

Экологическое почвоведение



Министерство образования Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова
Кафедра ботаники и микробиологии

Экологическое почвоведение

**Лабораторные занятия
для студентов-экологов (бакалавров)
*Методические указания***

Ярославль 2002

Составители: **И.Н. Волкова, Г.В. Кондакова**

ББК Е56я73

В 67

УДК 631.4+579.64:631.46

Экологическое почвоведение: Лабораторные занятия для студентов-экологов (бакалавров): Метод. указания / Сост. И.Н. Волкова, Г.В. Кондакова; Яросл. гос. ун-т. - Ярославль, 2002. 35 с.

Приведены описания лабораторных занятий по экологическому почвоведению. Подбор тем занятий направлен на выработку у студентов-экологов навыков эколого-почвенного мониторинга на основании изучения физических, химических свойств почвы и ее биогенности.

Табл. 10. Библиогр.: 12 назв.

Печатается по решению научно-методического совета Ярославского государственного университета.

Рецензент: кафедра ботаники и микробиологии Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова.

© Ярославский государственный университет, 2002

© И.Н. Волкова, Г.В. Кондакова, 2002

Рабочая программа лабораторных занятий

Тема 1. Общие физические свойства почв.

- 1.1. Определение удельного веса (плотности) твердой фазы почвы.
- 1.2. Определение объемного веса почвы из рассыпного образца.
- 1.3. Определение порозности (скважности) и степени аэрации почвы.

Тема 2. Биологическая активность почв.

- 2.1. Определение целлюлазной активности почвы.
 - 2.1.1. Определение интенсивности разложения целлюлозы.
 - 2.1.2. Определение интенсивности накопления белков и аминокислот.
- 2.2. Определение потребности почв в биогенных элементах.
 - 2.2.1. Ориентировочный учет потребности почвы в фосфоре, калии, кальции.

Тема 3. Загрязнение почв.

- 3.1. Диагностика присутствия антибиотиков в почве
- 3.2. Фитотоксичность почвы.
 - 3.2.1. Определение фитотоксичности методом проростков.
 - 3.2.2. Определение фитотоксичности по азотобактеру (метод Н.А. Красильникова).
- 3.3. Многокомпонентная тест-система для оценки токсичности почвенного покрова городов.

Тема 4. Комплексная диагностика деградации почв.

- 4.1. Определение мощности органогенного горизонта.
- 4.2. Определение удельного и объемного веса почвы.
- 4.3. Определение окислительно-восстановительного потенциала почвы.
- 4.4. Фитотоксичность почвы.
- 4.5. Определение ферментативной активности почвы.

Приложение

Литература

1. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ, 1987. 236 с.
2. Кабиров Р.Р., Сагитова А.Р., Суханова Н.В. Разработка и использование многокомпонентной тест-системы для оценки токсичности почвенного покрова городской территории // Экология. 1997. № 6. С. 408 - 411.
3. Малый практикум по низшим растениям: Учеб. пособие для студентов-биологов. М.: Высшая школа, 1976. 216 с.
4. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учеб. пособие / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
5. Мудрецова-Висс К.А., Колесник С.А., Гринюк Т.Н. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Экономика, 1975. 167 с.
6. Почвенно-экологический мониторинг и охрана почв: Учеб. пособие / Под ред. Д.С. Орлова, В.Д. Василевской. М.: Изд-во МГУ, 1994. 272 с.
7. Почвоведение / Под ред. И.С. Кауричева. М.: Агропромиздат, 1989. 720 с.
8. Практикум по почвоведению: Учеб. пособие / Под ред. И.С. Кауричева. М.: Колос, 1980. 272 с.
9. Рубенчик Л.И. Микроорганизмы - биологические индикаторы. Киев: Наукова думка, 1972. 163с.
10. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во МГУ, 1983. 215 с.
11. Экологическая роль микробных метаболитов / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1986. 240 с.
12. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении: Учеб. пособие / Д.С. Орлов, Л.К. Садовникова, И.Н. Лозановская. М.: Высшая школа, 2002. 334 с.

Введение

Экологическое почвоведение – область науки о почвах, изучающая условия жизни различных организмов в почвенном слое как в природных биогеоценозах, так и в антропогенно измененных.

Почва, выполняя ряд важнейших планетарных и экологических функций (поддержание жизни на Земле, взаимодействие большого и малого круговоротов веществ, регулирование состава атмосферы и гидросферы, и др.), является геомембраной, влияющей на протекание большинства процессов в биосфере. При этом особенность почвы - это медленное накопление изменений (высокая буферность) и еще более медленное восстановление утраченных функций. Поэтому одной из важнейших практических задач экологического почвоведения является экологический почвенный мониторинг, основы которого в настоящее время только начинают разрабатываться. По мнению *Д.С. Орлова* (Орлов и др., 2002), в основе почвенного мониторинга должны лежать следующие основные принципы:

- 1) разработка методов контроля за наиболее уязвимыми свойствами почв, изменение которых может вызвать потерю плодородия, ухудшения качества растительной продукции, деградацию почвенного покрова;
- 2) постоянный контроль за важнейшими показателями почвенного плодородия;
- 3) ранняя диагностика негативных изменений почвенных свойств;
- 4) разработка методов контроля за сезонной динамикой почвенных процессов.

Почва - многокомпонентное природное биокосное тело, обладает многообразными свойствами, но наиболее уязвимы из них лишь немногие. К ним относятся (по Орлову, 2002): содержание гумуса, кислотно-щелочной баланс и состав обменных катионов, биогенность почвы. Опасными для почвы являются эрозия и дефляция, загрязнение различными веществами и угнетение почвенной биоты. Все перечисленные свойства обладают значительной буферностью, а опасные процессы нарастают медленно. Поэтому мониторинг почв позволяет уже на ранних стадиях отслеживать начавшиеся изменения и предупреждать их последствия.

Часть почвенных показателей, используемых для слежения за состоянием природной среды, уже были рассмотрены ранее, в лабораторном практикуме по общему почвоведению, и знакомы студентам-

экологам (это содержание гумуса, кислотно-основные свойства почв, состав обменных катионов). Поэтому настоящее руководство предполагает рассмотрение других почвенных свойств и процессов, используемых в эколого-почвенном мониторинге: уплотнение почв, угнетение почвенной биоты, фитотоксичность, диагностика состояния почв на основе использования комплекса почвенных свойств и различных тест-объектов.

Тема 1. Общие физические свойства почв

Почва, как любое природное тело, обладает такими физическими свойствами, как удельный и объемный вес, порозность, пластичность, усадка, набухание и др. Эти свойства имеют большое значение для протекания процессов почвообразования, влияют на плодородие, а из прикладных областей - особенно учитываются физические свойства в строительном деле (инженерная геология и грунтоведение).

Основная масса физических свойств почв весьма консервативна и мало меняется под влиянием антропогенного воздействия (особенно свойства, связанные с минералогическим и гранулометрическим составом). Наиболее информативными для целей диагностики и мониторинга можно считать объемный вес почв и ее скважность (порозность). Именно эти величины значительно меняются при возрастании рекреационной нагрузки, почва уплотняется, изменяется ее порозность, аэрация нарушается, изменяются условия жизни всех почвенных обитателей – от микронаселения до высших растений и позвоночных животных. Такая уплотненная, частично или полностью лишенная растительности почва становится очень неустойчивой к водной и ветровой эрозии. Недеградированной считается почва, у которой превышение плотности по сравнению с контролем не более чем в 1,1 раза. Очень сильно деградирована почва с плотностью, превышающей плотность ненарушенной почвы в 1,4 раза.

Ниже приводятся определения удельного и объемного веса почвы, а также ее порозности и степени аэрации. Так как все эти физические параметры почв взаимосвязаны, то работы выполняются одновременно разными бригадами студентов, что позволяет дать интегральную характеристику исследуемого почвенного образца.

1.1. Определение удельного веса (плотности) твердой фазы почвы

Удельным весом почвы называется отношение массы твердой фазы почвы в сухом состоянии к массе равного объема воды. Таким образом, *удельный вес* - это вес в граммах одного кубического сантиметра твердой фазы сухой почвы.

Величина удельного веса зависит от минералогического состава почвы и от входящей в нее органики. Из-за многокомпонентного состава почв ее плотность - интегрированное значение плотностей всех компонентов твердой фазы: первичных, вторичных минералов и органических соединений. Наиболее распространенные составляющие твердой фазы имеют следующие значения плотности (в г/см³):

кварц	2,65
глинистые минералы	2,60
гипс	2,30
гидрогетит	4,00
перегной	1,40
торф (разной зольности)	1,40 - 1,70

В почвах с высоким содержанием гумуса (чернозем, 10%) плотность равна 2,4 г/см³, а в малогумусных (дерново-подзолистая, 2,5%) - 2,6 г/см³. Плотность нижних (минеральных) горизонтов с незначительным количеством органики близка к таковой наиболее распространенных минералов: 2,6 - 2,7 г/см³.

Удельный вес определяют пикнометрическим способом: для вычисления нужно знать объем и вес твердой фазы почвы. Объем в этом случае определяется путем вытеснения воды, взятой навеской почвы. Знание удельного веса необходимо при определении скважности почвы.

Ход работы:

1. Методом квартования отбирают среднюю пробу образца (в воздушно-сухом состоянии). Растирают ее в ступке и пропускают через сито с отверстиями 1 мм.

2. Проводят определение гигроскопической воды:

а) из средней пробы берут навеску 5 г, переносят ее в бюкс известной массы и помещают в термостат с температурой 100 - 105⁰С;

б) через 1,5 - 2 часа извлекают бюкс из термостата, закрывают крышкой и ставят в эксикатор для охлаждения;

в) после охлаждения определяют массу бюкса с почвой;

г) затем бюкс снова помещают в термостат на 30 минут и повторяют операцию взвешивания. Если масса не уменьшилась, можно рассчитывать гигроскопическую воду;

д) содержание гигроскопической воды определяют по формуле:

$$W = \frac{P_1 - P_2}{P_2 - P_0} \times 100,$$

где P_0 - масса бюкса без почвы;

P_1 - масса бюкса с почвой до высушивания;

P_2 - масса бюкса с почвой после высушивания;

(масса бюкса везде определяется с крышкой).

3. Пикнометр на 100 см³ заполняют прокипяченной (для удаления воздуха) и охлажденной дистиллированной водой и определяют его массу на технических весах. Из пикнометра примерно половину воды отливают в стакан.

4. Взвешивают 10 г средней пробы и переносят навеску в пикнометр.

5. Пикнометр с навеской почвы кипятят 30 минут на плитке с асбестовой сеткой для удаления воздуха из почвенных агрегатов.

6. Пикнометр охлаждают, доливают дистиллированную воду до черты и определяют массу на технических весах.

7. Величину плотности вычисляют по формуле:

$$d = \frac{P}{(P_1 + P) - P_2},$$

где d - плотность (удельный вес) почвы;

P_0 - масса абсолютно сухой почвы;

P_1 - масса пикнометра с водой;

P_2 - масса пикнометра с водой и почвой.

$$P = \frac{P_0 \times 100}{100 + W},$$

где P_0 - масса воздушно-сухой почвы;

W - содержание гигроскопической влаги в процентах.

1.2. Определение объемного веса почвы из рассыпного образца

Объемным весом почвы называется вес единицы ее объема (вес почвы со всеми порами и промежутками). Объемный вес почвы зависит от механического состава, содержания органики, структуры и сложения. В почвенном профиле верхние горизонты имеют меньший объемный вес, чем нижние. Так, объемный вес пахотного слоя меняется от 0,8 до 1,6 г/см³, объемный вес почвы с небольшим содержанием гумуса - около

1,3 - 1,6, а нижние почвенные горизонты с плотным сложением – 1,6 - 1,8 г/см³.

Знание объемного веса почвы позволяет высчитывать содержание воды, воздуха, питательных веществ в любом почвенном горизонте и диагностировать начавшиеся изменения.

Ход работы:

1. На дно металлического цилиндра (высотой примерно 10 см и диаметром 5 см, с сетчатым дном) положить кружок фильтровальной бумаги и взвесить цилиндр на техно-химических весах.

2. Насыпать в цилиндр почву из нерастертого образца, уплотняя ее по мере наполнения (постукиванием о ладонь). Одновременно определить влажность почвы.

3. Измерить высоту слоя почвы, диаметр цилиндра и определить объем почвы:

$$V = \pi r^2 h ,$$

где $\pi = 3,14$; r - радиус цилиндра;

h - высота цилиндра.

4. Взвесить цилиндр с почвой и произвести расчеты.

$$d_v = \frac{P}{V} ,$$

где d_v - объемный вес почвы (г/см³);

V - объем цилиндра (см³);

P - вес сухой почвы (г).

$$P = \frac{A \times 100}{100 + a} ,$$

где A - вес влажной почвы (г);

a - влажность почвы в % (если определяют объемный вес воздушно-сухой почвы, то a - гигроскопическая влажность).

Более точное представление об объемном весе почвы в ее естественном залегании дает объемный вес почвы с ненарушенным сложением. В этом случае почвенный цилиндр с заранее известным весом заполняется вырезанным из ненарушенного почвенного горизонта монолитом. Это делается следующим образом. В почвенном разрезе выделить генетические горизонты, из которых будут отбираться пробы. Снять с цилиндра обе крышки и врезать его в почву с помощью деревянного молотка до полного погружения в почву. Сверху закрыть крышкой, окопать и внизу срезать ножом вровень с краями, закрыть нижней крышкой. Пробы следует брать в 3 - 6-кратной повторности из каждого горизонта. Цилиндр взвешивают, затем из него берут навеску почвы для определения влажно-

сти. Расчет объемного веса ненарушенного образца (d_v^*) ведут по тем же формулам, что и объемного веса рассыпного образца.

1.3. Определение порозности (скважности) и степени аэрации почвы

Порозностью, или **скважностью**, называется суммарный объем пор и пустот между частицами почвы в единице объема. Ее выражают в процентах от объема почвы.

Порозность зависит от механического состава, структуры и сложения. В разных почвообразующих породах порозность имеет следующие значения:

глина	44 - 50%
лесс	~ 45 %
песок	35 – 40%

Порозность почвы меняется от 26 до 65%. Наибольшей порозностью обладают почвы с хорошо выраженной структурой, наименьшей – песчаные и оглеенные почвы.

Скважность - важная агрономическая характеристика, так как она обуславливает ряд важнейших почвенных свойств и процессов. Со скважностью связаны: влагоемкость, водопроницаемость, водоподъемная способность, интенсивность биохимических процессов и их направление. Эти свойства и процессы зависят от размера и соотношения крупных и мелких пор. Скважность делят на общую, капиллярную и некапиллярную. Капиллярная скважность равна объему капиллярных промежутков, а некапиллярная объему крупных некапиллярных промежутков. Сумма той и другой скважности составляет общую скважность.

Для пахотных горизонтов дерново-подзолистых почв лучшим будет такое сочетание, когда общая скважность 50 - 60%, при этом половина или чуть больше общей скважности приходится на долю некапиллярной скважности. При таком соотношении обеспечивается наиболее благоприятное соотношение водного и воздушного режима и лучше условия для микробиологической деятельности.

Общую скважность рассчитывают на основании удельного и объемного веса по формуле:

$$\Pi = \left(1 - \frac{d_v^*}{d}\right) \times 100,$$

где Π - порозность в процентах от объема почвы;

d_v^* - масса почвы с ненарушенным сложением в единице объема;

d - плотность почвы.

Степень аэрации (воздухообеспеченности) почвы характеризуется объемом, занятым почвенным воздухом в 100 см^3 . Степень аэрации является важным показателем состояния почв и зависит от заполненности пор почвы водой. Когда вода заполняет все поры, развиваются восстановительные процессы, угнетающие развитие растений и многих представителей микрораселения почв. Степень аэрации определяют по формуле:

$$V_a = \Pi - W \cdot \frac{1}{2} d_v^*$$

где V_a - объем воздуха на 100 см^3 почвы;

Π - порозность в процентах к объему почвы;

W - влажность в процентах к массе почвы;

d_v^* - масса почвы с ненарушенным сложением в единице объема, в г/см^3 .

Все данные, полученные при изучении физических свойств почв, заносят в таблицу (табл. 1).

Таблица 1

Номер образца	Удельный вес (плотность) образца, d	Объемный вес рассыпного образца, d_v	Объемный вес ненарушенного образца, d_v^*	Порозность (в %) и степень аэрации, Π и V_a
---------------	---------------------------------------	--	---	---

Тема 2. Биологическая активность почв

Ценным дополнением к характеристике общих физических свойств почвы является определение ее биологической активности, или биогенности. Под **биологической активностью** понимается суммарная активность различных процессов, протекающих в почве с участием почвенной биоты (микроорганизмов, беспозвоночных и позвоночных животных, высших растений). Этот важный показатель, пригодный в том числе и для ранней диагностики негативных процессов в почве, находят, как правило, по косвенным признакам. Сравнительно простой прием, позволяющий оценить суммарную активность почвенных организмов, разлагающих органическое вещество и выделяющих CO_2 , состоит в определении так называемого дыхания почвы, или эмиссии почвой CO_2 . Однако надо помнить, что этот показатель очень динамичен и меняется не только по сезонам года, но и в течение суток (суточная динамика), а также с изменением погодных условий. Существуют также приемы оценки деятельности почвенных микроорганизмов по уровню азотфиксации, нитрификации. Среди других методов более привлекательны методы определения ферментативной активности почвы.

Ферментативная активность почвы - это совокупность процессов, катализируемых внеклеточными (иммобилизованными на почвенных частицах и стабилизированными в почвенном растворе) и внутриклеточными ферментами почвенной биоты. Это один из показателей потенциальной биологической активности почв, характеризующий потенциальную способность системы сохранять гомеостаз (Звягинцев, 1987).

В почве накапливается определенный «пул» (запас) ферментов, качественный и количественный состав которого характерен для данного типа почв. Наиболее хорошо изучены в почве ферменты классов оксидоредуктаз и гидролаз, для них в основном и разработаны методы определения. В данных методических указаниях мы остановимся на определении активности гидролитических ферментов - гидролаз.

Гидролазы широко распространены в почвах и играют важную роль в обогащении их подвижными и доступными для растений и микроорганизмов питательными веществами, разрушая высокомолекулярные органические соединения, такие как белки, полисахариды и др. К этому классу относятся ферменты: целлюлаза, протеаза, фосфатаза и другие, активность которых является важнейшим показателем биологической активности почв и оценки антропогенного воздействия.

Важнейшим условием плодородия почв, а следовательно, и их биогенности, является также запас элементов питания. Кислотные дожди, особенно в регионах с гумидным климатом, выщелачивают из почвы Са, К, Na, Mg, а это ведет к изменению их химических и физических свойств, нарушается режим питания высших растений, снижается численность бактерий и актиномицетов, нарастает почвенный токсикоз (особенно сильно - на песчаных почвах). Ранняя диагностика дефицита питательных элементов в почве возможна на основании ориентировочного учета потребности почв в биогенных элементах с помощью азотобактера.

2.1. Определение целлюлазной активности почвы

В почву с растительными остатками поступает значительное количество целлюлозы. Почвенные микроорганизмы, особенно грибы, обладают активной целлюлазой, расщепляющей клетчатку. Для определения целлюлазной активности почвы используют различные способы учета продуктов ферментативной активности: определение остаточного количества не расщепленной в почве целлюлозы и интенсивности накопления белков и аминокислот (аппликационные методы), определение количества образующегося СО₂ или потребленного при распаде клетчатки О₂, колориметрический метод определения глюкозы, образующейся при гидролизе целлюлозы в почве, и т.д. Аппликационные методы отличаются простотой и дают возможность приблизиться к определению интенсивности протека-

ния процессов в природных условиях. Именно эти методы приведены в данных методических указаниях для выполнения работ по определению целлюлазной активности почв.

2.1.1. Определение интенсивности разложения целлюлозы

Ход работы:

1. Стерильную тонкую льняную (или хлопчатобумажную) ткань шириной примерно 10 см (длина может варьировать) взвешивают на весах с точностью до одной десятой грамма и определяют таким образом ее начальный вес. Полученное значение записывают в лабораторный журнал (M_1). После взвешивания ткань пришивают к стерильной полимерной пленке (например, пищевой полиэтилен) такого же размера. Ткань стерилизуют автоклавированием, пленку - при помощи спирта.

2. В почве делают свежий разрез и к его вертикальной стенке плотно прижимают ткань. С обратной стороны полиэтилен придавливают почвой, разрез засыпают. Верхняя граница ткани должна быть на 3 – 5 см погружена в почву. Необходимо сделать минимум два повтора. Ткань оставляют в почвенном разрезе на месяц.

3. Через месяц полотно осторожно извлекают, освобождают от полиэтилена, отмывают от почвы и продуктов полураспада, подсушивают и взвешивают. Полученное значение записывают в лабораторный журнал (M_2). Рассчитывают убыль массы ткани за месяц в процентах и по этому показателю судят об интенсивности процесса разрушения клетчатки, используя оценочную шкалу ($M_1/M_2 \cdot 100\%$).

Таблица 2

Оценочная шкала интенсивности разрушения клетчатки

<i>Убыль массы, (%)</i>	<i>Интенсивность разрушения клетчатки</i>
Менее 10	Очень слабая
10 – 30	Слабая
30 – 50	Средняя
50 – 80	Сильная
Более 80	Очень сильная

2.1.2. Определение интенсивности накопления белков и аминокислот

Уже через несколько дней на ткани, помещенной в почвенный разрез, развиваются не только целлюлозоразрушающие, но и разнообразные другие почвенные микроорганизмы. При этом вскоре после начала разложения полотна на нем накапливаются аминокислоты и белки как результат совместной деятельности различных почвенных микроорганизмов.

Ход работы:

1. Стерильные стеклянные пластинки (25 × 70 мм) плотно обтягивают с обеих сторон стерильной белой льняной (или хлопчатобумажной) тканью такого же размера и сшивают ткань с одной (меньшей) стороны. Стеклянные пластинки предварительно тщательно промывают хромовой смесью и стерилизуют так же, как и ткань, автоклавированием.

2. В почве делают свежий разрез на глубине 5 – 10 см и помещают туда подготовленные пластинки в вертикальном положении на 7 дней. Можно закладывать несколько пластинок на разных глубинах в соответствии с поставленной задачей.

3. Через 7 дней стекла извлекают из почвы, снимают ткань и вырезают из нее две полоски. Полоски просушивают на воздухе, а затем очищают от приставших частиц почвы.

4. Одну полоску опрыскивают 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне и высушивают при комнатной температуре. В результате на полоске проявляются пятна аминокислот. Другую полоску опрыскивают водным раствором бромфенолсинего (0,1 г на 250 мл дистиллированной воды) и после ее посинения погружают в 0,2%-ный раствор уксусной кислоты. В результате на общем бледно-голубом фоне полотна становятся видимыми белковые пятна, окрашенные в темно-голубой цвет.

Внимание! Работу с красителем нингидрином проводят осторожно - для предотвращения образования стойких пятен на коже открытых частей тела и одежде. Обработку проводят в вытяжном шкафу.

5. Зарисовывают общую картину образовавшихся пятен на обеих полосках. Рассчитывают процент площади, занимаемый пятнами, по отношению к общей площади обработанной полоски ткани

$$(S_{\text{П}}:S \times 100\%).$$

Общую площадь полоски ткани (S) рассчитывают по формуле:

$$S = h \times l,$$

где h - высота полоски ткани; l - ее ширина.

Для определения суммарной площади образовавшихся пятен ($S_{\text{П}}$) сначала подсчитывают площадь каждого пятна ($S_1, S_2 \dots S_n$), а потом

полученные данные складывают. При этом площадь пятен, имеющих форму круга, вычисляют по формуле:

$$S_{\text{П}} = \pi r^2,$$

где r – радиус пятна;

$$\pi = 3,14.$$

Площадь пятен, имеющих неправильную форму, вычисляют, копируя их с ткани с помощью копировальной бумаги на миллиметровую. Такую работу проделывают отдельно для аминокислот и белков.

Составляют сводную таблицу показателей целлюлазной активности почвы по форме (табл. 3).

Таблица 3

Показатели целлюлазной активности почвы

Исследуемая почва	Убыль массы ткани			Аминокислоты			Белки		
	Масса в начале опыта, мг M_1	Масса в конце опыта, мг M_2	Убыль массы, %	Общая площадь пороски ткани, мм ² S	Площадь образовавшихся пятен, мм ² $S_{\text{П}}$	$S_{\text{П}} : S$ %	Общая площадь пороски ткани, мм ² S^*	Площадь образовавшихся пятен, мм ² $S_{\text{П}}^*$	$S_{\text{П}}^* : S^*$ %

Делают вывод о целлюлазной активности изучаемых почв или отдельных горизонтов одной почвы. При этом исходят из того, что биогенность почвы тем выше, чем больше процент площади, занимаемый пятнами образовавшихся белков и аминокислот.

2.2. Определение потребности почв в биогенных элементах

Как известно, наиболее надежный способ определения потребности почвы в удобрении – проведение вегетационных и полевых опытов. Однако такие опыты требуют длительного времени, измеряемого месяцами. Кроме того, на результаты влияют метеорологические условия. Химические методы определения ряда элементов отличаются быстротой, но они позволяют сделать вывод лишь об общем количестве данного элемента и не указывают, в форме усвояемого или не усвояемого растениями соединения он находится в почве. *Ролен* (Raulin, 1869), а позднее *В.С. Буткевич* (1909), *Кристенсен* и *Ларсен* (Christensen, Laarsen, 1911) предложили микробиологический способ суждения о содержании в почве элементов

минерального питания высших растений. Эти исследователи исходили из того, что отношение высших растений к азоту, фосфору, калию и другим элементам принципиально не отличается от отношения к данным элементам некоторых микроорганизмов. Достоинство микробиологических методов состоит в том, что определения проводят в постоянных лабораторных условиях (исключено влияние метеорологических факторов) и результаты получают уже через несколько суток. Кроме того, получают сведения об усвояемых формах определяемых элементов.

2.2.1. Ориентировочный учет потребности почвы в фосфоре, калии, кальции

Методики определения потребности почвы в фосфоре, калии, кальции были разработаны *Виноградским, Крючковой* и другими. В качестве тест-микроорганизма предложен азотобактер (*Azotobacter chroococcum*).

Ход работы:

1. Культуру азотобактера готовят аналогично п. 3.2.2, п/п 6.
2. Из исследуемой почвы изготавливают пять почвенных пластинок:
 - 1) без добавления минеральных солей;
 - 2) с кальцием, калием и фосфором (Са, К, Р);
 - 3) с кальцием и фосфором (Са, Р);
 - 4) с кальцием и калием (Са, К);
 - 5) с калием и фосфором (К, Р).

Фосфор применяют в виде смеси Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 (из расчета 10 мг P_2O_5 на 100 мг почвы). Готовят раствор, содержащий 5 мг P_2O_5 в 1 мл: Na_2HPO_4 – 1,678 г; NaH_2PO_4 – 0,323 г; вода – 100 мл. Для одной пластинки берут 1 мл раствора.

Калий вносят в виде K_2SO_4 (из расчета 2,5 мг на 100 г почвы). Готовят раствор, содержащий 125 мг K_2O в 100 мл: K_2SO_4 – 0,22 г; вода – 100 мл. Для одной пластинки берут 1 мл раствора.

Кальций вносят в виде Ca_2CO_3 – по 5 г на одну пластинку.

3. Для приготовления одной почвенной пластинки навеску почвы (50 г) помещают в фарфоровую чашечку, добавляют 0,5 г маннита (источник углерода для азотобактера) и все соли, предусмотренные схемой опыта. Затем почву заражают культурой азотобактера (в количестве 2 млн. клеток на 1 г почвы), увлажняют стерильной дистиллированной водой до пастообразного состояния и тщательно перемешивают. На дно чашки Петри для лучшей аэрации помещают стерильный древесный уголь или битое стекло в качестве дренажа, затем вносят подготовленную почву и выравнивают ее поверхность шпателем. В чашку наклонно вставляют стеклянную трубочку, проходящую через почвенную пластин-

ку и обеспечивающую газообмен. Это необходимо для того, чтобы не допустить развития маслянокислых бактерий и связанного с этим вспучивания почвы. Под крышку чашки подкладывают кружок фильтровальной бумаги. Подготовленную таким образом чашку Петри с почвенной пластинкой помещают в эксикатор, на дно которого наливают небольшое количество воды для предотвращения высыхания среды. Инкубируют в течение суток при 28 - 30⁰С, затем ведут подсчет выросших колоний азотобактера с помощью лупы. Колонии азотобактера имеют вид мелких полупрозрачных капель, окрашенных в буровато-коричневый цвет.

4. Оценивают исследуемую почву на содержание в ней фосфора, калия, кальция. Для этого сравнивают количество колоний азотобактера, выросших на тех или иных почвенных пластинках. Полученные результаты сводят в таблицу (табл. 4).

Таблица 4

Оценка почвы на содержание фосфора, калия, кальция

Образец почвы	Вариант				Оценка состояния почвы
	Без внесения солей	Ca, K, P	Ca, P	Ca, K	

Примеры:

- во всех чашках выросло одинаковое число колоний – почва обеспечена всеми тремя элементами в необходимом количестве;
- во второй чашке колоний больше, чем в третьей, – в почве недостаточно калия, т.е. почва «отзывчива» на калий;
- и т.д.

Тема 3. Загрязнение почв

Практически все виды человеческой деятельности сопровождаются загрязнением окружающей среды, в том числе и почвы. Главным источником химического загрязнения почв (по Б.Г. Розанову, А.Б. Розанову, 1994) служат: отходы сельхозпроизводства (особенно животноводства), отходы переработки сельхозпродуктов, минеральные удобрения, нефтеперерабатывающие и нефтедобывающие предприятия, кислотные дожди, атмосферные выпадения в радиусе деятельности промышленных предприятий и добычи полезных ископаемых, автотранспорт, пестициды, тепловые и атомные электростанции. При этом наиболее опасными загрязняющими веществами являются тяжелые металлы (в составе органических и неорганических молекул), радионуклиды, нефть и ее производные и минеральные удобрения в избыточном количестве.

Воздействие загрязнителей в первую очередь сказывается на почвенной биоте. При этом микроорганизмы (бактерии, грибы, водоросли, простейшие) имеют более высокий уровень метаболизма, чем высшие растения, беспозвоночные и позвоночные животные и их функциональная роль в почве выше. В общем балансе веществ микроорганизмам принадлежит не меньшая роль, чем растениям. Кроме того, только микроорганизмы осуществляют процесс деструкции биомассы в почве. Поэтому воздействие загрязнителей почвы в первую очередь сказывается на ее микронаселении.

Реакция бактерий и грибов на химическое загрязнение является наиболее изученной к настоящему времени, поэтому так часто в качестве тест-объектов используются именно эти организмы. Большинство загрязнителей (тяжелые металлы, пестициды, нефтепродукты, антибиотики) влияют на численность, видовой состав и жизнедеятельность почвенной микробиоты. Они ингибируют процессы минерализации и синтеза различных веществ в почве, подавляют дыхание почвенных микроорганизмов, вызывают микробостатический эффект, способствуют появлению **мутагенных свойств**. Наиболее изученными в плане воздействия на микробное сообщество являются тяжелые металлы, именно на них были установлены основные закономерности влияния на микробиоту почв. Впоследствии было показано, что такие же закономерности существуют и для других загрязнителей, например пестициды и нефтепродукты.

Фактически диапазон толерантности микробного сообщества при различном содержании загрязнителя можно разделить на несколько адаптивных зон:

- *зона гомеостаза*, в которой изменяется интенсивность микробиологических процессов (низкий уровень загрязнения);

- *зона стресса*, в которой происходят существенные изменения сообщества, увеличивается доля токсинообразующих форм (средний уровень загрязнения);

- *зона резистентности*, в которой резко сокращается состав микробного сообщества, доминантами становятся резистентные виды; явная реакция на загрязнение высших растений (высокий уровень загрязнения);

- *зона репрессии*, в которой прекращается развитие микроорганизмов.

Резкое сокращение состава микробного сообщества в зоне резистентности обусловлено как непосредственным действием загрязнителя, так и накоплением веществ, обладающих антимикробным действием (антибиотиков). Антибиотические вещества вырабатываются многими почвенными микроорганизмами в естественных условиях в процессе жизнедеятельности и могут оказывать существенное влияние как на развитие самого организма-продуцента, так и на процессы, происходящие в почве. Как показа-

но в настоящее время, появление избыточных количеств антибиотиков в почве является признаком высокого уровня загрязнения различными веществами и косвенно (по реакции микробного сообщества) на это указывает. Кроме того, антибиотики сами по себе могут быть загрязнителями (продукты антропогенной деятельности: ветеринария, медицина, производство антибиотиков). Попадая в почву, они не только остаются там, но и могут поступать в растения и, следовательно, передаваться дальше по трофической цепи.

Поэтому диагностика присутствия антибиотиков позволяет установить наличие загрязнителя в почве (без качественного его определения). В результате загрязнения, кроме антибиотиков, в почве могут накапливаться токсины, действующие на высшие растения. Диагностировать их присутствие можно методом проростков. Оба метода достаточно доступны для выполнения студентами в ходе лабораторного практикума и приведены в настоящем руководстве.

3.1. Диагностика присутствия антибиотиков в почве

Антибиотики (в широком понимании данного термина) - это биологически активные вещества, образуемые организмами и избирательно оказывающие подавляющее действие на рост клеток. В узком смысле под антибиотиками понимают биологически активные вещества микробного происхождения, избирательно подавляющие рост микроорганизмов.

Многие вопросы, связанные с наличием антибиотических веществ в почве, можно выяснить, пользуясь тест-микроорганизмами, чувствительными к определенному антибиотику (табл. 5).

Таблица 5

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам

<i>Антибиотик</i>	<i>Микроорганизм</i>
эритромицин	<i>Sarcina lutea</i>
олеандомицин	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
пенициллин	<i>Micrococcus aureus</i>
стрептомицин	<i>Bacillus subtilis</i>
тетрациклины	<i>Bacillus mycoides</i>
неомицин	<i>Staphylococcus aureus</i>

Методики, основанные на применении тест-микроорганизмов, позволяют судить о присутствии того или иного антибиотика в почве, о его общем количестве, скорости инактивации, продолжительности сохранения и др.

Наиболее доступным является метод определения присутствия того или иного антибиотика в почве, который предложен в данных методических указаниях.

Ход работы:

1. Приготовить среду МПА (для *Sarcina lutea*, *Micrococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*) и стафилококковый агар (для *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*), простерилизовать, разлить в чашки Петри и дать среде застыть. Среда готовится по прописи на упаковке предприятия-изготовителя.

2. Засеять чашки со средой тест-микроорганизмами, чувствительными к различным антибиотикам (см. табл. 5). Для работы используют музейные культуры. Посев проводят «газоном» по описанной методике (см. п. 3.2.2, п/п б).

3. Навеску почвы (примерно 0,1 г) увлажняют стерильной водой до пастообразного состояния и микробиологической петлей раскладывают комочки правильными рядами на равном расстоянии друг от друга на поверхности засеянной агаризованной среды – 50 комочков на каждую чашку Петри.

4. Чашки инкубируют в течение 4 – 6 суток. При наличии в почве антибиотических веществ на газонах с тест-культурами образуются стерильные зоны. В зависимости от того, рост какого тест-микроорганизма подавляется, судят о присутствии того или иного антибиотика в исследуемой почве. Можно дать сравнительную оценку содержания выявленных антибиотиков по диаметру образовавшихся зон стерильности. Замеряют диаметр указанных зон и вычисляют их суммарную площадь ($S_{ст}$). Затем находят общую площадь питательной среды ($S_{общ}$) и рассчитывают долю, приходящуюся на зоны стерильности ($Ст$) для каждого тест-микроорганизма по формуле:

$$Ст = \frac{S_{ст}}{S_{общ}} \times 100(\%).$$

По этой величине судят о том, каких выявленных в исследуемой почве антибиотических веществ содержится больше, а каких меньше. Результаты оформляют в виде таблицы (табл. 6).

Таблица 6

Содержание антибиотических веществ в образце почвы

Тест-культура	Выявленный антибиотик	$S_{ст}$ мм ²	$S_{общ}$ мм ²	Ст, %
---------------	-----------------------	--------------------------	---------------------------	-------

На основании полученных результатов сделать вывод о предполагаемом уровне загрязнения исследуемой почвы и о том, в какой адаптивной зоне находится микробоценоз.

3.2. Фитотоксичность почвы

Фитотоксичность почвы - это свойство почвы подавлять рост и развитие высших растений. Необходимость определения этого показателя возникает при мониторинге химически загрязненных почв или при оценке возможности использования в качестве удобрений или мелиорантов различных отходов: осадков сточных вод, компостов, гидролизного лигнина.

Удобны и легко выполнимы экспериментальные методы определения фитотоксичности: метод проростков и метод угнетения микробных популяций.

3.2.1. Определение фитотоксичности методом проростков

Метод позволяет выявить как токсическое, или ингибирующее, действие тех или иных веществ, так и их стимулирующее влияние.

В качестве тест-культур используют быстро прорастающие растения, фиксирующие и не фиксирующие азот, выращиваемые в хозяйствах данного региона. Так, для почв средней полосы России (дерново-подзолистых почв) берут горох и овес, для почв лесостепной и степной зон - люцерну, фасоль, пшеницу.

В ходе опыта фиксируют всхожесть, энергию прорастания, длину наземной и корневой систем, массу сухого вещества наземной и подземной части (при необходимости можно ограничиться двумя показателями).

Ход работы:

1. Опыт может быть поставлен в трех вариантах:

1) к почве добавляют исследуемое на фитотоксичность вещество (доза должна превышать в максимальном варианте намечаемую для внесения в реальных условиях);

2) сравнивают загрязненные и контрольные варианты почв;

3) загрязненную почву добавляют к незагрязненной в возрастающих количествах (вплоть до 100%).

Вариант выбирают в зависимости от характера токсиканта и особенностей загрязнения почвы. Все опыты ставят не менее чем в трехкратной повторности. При использовании почвенных смесей (вариант 2) необходимо их тщательное перемешивание.

2. Подготовленный для опыта субстрат (100 г) помещают в стеклянные стаканы и увлажняют до 70% от полной влагоемкости (ПВ). Для определения ПВ необходимо провести расчет, используя данные, полученные при определении порозности почвы:

$$\text{ПВ} = \frac{d - d_v}{d} \cdot 100 \%,$$

где d - плотность твердой фазы;
 d_v – плотность почвы.

Далее вычисляют 70% от полученного значения ПВ и расчетным количеством воды увлажняют образец. Образец взвешивают и зарегистрированный вес поддерживают в течение всего опыта (добавляя воду до по мере ее испарения).

3. В каждый сосуд высевают по 13 семян тест-культуры.

4. На четвертые сутки от начала опыта стакан помещают в люминостат (или на освещенный стеллаж). Освещение – 14 часов сутки (с 6 до 20 часов). Выращивание в этих условиях длится в течение 10 дней.

5. В ходе опыта наблюдают за следующими показателями:

- время появления всходов и их число на каждые сутки;
- общую всхожесть (в конце опыта);
- измеряют длину наземной части растений (2-3 раза в ходе опыта);
- по окончании опыта измеряют длину корней;
- растения высушивают на воздухе, взвешивают биомассу наземной и подземной частей растений.

Данные опыта свести в таблицу (при эксперименте можно ограничиться меньшим количеством показателей).

Энергию прорастания (B) определяют по формуле:

$$B = \frac{a}{b} \times 100 (\%),$$

где a - число проросших семян;

b - общее число семян, взятых для опыта.

При использовании показателя массы растений расчет ведут по формуле:

$$\PhiЭ_{\text{ПР}} = \frac{M_k - M_x}{M_k} \times 100 (\%),$$

где $\PhiЭ_{\text{ПР}}$ - фитотоксичный эффект (по проросткам); M_k - масса растений в контроле (или одного контрольного растения); M_x - масса растений (или растения) на фитотоксичной среде.

Снижение числа проросших семян и длины проростков по сравнению с контролем в 1,1 раза допускается для недеградированной почвы. Если число проростков снизилось более чем в 2 раза, то почва очень сильно деградирована.

3.2.2. Определение фитотоксичности по азотобактеру (метод Н.А. Красильникова)

Этот метод менее трудоемок и требует меньше времени для экспозиции, поэтому может быть отнесен к экспресс-методам.

Ход работы:

1. Приготовить среду Эшби, простерилизовать, разлить в стерильные чашки Петри, дать среде застыть.

Состав среды Эшби (г/л): маннит – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; $CaCO_3$ – 5,0; агар – 20 г/л; вода дистиллированная.

2. Нарезать целлофан (или пергаментную бумагу) кружками диаметром, равным диаметру чашки Петри. Поместить кружки в свободную чашку Петри, смочить водой и в таком виде простерилизовать в автоклаве.

3. Стерильные кружки целлофана поместить в чашки Петри на застывшую среду Эшби и тщательно расправить по поверхности металлическим шпателем.

Внимание! Расправлять целлофан надо очень осторожно, чтобы не повредить поверхность среды.

4. На поверхность целлофана в центр чашки кладут комочек исследуемой почвы диаметром 2 см (почву предварительно увлажняют водой). Можно расположить на целлофане не один, а 4-5 комочков почвы меньшего диаметра (≈ 1 см) на равном расстоянии друг от друга.

5. Чашки с почвой помещают в термостат с $t = 24 - 280$ С на сутки.

6. Через сутки целлофан с почвой снимают с агаризованной среды, а ее поверхность засевают «газоном» суточной культурой азотобактера (*p. Azotobacter*). Для посева культуру азотобактера готовят следующим образом. Музейную культуру бактерий выращивают на среде Эшби при температуре 25 - 30⁰С. Затем в пробирку с выросшей культурой наливают 10 мл стерильной дистиллированной воды, взбалтывают, чтобы получить суспензию клеток. Полученную суспензию сливают в заранее приготовленный стерильный флакон. Пипеткой берут 0,2 мл суспензии культуры, вносят в чашку Петри и осторожно распределяют суспензию клеток по всей поверхности питательной среды с помощью стеклянного шпателя.

7. Засеянные азотобактером чашки вновь помещают в термостат и инкубируют в течение 4 – 6 суток. При наличии в почве токсичных веществ на газоне азотобактера образуются стерильные зоны (рост культуры отсутствует). Мерой фитотоксичности служит диаметр образовавшихся зон стерильности. Замеряют диаметр указанных зон и вычисляют их площадь ($S_{ст}$). Затем находят общую площадь питательной среды ($S_{общ}$) и

вычисляют площадь, занятую культурой ($S_{оп} = S_{общ} - S_{ст}$). Фитотоксический эффект рассчитывают по формуле:

$$\Phi Э_{Az} = \frac{S_{оп}}{S_{общ}} \times 100(\%).$$

Результаты оформляют в виде таблицы (табл. 7).

Таблица 7

Показатели фитотоксичности почвы

Образец почвы	Фитотоксичность по методу проростков		Фитотоксичность по азотобактеру	
	Энергия прорастания, В (%)	$\Phi Э_{пр}$ (%)	Диаметр стерильной зоны, мм	$\Phi Э_{Az}$ (%)

Аналогично можно проводить анализ и с другими видами типично почвенных микроорганизмов, например с бактериями *pp. Rhizobium, Arthrobacter* и др.

3.3. Многокомпонентная тест-система для оценки токсичности почвенного покрова городов

В настоящее время при биотестировании почв чаще всего используют один тест-организм, реже - несколько, но выбор этих организмов достаточно случаен. При таком подходе тест-система, составленная из случайно взятых живых организмов, оказывается неэффективной. В Уфимском научном центре РАН предложен другой подход к составлению многокомпонентных тест-систем, предназначенных для оценки токсичности почвенного покрова (Кабиров и др., 1997). По мнению авторов, многокомпонентная тест-система должна удовлетворять следующим требованиям:

- 1) содержать прокариотические и эукариотические организмы;
- 2) содержать представителей двух трофических уровней - автотрофов и гетеротрофов;
- 3) включать представителей из основных функциональных блоков наземных экосистем - продуцентов, консументов, редуцентов;
- 4) иметь в своем составе представителей из основных царств живого - бактерий, грибов, растений, животных;
- 5) включать тест-организмы, хорошо растущие в лабораторных условиях;
- 6) включать организмы, обладающие высокой чувствительностью к наиболее распространенным загрязнителям природной среды;

7) преимущество следует отдавать организмам с широким ареалом распространения, с хорошо изученной биологией и экологией;

8) включать такие тест-реакции тест-объектов, регистрация которых не требует использования сложной и дорогостоящей аппаратуры, но в то же время несущих достаточный объем информации.

Предложенная далее многокомпонентная тест-система для оценки токсичности почв частично модифицирована авторами настоящего руководства (вместо цианобактерии *Synechocystis aqatilis* использован типично почвенный род бактерий - *Arthrobacter*).

Артробактер глобиформис (Arthrobacter globiformis) - относится к гетеротрофным бактериям, прокариотам (доядерным организмам), поэтому полученные данные можно с известной долей допущения экстраполировать на все доядерные организмы. Широко распространен в окружающей среде, преимущественно в почве.

Хлорелла обыкновенная (Chlorella vulgaris) - относится к низшим растениям, эукариотам, автотрофам, продуцентам. Зеленые водоросли наиболее близки к высшим растениям в физиологическом плане, поэтому результаты, полученные с их помощью, можно экстраполировать на высшие растения.

Пенициллум циклопиум (Penicillium cyclopium) - относится к микроскопическим грибам, эукариотам, гетеротрофам, сапротрофам, консументам. Широко распространен в почве в различных местообитаниях.

Овес посевной (Avena sativa L) - относится к высшим растениям, эукариотам, автотрофам, продуцентам. Его биология и экология хорошо изучены.

Ход работы:

1. Подготовка почвенной вытяжки. Один объем воздушно-сухой, просеянной через сито с диаметром отверстий 2 мм почвы взбалтывают с четырьмя частями водопроводной воды в течение 15 минут. Полученную смесь отстаивают 2 часа. После этого почвенную суспензию еще раз взбалтывают и фильтруют через всю толщу почвы на складчатом бумажном фильтре. Вытяжку готовят из незагрязненной (контроль) и загрязненной (опыт) почвы.

2. Подготовка тест-организмов проводится лаборантом.

1). Музейную культуру бактерий выращивают на мясо-пептонном агаре (МПА) при температуре 25 - 30⁰С.

2). Накопительную культуру водорослей получают следующим образом. В коническую колбу объемом 50 – 100 см³ наливают 25 – 30 мл питательной среды Прата, вносят небольшое количество музейного материала и помещают в люминостаг. Время инкубации зависит от состояния музейной культуры, температуры, освещения, количества внесенного ма-

териала (чем больше внесено клеток, тем они быстрее адаптируются к новым условиям и лучше растут), состава питательной среды и т.д. Оптимальная плотность накопительной культуры составляет $10^4 - 10^5$ кл/мл среды. После этого культуру можно готовить к посеву. При помощи центрифуги осаждают клетки (при скорости 3000 об/мин в течение 2 минут). Затем надосадочную жидкость сливают, промывают осадок дистиллированной водой и снова центрифугируют. Эту процедуру проводят еще 2 раза. Таким образом исключают попадание в анализируемую пробу питательной среды и продуктов метаболизма водорослей.

Состав среды Прата (г/л): $\text{KNO}_3 - 0,1$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,01$; $\text{MgSO}_4 - 0,01$; $\text{FeCl}_3 - 0,001$ или цитрат железа (III) – 0,05; вода водопроводная.

3). Музейную культуру гриба выращивают на агаризованной среде Чапека при температуре $25 - 30^\circ\text{C}$ и влажности 50 – 60%.

Состав среды Чапека (г/л): сахароза – 20,0; $\text{NaNO}_3 - 2,0$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,0$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,5$; $\text{KCl} - 0,5$; $\text{FeSO}_4 - 0,01$; агар – 20,0; вода дистиллированная.

4). Семена высших растений должны иметь всхожесть не менее 70% и быть из одной партии (перед опытом проверить всхожесть семян).

3. Биотестирование с использованием *Arthrobacter globiformis* и *Penicillium cyclopium* проводится на почвенной вытяжке, в которую добавляют 15 г сахарозы и 15 г агара на один литр вытяжки. Среду стерилизуют и разливают по чашкам Петри. Каждый тест-объект и контрольный вариант исследуются в трех повторностях.

Из пробирки с выросшей культурой *Arthrobacter globiformis* микробиологической петлей отбирают посевной материал и переносят его в пробирку с 10 мл стерильной дистиллированной воды. Взбалтывают, чтобы получить суспензию клеток, и готовят серию десятикратных разведений (до 10^{-4}). В пробирку с культурой *Penicillium cyclopium* с хорошо выраженным спорношением наливают 10 мл стерильной дистиллированной воды, встряхивают в течение 15 - 20 минут, чтобы смыть образовавшиеся споры, и так же готовят серию разведений. На чашки с агаризованной почвенной вытяжкой вносят по 0,2 мл выбранного разведения той или иной культуры и равномерно распределяют по поверхности стеклянным шпателем. Чашки инкубируют в термостате при $t = 23 - 25^\circ\text{C}$ в течение 10 – 14 суток. Тест-функцией для бактерий и гриба является численность колоний в контрольном и опытном вариантах (из трех повторностей берут среднее значение численности). Для гриба можно дополнительно использовать в качестве тест-функции диаметр колоний.

4. Биотестирование с использованием *Chlorella vulgaris*. Исследуемую почвенную вытяжку и вытяжку из контрольной почвы разливают в стерильные колбы на 50 мл по 25 мл в каждую (в трех повторностях). Затем во все варианты вносят культуру хлореллы - по 1 мл

центрифугата в каждую колбу. Колбы инкубируют 10 – 14 суток в люминостате. Тест-реакцией хлореллы является численность клеток, которая определяется по изменению оптической плотности суспензии клеток на фотоэлектроколориметре (ФЭК) или спектрофотометре (СФ). Измерение оптической плотности проводят 3-4 раза в течение опыта, результаты фиксируют в лабораторном журнале.

5. Биотестирование с использованием *Avena sativa L.* проводят на почвенной вытяжке (контроль, опыт) и на отстоянной водопроводной воде в качестве дополнительного (аналитического) контроля. Повторность во всех случаях трехкратная. В чашки Петри кладут 2 – 4 слоя фильтровальной бумаги, помещают на нее семена овса (по 13 семян в каждую чашку) и приливают по 10 мл исследуемой вытяжки или водопроводной воды. Следят за прорастанием семян в течение недели.

Внимание! При необходимости следует добавлять испаряющуюся жидкость и не допускать пересыхания семян.

Тест-функцией является энергия прорастания - дружность появления проростков за 4 суток. Энергию прорастания (В) определяют в процентах по формуле:

$$B = \frac{a}{b} \times 100 (\%),$$

где а - число проросших семян;

в – общее число семян, взятых для опыта.

6. Для получения сопоставимых результатов по итогам тестирования рассчитывают индекс токсичности оцениваемого фактора (ИТФ) для каждого тест-организма:

$$\text{ИТФ} = \frac{T\Phi_o}{T\Phi_k},$$

где $T\Phi_o$ - значение регистрируемой тест-функции в опыте;

$T\Phi_k$ - значение регистрируемой тест-функции в контроле.

Величина ИТФ изменяется от 0 до N, где N - любая положительная величина.

Используя шкалу токсичности (табл. 8), определить класс токсичности исследуемой почвы.

Таблица 8

Оценочная шкала токсичности почв

<i>Класс токсичности</i>	<i>Величина ИТФ</i>	<i>Пояснения</i>
VI (стимуляция)	>1,10	Фактор оказывает стимулирующее действие на тест-объект. Величина тест-функции в опыте превышает контрольные значения
V (норма)	0,91 - 1,10	Фактор не оказывает существенного влияния на развитие тест-объектов. Величина тест-функций находится на уровне контроля
IV (низкая токсичность)	0,71 - 0,90	
III (средняя)	0,50 - 0,70	Разная степень снижения величины тест-функций в опыте по сравнению с контролем
II (высокая)	<0,50 (ниже индекса LD ₅₀ , принятого в токсикологии)	
I (сверхвысокая, вызывающая гибель тест-объекта)	Среда непригодна для жизни тест-объекта	Наблюдается гибель тест-объекта

Полученные результаты занести в сводную таблицу (табл. 9).

Таблица 9

Значения ИТФ исследованных образцов почвы

Образец почвы	Тест-объекты				Средняя токсичность почвы (ИТФ _{ср})
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>Avena sativa L.</i>	

Тема 4. Комплексная диагностика деградации почв

Для получения полной картины деградации почвы методы почвенно-экологического мониторинга, предложенные в настоящем руководстве, должны быть дополнены еще рядом важных показателей. Это мощность органогенного почвенного горизонта, окислительно-восстановительный потенциал (Eh), содержание основных питательных элементов (N, P, K), степень загрязнения почв. В сочетании с плотностью исследуемой почвы и характеристиками ее биогенности, диагностика уже приобретает комплексный характер и позволяет выявлять не только наиболее уязвимую группу почвенных свойств (физические, химические и физико-химические, биологические), но и укажет степень деградированности по нескольким показателям.

Перечень работ для комплексной диагностики выглядит следующим образом:

1. Определение мощности органогенного горизонта.
2. Определение удельного и объемного веса почвы.
3. Определение окислительно-восстановительного потенциала почвы.
4. Фитотоксичность почвы (методом проростков).
5. Определение ферментативной активности (по интенсивности разложения целлюлозы).

Биологическую деградацию почв можно установить различными методами. Нами для этой цели выбраны две последние работы (фитотоксичность почвы и определение ферментативной активности по интенсивности разложения целлюлозы).

Определение мощности органогенного горизонта

Мощность органогенного горизонта определяют во время взятия образца (в нашем случае - на полевой практике). Почву относят к недеградированной, если мощность ее органогенного горизонта (А) меньше по сравнению с ненарушенной почвой не более чем на одну десятую (0,1 А). Очень сильно деградированной считают почву, в которой отсутствует весь органогенный горизонт, процесс деградации затрагивает нижележащие горизонты.

Определение объемного веса почвы

Определение объемного веса почвы позволяет установить ухудшение ее структуры в результате рекреационной нагрузки, воздействия тя-

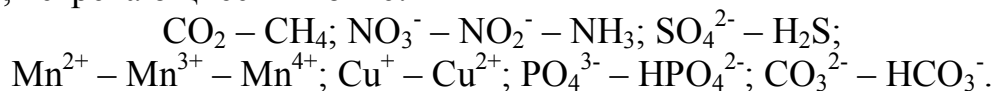
желой техники, слитизации и коркообразования. Определение проводят методом режущих цилиндров в соответствии с описанием, приведенным в п. 1.2 настоящих методических указаний. Недеградированной считается почва, у которой превышение плотности по сравнению с контролем не более чем в 1,1 раза; сильно деградированная почва – с плотностью, превышающей плотность ненарушенной почвы в 1,4 раза.

Определение окислительно-восстановительного потенциала почвы (ОВП)

ОВП - высокоинформативный показатель состояния почвы, отражающий совокупность химических и физико-химических показателей почвы. ОВП - интегральная величина, показывающая способность системы принимать или отдавать электроны по отношению к электроду сравнения.

Величина ОВП (Eh) почв и направленность окислительно-восстановительных процессов зависит, в основном, от режима влажности, аэрации и интенсивности деятельности микробиоты. В автоморфных почвах потенциалы колеблются в довольно узких пределах, например, для дерново-подзолистых, целинных и пахотных почв характерны Eh 450 - 500 мВ.

Развитие биологических процессов, как правило, также снижает потенциал из-за потребления кислорода микроорганизмами и корнями высших растений. Заметно влияют на величину ОВП следующие соединения, встречающиеся в почве:



Величиной ОВП почвы определяется, в каких типах соединений в ней будут находиться азот, железо, марганец, сера.

Окислительно-восстановительный потенциал в значительной степени влияет на состояние азота в почве. Фиксация азота азотфиксирующими бактериями снижается при увеличении содержания в почвенном растворе веществ с высоким ОВП. Процессы нитрификации, денитрификации и аммонификации идут только при соответствующих окислительных условиях.

В зависимости от величины ОВП преобладающие формы азота следующие: при 480 мВ и выше – нитраты, 480 – 340 мВ – нитраты и нитриты, 340 – 200 мВ – нитриты, 200 мВ – оксиды азота и молекулярный азот. Ниже 340 мВ находится область усиленной денитрификации, а значит, и больших потерь азота.

Одна из причин резких изменений ОВП в почвах – низкая буферная способность и емкость окислительно-восстановительных систем в почве. Буферность (или обратное ей понятие – податливость) в отношении ОВП

можно оценить по изменению ОВП при добавлении к окислительно-восстановительной системе окислителя или восстановителя. Повышение содержания гуминовых соединений увеличивает буферность почвы.

Ход работы:

Для измерения ОВП используют стандартные рН-метры, милливольтметры. Электрический датчик состоит из индифферентного (металлического, графитового, смешанного), в нашем случае - платинового электрода, и электрода сравнения (хлорсеребряный или каломельный).

При измерении Eh в полевых условиях электроды плотно вставляют в почву на глубину 5 – 7 см на расстоянии 8 – 10 см друг от друга. Измерения проводят в середине каждого генетического горизонта. Через 20 минут определяют ОВП по положению потенциометра (одновременно определяют температуру и рН).

При работе в лаборатории электроды вставляют в исследуемые участки горизонтов почвы ненарушенного сложения, которые отбирают в цилиндры, применяемые для определения плотности почвы. При отсутствии ненарушенного образца в лабораторных условиях можно проводить измерение Eh в модельной смеси почвы, содержащей 70% влаги. Измеряя Eh суспензии почв, принимают время установления сорбционного равновесия, равное 5 минутам. Измерение проводят несколько раз (3 - 10) и вычисляют среднее арифметическое значение Eh.

Значение Eh вычисляют по формуле:

$$Eh = ЭДС + E \text{ эл. сравнения,}$$

где ЭДС - показания прибора;

E эл. сравнения - потенциал электрода сравнения (для хлорсеребряного электрода он равен 201 мВ при 25⁰С; для каломельного – 247 мВ при 20⁰С).

Фитотоксичность почвы

Определение фитотоксичности почвы проводят методом проростков, изложенным в п. 3.2.1. настоящих методических указаний.

Определение ферментативной активности почвы

Определение ферментативной активности почвы ведут по интенсивности разложения целлюлозы. Методика изложена в п. 2.1.1. настоящего руководства.

Безусловно неполной будет характеристика почвы без выявления степени ее загрязненности, но для этих определений требуется привлечение, кроме качественных, также и количественных методов исследования, что выходит за рамки данного лабораторного практикума. Кроме того, слабо разработаны и нормы ПДК для почв, поэтому приходится привлекать другие нормативные показатели: степень допустимого радиоактивного загрязнения, суммарный показатель загрязнения тяжелыми металлами, санитарно-гигиенические нормы.

Исходя из показателей и критериев, приведенных в таблице 10, в конце работы необходимо сделать вывод о степени деградированности исследуемой почвы.

Таблица 10

Показатели деградации почв

Показатели	Степень деградации				
	0	1	2	3	4
Мощность органогенного горизонта (снижение на долю мощности)	< 0,1 А*	(0,1-0,2)А	(0,3-0,5)А	(0,6-1,01) А	> А
Плотность почвы (кратность увеличения)	<1,1	1,1 - 1,2	1,21 - 1,3	1,31 - 1,4	> 1,4
Окислительно-восстановительный потенциал (мВ)	<50	50 - 100	101 - 200	201 - 400	> 400
Фитотоксичность (снижение числа проростков, кратность)	<1,1	1,1 - 1,2	1,21 - 1,40	1,41 - 2,0	> 2,0
Ферментативная активность (по убыли массы ткани, %)	> 80	50 - 80	30 - 50	10 - 30	< 10

* А - все виды органогенных горизонтов.

Оборудование и реактивы, необходимые для выполнения работ

Тема 1. Общие физические свойства почв

Работа 1.1. Определение удельного веса (плотности) твердой фазы почвы.

Работа 1.2. Определение объемного веса почвы из рассыпного образца.

Работа 1.3. Определение порозности (скважности) и степени аэрации почвы.

Оборудование (на одну рабочую бригаду): ступка с пестиком, бюкс с крышкой, пикнометр на 100 мл, металлический цилиндр с крышками, электрическая плитка с асбестовой сеткой, термостат.

Тема 2. Биологическая активность почв

Работа 2.1. Определение интенсивности разложения целлюлозы.

Оборудование: стерильная льняная ткань шириной 10 см, пищевой полиэтилен той же ширины, иголка с ниткой, лабораторные весы.

Работа 2.2. Определение интенсивности накопления белков и аминокислот.

Оборудование: обезжиренные стерильные предметные стекла, стерильная белая льняная ткань, копировальная бумага, миллиметровая бумага.

Реактивы: 0,5%-ный раствор нингидрина, водный раствор бромфенолсинего, 0,2%-ный раствор уксусной кислоты.

Работа 2.3. Ориентировочный учет потребности почвы в фосфоре, калии, кальции.

Оборудование: металлический шпатель, чашки Петри, термостат.

Реактивы: соли Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2SO_4 , Ca_2CO_3 .

Тема 3. Загрязнение почв

Работа 3.1. Диагностика присутствия антибиотиков.

Оборудование: чашки Петри, микробиологическая петля, стеклянный шпатель, фильтровальная бумага, лабораторные весы, термостат.

Реактивы: растворы антибиотиков.

Работа 3.2. Определение фитотоксичности методом проростков.

Оборудование: стеклянные стаканы, лабораторные весы, люмино-стат.

Работа 3.3. Определение фитотоксичности по азотобактеру (метод Н.А. Красильникова).

Оборудование: чашки Петри, стерильные кружки целлофана, стерильная пипетка на 0,2 мл, стеклянный шпатель, термостат.

Работа 3.4. Многокомпонентная тест-система для оценки токсичности почвенного покрова городов.

Оборудование: люмино-стат, центрифуга, спектрофотометр, чашки Петри, стеклянные пипетки на 0,2 мл, стеклянный шпатель, стеклянные пробирки с 10 мл дистиллированной воды, колбы на 50 мл с ватно-марлевыми пробками.

Тема 4. Комплексная диагностика деградации почв

Работа 4.1. Определение мощности органо-генного горизонта.

Оборудование: лопата, сантиметровая лента.

Работа 4.2. Определение удельного и объемного веса почвы.

Работа 4.3. Фитотоксичность почвы.

Работа 4.4. Определение ферментативной активности почвы.

Оборудование: приведено выше.

Работа 4.5. Определение окислительно-восстановительного потенциала почвы.

Оборудование: потенциометр, стеклянный стакан.

Обратить внимание! Питательные среды, посуда и другое оборудование, необходимое для выполнения работ, связанных с использованием микробиологических тест-объектов, должны быть обязательно простерилизованы.

Содержание

<u>РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ</u>	3
<u>ЛИТЕРАТУРА</u>	4
<u>ВВЕДЕНИЕ</u>	5
<u>ТЕМА 1. ОБЩИЕ ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЧВ</u>	6
<u>1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОГО ВЕСА (ПЛОТНОСТИ) ТВЕРДОЙ ФАЗЫ ПОЧВЫ</u>	7
<u>1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЪЕМНОГО ВЕСА ПОЧВЫ ИЗ РАССЫПНОГО ОБРАЗЦА</u>	8
<u>1.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРОЗНОСТИ (СКВАЖНОСТИ) И СТЕПЕНИ АЭРАЦИИ</u> <u>ПОЧВЫ</u>	10
<u>ТЕМА 2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ</u>	11
<u>2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ</u>	12
<u>2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТРЕБНОСТИ ПОЧВ В БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТАХ</u>	15
<u>ТЕМА 3. ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ</u>	17
<u>3.1. ДИАГНОСТИКА ПРИСУТСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ В ПОЧВЕ</u>	19
<u>3.2. ФИТОТОКСИЧНОСТЬ ПОЧВЫ</u>	21
<u>3.3. МНОГОКОМПОНЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ</u> <u>ПОЧВЕННОГО ПОКРОВА ГОРОДОВ</u>	24
<u>ТЕМА 4. КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА ДЕГРАДАЦИИ ПОЧВ</u>	29
<u>ПРИЛОЖЕНИЕ. ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ, НЕОБХОДИМЫЕ</u> <u>ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТ</u>	33

**Составители: Волкова Ирина Николаевна
Кондакова Галина Вячеславовна**

Экологическое почвоведение

*Лабораторные занятия
для студентов-экологов (бакалавров)*

Редактор, корректор А.А. Антонова
Компьютерная верстка И.Н. Ивановой

Подписано в печать 18.12.2002. Формат 60x84/16.
Бумага тип. Усл. печ. л. 2,1. Уч.-изд. л. 1,54.
Тираж 100 экз. Заказ .

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Ярославский государственный университет
150000 г. Ярославль, ул. Советская, 14.