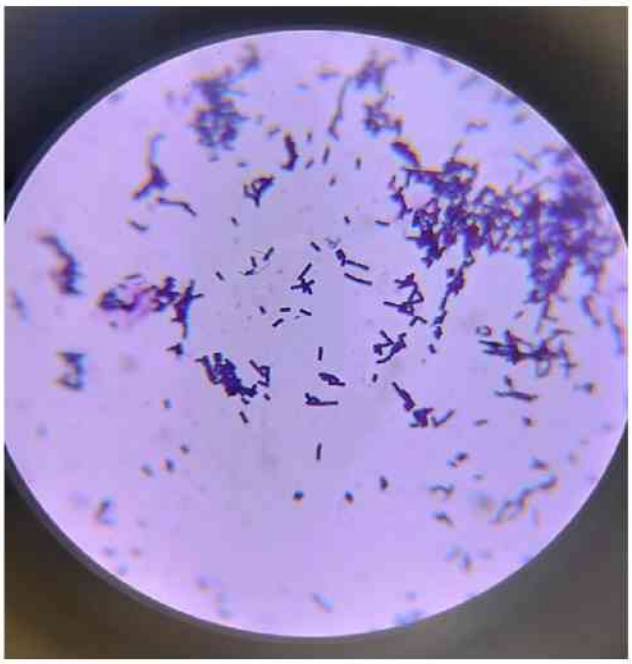

Рисунок 22. Колонии Bacillus Cereus под микроскопом

3.2 Определение количества микроорганизмов в луговом биогеоценозе и агроценозе пшеницы при использовании гербицидов

Для оценки количества микроорганизмов, развивающихся в агроценозе пшеницы при использовании гербицидной обработки растений, мы провели подсчет колоний на питательном агаре при разных разведениях. При разведениях 10^{-2} степени количество было максимальным в естественном луговом биогеоценозе (603,5 КОЕ), что связано с большим видовым разнообразием растений, которое обусловливает развитие большего числа и разнообразия микроорганизмов (таблица 1). Меньше по значению – в контрольных образцах (476,5 КОЕ). То есть в агроценозе количество бактерий снижалось на 26,6,0%. При разведениях 10^{-3} (79,8 КОЕ) и 10^{-4} (22,0 КОЕ) в почвах естественного ценоза количество колоний также максимальное по сравнению с количеством колоний в этих же разведениях при посеве образцов из агроценоза. Следовало ожидать, что после гербицидной обработки количество микроорганизмов уменьшится. Мы подтвердили данное предположение проведенными исследованиями.

Таблица 1 – Количество колоний микроорганизмов на питательном агаре в разведениях

Вариант	Количество колоний микроорганизмов на питательном агаре в разведениях		
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Биогеоценоз	603,5	79,8	22,0
Контроль (агроценоз пшеницы без обработки)	476,5	50,5	13,5
Калибр	329,0	36,5	4,8
Хакер	295,0	38,0	3,5
Агрокиллер	293,5	33,5	4,0
Бис 300	337,5	43,5	5,0
Лазурит	304,5	41,5	4,5
Калибр + альбит	434,5	48,0	10,3

При исследовании образцов почвы после применения различных гербицидов в агроценозе пшеницы установлено, что в разведении 10^{-2} количество КОЕ составляло от 293,5 до 337,5 в зависимости от вида гербицида, что меньше, чем в контрольных образцах на 29,2-37,6%. Это же можно наблюдать и в разведениях 10^{-3} (от 33,5 до 43,5 КОЕ) и 10^{-4} (от 3,5 до 4,8 КОЕ). Максимальный негативный эффект на биологическое состояние почвы оказали гербициды Хакер и Агрокиллер.

Но на некоторые обработанные гербицидами образцы был наложен альбит. Альбит – это биопрепарат, который снимает гербицидный стресс. Он является фунгицидом, регулятором роста, защищает растения от различных болезней.

При добавлении Альбита к гербицидам, повышается урожайность сельскохозяйственных культур. Он относится к 4 классу опасности, т.е. практически не токсичен. При исследовании образцов почвы из-под расте-

ний, обработанных гербицидами с добавлением Альбита в разведениях с 10^{-2} по 10^{-4} КОЕ увеличилось, и было близко к значениям в контрольном варианте. В разведении 10^{-2} оно стало 434,5 КОЕ (калибр +альбит), в разведении 10^{-3} – 48,0 КОЕ (калибр + альбит), в разведении 10^{-4} - 10,3 КОЕ (калибр + альбит).

Подсчитав количество колоний на питательном агаре, мы сделали пересчет содержания КОЕ в 1 г почвы по формуле. Результаты внесли в таблицу 2. Самое большое количество микроорганизмов в 1 г почвы (797500) – в биогеоценозе. Несколько меньшее содержание (505000) – в агроценозе пшеницы без обработки гербицидами. После применения гербицидов количество КОЕ в 1 г почвы составляло от 335000 до 435000, что меньше, чем в контрольных образцах. При наложении альбита содержание КОЕ в 1г почвы увеличилось до 480000.

Таблица 2 – Содержание колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г почвы

Вариант	Количество КОЕ в 1г почвы
Биогеоценоз	797500
Контроль (агроценоз пшеницы без обработки)	505000
Калибр	365000
Хакер	380000
Агрокиллер	335000
Бис 300	435000
Лазурит	415000
Калибр + альбит	480000

3.3 Анализ биологического состояния почв по наличию бактерии рода Azotobacter

Азотобактер используют и в экологическом мониторинге. Например, бактерии рода Azotobacter традиционно используются как индикаторы химического загрязнения почвы [41]. Для оценки содержания в почве азотобактера мы провели подсчет колоний, которыми обросли комочки почвы на среде Эшби и посчитали процент обрастания колониями азотобактера (таблица 3).

Таблица 3 – Число колоний и процент обрастания по Azotobacter

Варианты	Число выросших колоний азотобактера на среде Эшби, шт	Процент обрастания комочков почвы колониями азотобактера,%
Биогеоценоз	8,0	16
Контроль (агроценоз пшеницы без обработки)	25,5	51
Калибр	26,0	52
Хакер	23,5	47
Агрокиллер	16,5	33
БИС-300	26,5	53
Лазурит	22,5	45
Калибр + альбит	36,0	72

В биогеоценозе число выросших колоний азотобактера (8 шт.) гораздо меньше, чем в контрольных образцах (25,5 шт.). Поэтому и процент обрастания комочков почвы колониями азотобактера тоже ниже, чем в контрольных образцах агроценоза (16 % и 51 % соответственно). После гербицидной обработки, число выросших колоний азотобактера по сравнению с контрольными образцами изменилось незначительно (кроме варианта с гербицидом Агрокиллер, где оно снизилось на 45,5% (16,5 шт.). Число выросших колоний со-

ставило от 22,5 до 26 шт.). То есть обработка гербицидами не оказала существенного влияния на рост азотобактера. При исследовании образцов почвы, где был добавлен альбит, число выросших колоний азотобактера увеличилось до 36 шт. (калибр + альбит). Процент обрастания комочков почвы колониями азотобактера также увеличился до 72%.

3.4 Содержание микробных клеток в естественном ценозе и агроценозе под действием гербицидной обработки

В исследованиях было проведено определение наличия основных азотфиксирующих бактерий в почвенных образцах (таблица 4).

Таблица 4 – Наличие бактерий в почве лугового биогеоценоза и агроценоза пшеницы

Варианты	Масляно-кислые клостридии	Сульфит-редуци-рующие клостри-дии	Число выросших колоний Klebsiella planticola	Число выросших колоний Pseudomo-nas spp	Число выросших колоний Bacillus Cereus
Биогеоценоз	В 1 г рост + 10^{-1}рост + 10^{-2} рост - 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-1}рост + 10^{-2} рост + 10^{-3} рост + 10^{-4} рост -	10^{-2} – 8,0 10^{-3} – 2,0 10^{-4} – 0	10^{-1} – 70,0 10^{-2} – 14,0 10^{-3} – 0	10^{-2} – 12,5 10^{-3} – 2,5 10^{-4} – 0
Контроль (агроценоз пшеницы без обработки)	В 1 г рост + 10^{-1}рост + 10^{-2} рост - 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-1}рост + 10^{-2} рост + 10^{-3} рост + 10^{-4} рост -	10^{-2} – 0 10^{-3} – 0 10^{-4} – 0	10^{-1} - 2 10^{-2} - 0 10^{-3} – 0	10^{-2} – 9,5 10^{-3} – 2,3 10^{-4} – 0

Таблица 4. Продолжение

Калибр	В 1 г рост + 10^{-1} рост - 10^{-2} рост - 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-1}рост + 10^{-2} рост + 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-2} – 0 10^{-3} – 0 10^{-4} – 0	10^{-1} - 0,5 10^{-2} - 0 10^{-3} – 0	10^{-2} – 6,5 10^{-3} – 1 10^{-4} – 0
Хакер	В 1 г рост + 10^{-1} рост - 10^{-2} рост - 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-1}рост + 10^{-2} рост + 10^{-3} рост + 10^{-4} рост -	10^{-2} – 0 10^{-3} – 0 10^{-4} – 0	10^{-1} - 1 10^{-2} - 0 10^{-3} – 0	10^{-2} – 8,5 10^{-3} – 1 10^{-4} – 0
Агро- киллер	В 1 г рост + 10^{-1} рост - 10^{-2} рост - 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-1}рост + 10^{-2} рост + 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-2} – 0 10^{-3} – 0 10^{-4} – 0	10^{-1} – 1,3 10^{-2} - 0 10^{-3} – 0	10^{-2} – 6,0 10^{-3} – 0,5 10^{-4} – 0
БИС-300	В 1 г рост + 10^{-1} рост - 10^{-2} рост - 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-1}рост + 10^{-2} рост - 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-2} – 0 10^{-3} – 0 10^{-4} – 0	10^{-1} - 1 10^{-2} - 0 10^{-3} – 0	10^{-2} – 1,5 10^{-3} – 0 10^{-4} – 0
Лазурит	В 1 г рост + 10^{-1} рост - 10^{2} рост - 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-1}рост + 10^{-2} рост + 10^{-3} рост + 10^{-4} рост -	10^{-2} – 0 10^{-3} – 0 10^{-4} – 0	10^{-1} - 1,3 10^{-2} - 0 10^{-3} – 0	10^{-2} – 3,0 10^{-3} – 0 10^{-4} – 0

Таблица 4. Продолжение

Калибр+ альбит	В 1 г рост + 10^{-1} рост - 10^{-2} рост - 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-1}рост + 10^{-2} рост + 10^{-3} рост - 10^{-4} рост -	10^{-2} – 0 10^{-3} – 0 10^{-4} – 0	10^{-1} - 1,5 10^{-2} - 0 10^{-3} – 0	10^{-2} – 10,0 10^{-3} – 2,8 10^{-4} – 0

Для оценки содержания в почве масляно-кислых клостридий мы отметили, в каких разведениях среды Виноградского имеются признаки роста. При посеве 1 г почвы положительный результат был во всех вариантах. В биоценозе и контрольных образцах результат оказался одинаковым, то есть рост отмечался в первом и втором разведениях. При посеве образцов из почв, где растения были обработаны гербицидами, а также при добавлении Альбита наличие масляно-кислых клостридий было только в первом разведении.

Для оценки содержания в почве сульфит-редуцирующих клостридий мы установили, в каких разведениях в сульфитном агаре имеется рост характерных колоний. В биогеоценозе и контрольных образцах агроценоза результаты оказались равные, рост сульфит-редуцирующих клостридий обнаружили в первом, втором и третьем разведении. Такие же показатели были и в вариантах с гербицидной обработкой - Хакер и Лазурит. При обработке образцов гербицидами Калибр, Агрокиллер, а также в вариантах с добавлением альбита положительный результат отмечался только в первом и втором разведениях.

Для оценки содержания в почве бактерий рода *Klebsiella* мы провели подсчет выросших характерных колоний на среде Эндо. Мы обнаружили микроорганизмы *Klebsiella planticola* только в биогеоценозе (в разведении 10^{-2} – 8 колоний, в разведении 10^{-3} – 2 колонии). При посеве контрольных образцов эти микроорганизмы мы не обнаружили. При посеве образцов после гербицидной обработки, а также тех образцов, где дополнительно был наложен альбит, роста бактерий рода *Klebsiella* также не было.

Для оценки содержания в почве бактерий рода *Pseudomonas*, мы провели подсчет колоний на цетримидном агаре. Максимальное количество колоний было в биогеоценозе (в разведении 10^{-1} – 70 колоний, в разведении 10^{-2} – 14 колоний). Намного меньше по значению – в контрольном образце (в разведении 10^{-1} – 2 колонии, в разведении 10^{-2} бактерии рода *Pseudomonas* не обнаружены). При посеве образцов почвы, обработанных гербицидами, количество колоний незначительно уменьшилось (от 0,5 КОЕ до 1,3 КОЕ). При посеве образцов почвы, обработанных гербицидами с добавлением Альбита, количество колоний немного увеличилось до 1,5 КОЕ (калибр + альбит).

Для оценки содержания в почве *Bacillus Cereus* мы провели подсчет колоний на MYP – агаре. В биогеоценозе мы обнаружили максимальное количество колоний (во втором разведении – 12,5 КОЕ, в третьем разведении – 2,5 КОЕ). В контрольных образцах содержание *Bacillus Cereus* не намного уменьшилось (во втором разведении – 9,5 КОЕ, в третьем разведении – 2,3 КОЕ). При посеве образцов почвы после гербицидной обработки количество выросших колоний снизилось (от 1,5 КОЕ до 8,5 КОЕ в разведении 10^{-2}). При исследовании образцов почвы, обработанной гербицидами с наложением Альбита, как и следовало ожидать, количество колоний увеличилось до 10 КОЕ (калибр + альбит) – во втором разведении и 2,75 КОЕ (калибр + альбит) – в третьем разведении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показатели биологической активности почв наряду с параметрами химических и физических свойств необходимы для характеристики состояния почвы как биологической системы и оценки степени ее повреждения при антропогенном воздействии.

Вследствие биохимических превращений, которые осуществляют микроорганизмы, в почве происходят важнейшие процессы круговорота веществ, почвообразования, детоксикации ксенобиотиков, самоочищения почвы. Ассоциация почвенных микроорганизмов является категорией экологической и функционирует как единое целое благодаря взаимосвязанным метаболическим реакциям. Ингибирующий эффект разных загрязнений приводит к выпадению чувствительных видов, распаду микробных ценозов, потере биохимической активности почвы и в итоге к гибели микроорганизмов и деградации экосистем.

Широкое использование средств защиты растений в технологии возделывания сельскохозяйственных культур может оказывать негативное влияние на почвенную биоту, что приведет к снижению ее плодородия и вызовет падение урожайности.

В результате проведенных исследований было установлено, что биологическая активность почв в агроценозе пшеницы сорта Фотинья незначительно снижается по сравнению с показателями естественного лугового биогеоценоза. Использование гербицидной обработки растений в период вегетации вызывает снижение общего количества микроорганизмов в прикорневой зоне растений. Максимальный ингибирующий эффект отмечен при использовании препаратов Хакер и Агрокиллер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 17.4.4.02-2017. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. Введ. с 2019-01-01. М., 2017. 9с.
2. ГОСТ Р 54653-2011. Удобрения органические. Методы микробиологического анализа. Введ. с 2011-12-13. М., 2012. 24с.
3. Методические указания МУК 4.2.3695-21. Методы микробиологического контроля почвы. М., 2021. 21с.
4. Аглеева В.А., Золотарева В.С., Капаева А.В. Определение бактерий рода Azotobacter, выделенных из почв естественных экосистем и участков приусадебных хозяйств // Юный ученый. 2021. №4. С. 28-31.
5. Алферов А.А. Ассоциативный азот, урожай и устойчивость агроэкосистемы. Москва: РАН, 2020. 184 с.
6. Апарин Б.Ф. Почвоведение. Москва: Академия, 2014. 256 с.
7. Артамонова М.Н., Алексеева А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. Антагонистическая активность ассоциативных ризобактерий // Международный журнал экспериментального образования. 2013. № 10. С. 276-279.
8. Бабайцева В.А. Почвенные анаэробные бактерии рода Clostridium и их роль в транформации пуриновых и пиримидиновых соединений: Автореф. канд. дисс. 1978.
9. Беззубенкова О.Е., Нестерова Н.И., Юхлимова М.Н. Микрофлора ризосферы и ризопланы и её влияние на растительный организм // Естественные и технические науки. 2012. Т. 4. С. 99-102.
10. Базилинская М.В. Ассоциативная азотфиксация злаковыми культурами. Москва, 1988. 43с.
11. Белимов А.А., Иванчиков А.Ю., Юдкин Л.Ю. Характеристика и интродукция новых штаммов ассоциативных ростстимулирующих бактерий, доминирующих в ризоплане проростков ячменя // Микробиология. 1999. С. 392-397.

12. Бонарцева Г.А. Биосинтез альгинатов бактериями рода Azotobacter // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. №1. С.61-68.
13. Вавилов П.П., Гриценко В.В., Кузнецов В.С. Растениеводство. – 5-е изд., перераб. и доп. Москва: Агропромиздат, 1986. 512 с.
14. Вальков В.Ф., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Почвоведение. Москва: Юрайт, 2013. 527 с.
15. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) / А.И. Шапошников [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3. С. 16-22.
16. Вечернина Н. А. Практикум по микробиологии. Барнаул: Изд-во Алт-ГУ, 2007. 80 с.
17. Волкова И.Н. Экологическое почвоведение. Ярославль, 2013. 112 с.
18. Гажеева Т. П., Гордеева Т. Х., Масленникова С. Н. Динамика численности и состава микроорганизмов ризосферы некоторых злаковых растений в процессе их роста и развития // Вестник ОГУ. 2011. № 12. С. 328-330.
19. Ганжара Н.Ф. Почвоведение. Москва: Агроконсалт, 2001. 392 с.
20. Горбылева А.И., Воробьев В.Б., Петровский Е.И. Почвоведение. Москва: Новое знание, 2015. 400 с.
21. Гордеева Т. Х. Формирование микробно-растительных сообществ ризосферы в онтогенезе зерновых культур // Научный журнал КубГАУ. 2012. № 81. С. 611-620.
22. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. Москва: ИКЦ «Академкнига», 2002. 282 с.
23. Емцев В.Т., Микробиология. Жизнь растений. Том 1. Введение. Бактерии и актиномицеты. Москва: Юрайт, 2017. 456с.
24. Емцев В. Т., Мишустин Е.Н. Сельскохозяйственная микробиология: учебник для академического бакалавриата. Москва: Издательство Юрайт, 2018. 205 с.

25. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.Л., Зенова Г.М. Биология почв. Москва: Изд-во Моск. ун-та, 2005. 445 с.
26. Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Лысак Л.В. Растения как центры формирования бактериальных сообществ почв // Журнал общ. биол. – 1993. Т. 54, № 2. С. 183-199.
27. Иванов В.П. Корневые выделения и их значение в жизни фитоценозов. Москва: Наука,1973. 193 с.
28. Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 9. С. 28-33.
29. Клебанович, Н. В., Ефимова И.А., Чиж Д.А. Биология почв: учеб. материалы по спецкурсу «Биофизика почв» для студентов специальности 1-01 02 01 «География». Минск: БГУ, 2018. 46 с.
30. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. Москва: Изд-во Моск.ун-та, 1989. 175 с.
31. Кожевин П.А. Экология почвенных микроорганизмов. Москва: Академия, 2004. С. 71-94.
32. Кретович В.Л. Биохимия усвоения азота воздуха растениями. Москва, 1994.
33. Ксенофонтов Б.С. Основы микробиологии и экологической биотехнологии. Москва: Инфра-М, 2015. 224 с.
34. Кунакова А.М. Взаимодействие ассоциативных ризобактерий с растениями при различных агроэкологических условиях: Автореф. дис. канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 1998. 18 с.
35. Литвина Л.А. Микробиота различных сред обитания: краткий обзор курса дисциплины: учебное пособие / Новосиб. гос. аграр. ун-т, Биолого-технолог. ун-т. Новосибирск: ИЦ «Золотой колос», 2021. 70 с.
36. Мамай А.В. Микробная трансформация соединений азота и углерода в лесных почвах средней тайги (на примере Карелии): Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 2014.

37. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие. Том 3. Москва: Лабора, 2009. 880 с.
38. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под редакцией Д. Г. Звягинцева. Москва: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
39. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Почвенные азотфиксирующие бактерии рода Clostridium. Москва: Издательство «Наука», 1974. 250 с.
40. Ризосферные бактерии / Н.В. Феоктистова [и др.] // ученые записки Казанского университета. Сер. Естеств. науки. 2016. Т.158 кн.2. С.207 - 224.
41. Трифонова Т.А., Сахно О.Н., Забелина О.Н., Феоктистова И.Д. Сравнительная оценка состояния городских почв по их биологической активности // Вестн. Моск. Ун-та. сер. 17 Почвоведение. 2014 №3. С. 23-27.
42. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. Москва: ГЕОС, 2007. 137 с.
43. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1986. 133 с.
44. Широких А. А., Мерзаева О. В. Методические подходы к изучению микроорганизмов прикорневой зоны растений // Сельскохозяйственная биология. 2007. № 1. С. 43-55.
45. Ягодин Б.А., Жуков Ю.П., Кобзаренко В.И. Агрохимия. Москва: Колос, 2002. 584 с.