

УДК 631.46

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ АГРЕГАТОВ ТИПИЧНЫХ ЧЕРНОЗЕМОВ В МНОГОЛЕТНИХ ПОЛЕВЫХ ОПЫТАХ

© 2017 г. А. Д. Железова^{1,2}, А. К. Тхакахова¹, Н. В. Ярославцева¹, С. А. Гарбуз¹, В. И. Лазарев³,
Б. М. Когут¹, О. В. Кутовая¹, В. А. Холодов^{1,2, *}

¹Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Россия, 119017, Москва, Пыжевский пер., 7, стр. 2

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

³Курский НИИ АПП, Россия, 305526, Курская обл., Курский р-н, пос. Черемушки, 10

*e-mail: vkholod@mail.ru

Поступила в редакцию 09.12.2015 г.

Изучены изменения микробиологических показателей, получаемых с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, в агрегатах 1–2 мм типичных черноземов в зависимости от вида землепользования в условиях разной интенсивности антропогенной нагрузки. В работе использовали образцы почв многолетних полевых опытов разного вида использования: бессменный чистый пар, бессменный картофель, 17-летняя залежь после бессменного чистого пара, заповедная ежегодно косимая степь. При отборе образцов использовали два подхода. В первом почву высушивали на воздухе, просеиванием на ситах выделяли фракцию 1–2 мм и определяли в них микробиологические показатели. Во втором образцы замораживали сразу после отбора в поле, агрегаты 1–2 мм извлекали вручную, непосредственно перед ПЦР-анализом. Показано, что допустимо использовать воздушно-сухие агрегаты черноземов для количественного анализа ДНК микробного сообщества в сравнительных исследованиях. Согласно количественной оценке содержания в почве консервативных участков ДНК разных филогенетических групп можно заключить, что бактериальное сообщество по этому показателю наиболее отзывчиво на вид использования черноземов и быстрее восстанавливается после снятия экстремальных антропогенных нагрузок по сравнению с другими микроорганизмами. Содержание ДНК архей в черноземе, находящемся 17 лет в залежи, значительно не отличалось от обрабатываемых аналогов. Количество общей ДНК микромицетов при оценке агрогенной нагрузки занимает промежуточное положение между количеством ДНК архей и бактерий.

Ключевые слова: PCR-Real Time, количественная ПЦР (qPCR), бактерии, археи, микромицеты, многолетние полевые опыты, черноземы, Chernozems

DOI: 10.7868/S0032180X17060120

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное использование почв для сельскохозяйственного производства может вызывать их деградацию, которая особенно выражена в верхних гумусовых горизонтах. Под воздействием интенсивных антропогенных нагрузок у почв может ухудшаться структура, уменьшаться содержание гумуса и элементов питания, биологическая активность, общая продуктивность пашни и др. [5, 7, 8, 11, 23, 26].

Характер использования почвы значительно влияет на ее биологическую активность и микробиологические показатели [4, 5, 13, 18, 28, 32], в том числе на количество бактерий и архей [37]. Ферментативная активность и численность бактерий снижена в подвергавшихся антропогенной нагрузке черноземах обыкновенных по сравнению с целинными, причем это наблюдается как в верхней, так и в средней частях почвенного профиля [5]. Аналогичная закономерность прослеживается

для численности азотфиксаторов (в КОЕ/г) в серых лесных почвах Тульской обл. [18].

Влияние интенсивности сельскохозяйственных обработок на свойства почвы изучается давно, однако процесс восстановления почвы при уменьшении антропогенного воздействия мало исследован. Микробное сообщество почвы способно быстро реагировать на смену условий среды, однако его возвращение к прежнему состоянию, как и восстановление почвы в целом при смене вида землепользования происходит медленно [29]. Изучение изменений в структуре и функционировании микробного сообщества, связанных с уменьшением антропогенной нагрузки (различные виды землепользования и интенсивность агрогенных воздействий), позволит оценить микробиологическое состояние черноземных почв, и, следовательно, сделать вывод о здоровье почвы и ее способности к восстановлению [14].

Для исследования биомассы и структуры микробного сообщества почвы обычно применяются

классические методы почвенной микробиологии: исследование субстрат-индуцированного дыхания, ферментативной активности, люминесцентную микроскопию, посев на питательные среды. Однако эти методы обладают ограничениями (недооценка некультивируемых форм, трудоемкость, косвенная оценка биомассы через активность), не позволяющими охарактеризовать общий пул микроорганизмов в почве [10].

В настоящее время все большее распространение получают новые методы, основанные на количественном учете и анализе ДНК микроорганизмов, выделенной из почвы [9, 16, 24]. Отличием этих подходов является высокая чувствительность и информативность. Кроме того, только молекулярно-биологическими методами учитываются некультивируемые формы микроорганизмов [10]. Метод количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет оценить численность филогенетических групп микробного сообщества почвы с помощью определения концентрации фрагментов ДНК в экстрагируемом растворе [10]. На основе этого метода возможен количественный анализ функциональных характеристик микробного сообщества почв [34]. На данный момент новые методы количественного учета филогенетических групп почвенных микроорганизмов применяются реже методов классической микробиологии. Это обусловлено высокой стоимостью анализа и затрудненной интерпретацией полученных результатов.

Однако изучение микробного сообщества в валовом образце почвы не дает информацию о распределении микробиоты между структурными отдельностями. В то же время информация о распределении микробного сообщества между макроагрегатами разных размеров, а также в микроагрегатах могла бы внести существенный вклад в интерпретацию феномена образования–разрушения почвенной структуры и связанных с ним процессов накопления, трансформации, минерализации органического вещества [30, 31, 33]. Недостаток работ в этой области связан с трудностями, возникающими при выделении препаратов почвенных агрегатов для дальнейшего анализа. Обычно для количественного определения ДНК в почве образцы рекомендуется сразу замораживать, сохраняя в таком виде непосредственно до проведения анализа. Замораживание до $-20...-70^{\circ}\text{C}$ является общепринятым способом хранения образцов почв для анализа микробного сообщества молекулярно-биологическими методами, основанными на работе с общей ДНК [27]. Считается, что при замораживании почвы микробиологические процессы останавливаются, ДНК сохраняется благодаря отсутствию нуклеазной ферментной активности, и поэтому такой способ хранения позволяет исследователям анализировать почву в состоянии, максимально прибли-

женном к моменту отбора пробы [27, 35]. Вместе с тем выделение агрегатов из замороженных образцов затруднено: смерзшаяся почвенная масса не позволяет проводить стандартные процедуры просеивания. Предложено несколько подходов для выделения агрегатов с целью последующего микробиологического исследования. По одному из них рекомендуется использовать почву с полевой влажностью, сразу разделить отобранные образцы на структурные отдельности и провести необходимые анализы, затратив на это небольшой промежуток времени, например, 24 ч [19]. Однако этот подход имеет ряд недостатков. Во-первых, трудно отделить агрегаты нужного размера из влажной почвы, что вносит существенную ошибку. Во-вторых, влажность почвы – динамичная величина и может влиять на размер агрегатов, например, частицы <0.25 мм после увлажнения–иссушения могут сами по себе собираться в макроагрегаты [15], что также осложняет отбор необходимой размерной фракции. В-третьих, отбор и анализ образцов при разной влажности осложняет интерпретацию результатов, полученных для образцов с разной полевой влажностью. В-четвертых, при изучении почв в труднодоступных местах невозможно оперативно доставить образцы в лабораторию.

Другой подход – высушивание образцов в условиях незначительной биологической активности. Замороженную почву помещают в эксикатор над десикантами и высушивают при $+5^{\circ}\text{C}$ [19]. Однако остается открытым вопрос, насколько изменяется микробиологическая активность при такой подготовке образца. Несмотря на свою перспективность, данный подход требует дальнейшей верификации, на что указывают и сами авторы работы [19].

В то же время есть указания, что при хранении почвенных образцов в воздушно-сухом состоянии количество ДНК изменяется незначительно, что позволяет исследовать их методами молекулярной биологии [24, 35]. Также необходимо принять к сведению тот факт, что методом количественного определения ДНК учитываются все микроорганизмы, находящиеся в данный момент в почве [10] вне зависимости от их состояния и формы. Поэтому при высушивании должно сохраняться то же число микробных клеток, что и в момент отбора образца почвы, меняется лишь форма существования микроорганизмов. В связи с этим, вероятно, высушивание не должно оказывать существенного влияния на получаемые результаты. При этом исчезают все вышеизложенные проблемы с анализом микробного разнообразия в структурных отдельностях.

В предлагаемой работе предпринята попытка сравнить содержание консервативных участков ДНК, определяемое ПЦР в реальном времени, в

Таблица 1. Координаты и высота над уровнем моря точек пробоотбора вариантов многолетних полевых опытов

Вариант	Координаты	Высота, м
Бессменный чистый пар с 1964 г.	51°37,275 N, 36° 5.733 E	231
Залежь с 1998 г. после бессменного чистого пара	51°37.228 N, 36°15.727 E	231
Бессменный картофель с 1964 г. без внесения удобрений	51°37.198 N, 36°15.651 E	225
Ежегодно косимая степь, ЦЧГБЗ им. В.В. Алехина	51°34.207 N, 36°05.444 E	337

почвенных агрегатах 1–2 мм с разной подготовкой проб: из воздушно-сухих и замороженных образцов.

Цель работы – определение изменения микробиологических показателей агрегатов 1–2 мм типичного чернозема, получаемых с помощью ПЦР в реальном времени, в зависимости от вида землепользования в условиях разной интенсивности антропогенной нагрузки.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов чернозема типичного [6], *Typlic Chernozems (Clayic)* [25], для анализа микробного сообщества проводили летом 2014 г. на нескольких площадках длительного полевого опыта Почвенного института им. В.В. Докучаева на территории Курского НИИ АПП. Отбор проводили со следующих вариантов: бессменный чистый пар с 1964 г. (вариант бессменный пар); залежь с 1998 г. после бессменного чистого пара с 1964 г.; бессменный картофель с 1964 г. без внесения удобрений. Следует отметить, что изучение почвы залежи после бессменного чистого пара и сравнение данного участка с другими позволяет проанализировать процесс восстановления почвенных и микробиологических свойств в контролируемых условиях многолетнего опыта. В качестве варианта ненарушенного типичного чернозема использовали образцы почвы ежегодно косимой степи в Центрально-черноземном государственном биосферном заповеднике им. В.В. Алехина (Курская обл.). Место отбора образцов – территория заповедной Стрелецкой степи – представляет типичный чернозем, максимально приближенный к природному ненарушенному состоянию. Данный участок находится в 20 км от опытной площадки Курского НИИ АПП (табл. 1).

На каждом варианте опыта на площадке радиусом 10 м из слоя 0–15 см верхнего гумусового горизонта отбирали пять индивидуальных образцов ненарушенного сложения массой 1–2 кг каждый, которые подвергались процедуре высушивания. Дополнительно из тех же мест отбора проб брали ненарушенный индивидуальный образец около 500 г, который в течение 24 ч замораживали и хранили при -18°C .

В итоге был сформирован ряд почв по принципу возрастания антропогенной сельскохозяй-

ственной нагрузки: ежегодно косимая степь (нагрузки нет) < залежь, 17 лет (восстанавливающаяся почва) < бессменный картофель (сильная нагрузка вследствие интенсивного возделывания пропашных культур без удобрений) < бессменный чистый пар (экстремальная нагрузка на почву в отсутствие поступления растительных остатков).

Отобранные образцы (за исключением замороженных) высушивали на воздухе в течение двух недель и просеивали через сита (10, 7, 5, 3, 2, 1, 0.5, 0.25 мм) для проведения структурного анализа [17]. Фракция размером 1–2 мм доминировала во всех вариантах опыта в составе агрономически ценных агрегатов (0.25–10 мм), поэтому она была взята для выделения ДНК. Кроме того, ранее показано, что в агрегатах 1–5 мм по сравнению с другими увеличена интенсивность микробиологических процессов [3]. Для каждого варианта землепользования чернозема отбирали размерную фракцию 1–2 мм как из воздушно-сухой почвы, так и из замороженных образцов. В полученных препаратах структурных отдельностей определяли количество ДНК. Повторность эксперимента была трехкратная.

ДНК из образцов структурных отдельностей выделяли из 0.2 г после механического разрушения в экстрагирующем буфере, содержащем 350 мкл раствора А (натрий-фосфатный буфер – 200 мМ, изоцианат гуанидина – 240 мМ, pH 7), 350 мкл раствора Б (Трис-НСI – 500 мМ, SDS – 1% по массе к объему, pH 7) и 400 мкл смеси фенола с хлороформом (1 : 1). Разрушение образца с использованием циркониевых шариков проводили в течение 40 с на гомогенизаторе Precellys 24 (BertinTechnologies, Франция) при максимальной мощности (скорость 6500 об./мин). Полученную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 16000 об./мин. Водную фазу отбирали и повторно экстрагировали хлороформом. ДНК осаждали, добавляя равный объем изопропилового спирта. После центрифугирования осадок промывали 70%-ным раствором этанола и далее растворяли в воде при температуре 65°C в течение 5–10 мин. Очистку ДНК проводили с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим выделением ДНК из геля методом сорбции на оксиде кремния [2].

Количественную оценку ДНК бактерий, архей и микромицетов осуществляли методом ПЦР в реальном времени. Для определения concentra-

Таблица 2. Количества копий участков ДНК в агрегатах 1–2 мм типичных черноземов разного вида использования с разной подготовкой образцов: высушивание на воздухе и замораживание

Вид использования	Подготовка агрегатов	
	высушивание	замораживание
	Бактерии	
Бессменный чистый пар с 1964 г.	1.99×10^9	1.94×10^9
Бессменный картофель с 1964 г.	5.74×10^9	4.24×10^9
Залежь с 1998 г. после бессменного пара	1.98×10^{10}	2.83×10^9
Ежегодно косимая степь	3.40×10^{10}	1.05×10^{10}
	Микромицеты	
Бессменный чистый пар с 1964 г.	2.69×10^7	1.21×10^7
Бессменный картофель с 1964 г.	2.60×10^7	2.60×10^7
Залежь с 1998 г. после бессменного пара	4.95×10^7	2.52×10^7
Ежегодно косимая степь	4.97×10^7	2.39×10^7
	Археи	
Бессменный чистый пар с 1964 г.	2.75×10^8	7.02×10^7
Бессменный картофель с 1964 г.	3.02×10^8	2.27×10^8
Залежь с 1998 г. после бессменного пара	4.59×10^8	1.21×10^8
Ежегодно косимая степь	1.49×10^9	4.62×10^8

ции ДНК в очищенном препарате реакция была проведена в амплификаторе iCycler (BioRad) с измерением интенсивности флуоресценции реакционной смеси на каждом цикле. Реакционную смесь готовили из препарата SuperMix EvaGreen BioRad (концентрированный буфер с дезоксирибонуклеотидами, полимеразой Sso7d-fusion, $MgCl_2$, красителем EvaGreen и стабилизаторами). Для амплификации консервативных участков ДНК разных групп микроорганизмов использовали праймеры Eub338 и Eub518 (бактерии), ITS1f и 5.8s (микромицеты), 915f и 1059r (археи) [21, 38]. Реакцию проводили по следующему протоколу: 1) $95^\circ C$ – 3 мин, 2) денатурация двухцепочечной ДНК при $95^\circ C$ – 10 с, 3) отжиг праймеров на матрице при $50^\circ C$ – 10 с, 4) удлинение цепи ДНК при $72^\circ C$ – 20 с, 5) считывание значений флуоресценции, 49-кратное повторение этапов 2–5, 6) $65^\circ C$ – 5 с, 7) $95^\circ C$ – 5 с.

Концентрацию ДНК образцов определяли с помощью программного обеспечения CFX Manager по калибровочному графику зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ДНК, созданному по серии стандартных растворов. В качестве стандартов для бактерий использовали растворы клонированных фрагментов рибосомального оперона *Escherichia coli*, для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*, для микромицетов – штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Meуen 1В-D1606. Определяли концентрацию ДНК консервативных участков, присутствующих в генетическом материале любых бактерий, архей (участок ДНК, кодирующий 16S рРНК) и микромицетов (участок ДНК, кодирующий 18S рРНК)

и пересчитывали в количество копий данных участков на грамм абсолютно сухой почвы для бактерий, архей и микромицетов по уравнению:

$$A = (Q/m) \times 10^3,$$

где A – количество копий консервативного участка ДНК, копий/г почвы; Q – концентрация ДНК в растворе, рассчитанная программой CFX Manager; m – навеска абсолютно-сухой почвы, г; 10^3 – коэффициент пересчета, выведенный с учетом разведений экстракта ДНК, выделенного из почвы [1].

По полученным данным (количеству копий/г почвы) можно сделать заключение о численности микроорганизмов в образцах, приближенные к реальным показателям. Число рибосомальных оперонов в геномах бактерий, микромицетов и архей варьирует в широких пределах, но при пересчете по усредненным показателям распределение численности бактерий, архей и микромицетов в образцах остается неизменным [1].

Считаем нужным обратить внимание на то, что все расчеты содержания ДНК в почве выполняли на сухую навеску: иначе нельзя сопоставлять данные, полученные для замороженной и воздушно-сухой почвы.

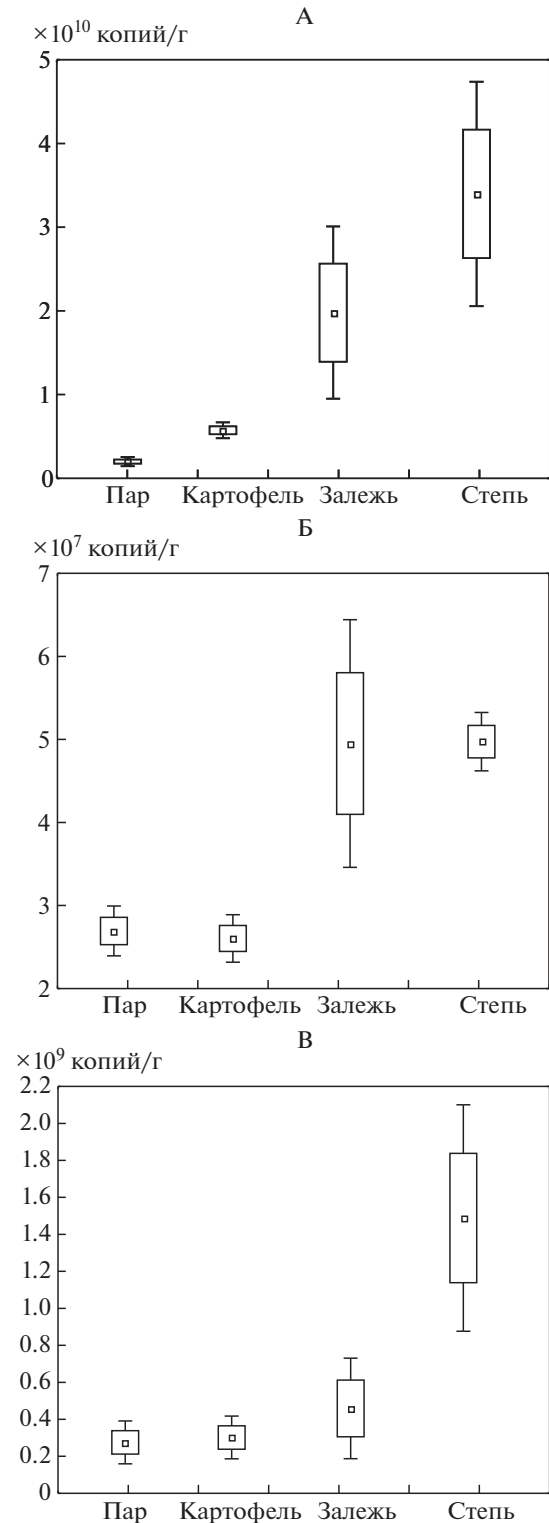
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 2 приводятся средние значения количества копий участков ДНК для агрегатов черноземов разного вида использования, полученные для предварительно замороженных и воздушно-сухих образцов. Многофакторный дисперсион-

ный анализ показал значимость различий количества ДНК разных групп микроорганизмов при двух способах пробоподготовки (F -критерий = 17.56, $p = 0.0001$) и при разных типах землепользования (F -критерий = 12.85, $p = 0.000003$). Более того, при рассмотрении средних видно, что количество ДНК было больше в образцах воздушно-сухих агрегатов. Объяснить наблюдаемые различия возрастанием биологической активности вследствие высушивания образцов трудно. Поэтому наиболее разумное объяснение – это возможные ошибки при выделении агрегатов из замороженных образцов. В самом деле, при извлечении из смерзшейся почвенной массы агрегатов вручную, без использования сит, неизбежны ошибки в определении их размеров. Кроме того, агрегат, возможно, разрушается при извлечении, и в работу идут только осколки, в которых преобладает его периферическая часть. Также можно ошибочно принять за агрегат смерзшуюся конгломерацию бесструктурных частиц. Все это осложняет интерпретацию результатов с использованием замороженных образцов. Следует также отметить, что методика агрегатного анализа почв подразумевает выделение фракции агрегатов 1–2 мм из воздушно-сухого образца с помощью просеивания. Учитывая вышеперечисленные аргументы, для характеристики микробного сообщества агрегатов определенной фракции авторами были использованы данные, полученные при анализе воздушно-сухих образцов.

Количество копий консервативного участка бактерий ДНК для агрегатов 1–2 мм типичных черноземов разного вида использования приводится на рисунке. Минимальное содержание копий фрагмента бактериальной 16S рРНК наблюдали в варианте бессменного пара (1.99×10^9 копий/г), максимальное в ежегодно косимой степи (3.40×10^{10} копий/г). Порядок значений близок к численности бактерий в черноземах, определяемой методом люминесцентной микроскопии [12]. Также, сходные результаты по количеству бактериальной ДНК (4.5×10^9 – 3.5×10^{10}) наблюдали при сравнении залежи и возделываемых площадок с различающимися системами удобрений на почвах Швеции [37].

Рассматриваемый показатель образовывал четкий ряд – со снижением антропогенной нагрузки на почву, количество бактериальной ДНК возрастало. При этом следует отметить, что все отличия средних были значимыми (t -тест, $\alpha = 0.05$), за исключением сопоставления вариантов залежь и степь, которые отличались друг от друга незначимо. Полученные данные позволяют предположить, что бактериальное сообщество (его численность) в агрегатах типичного чернозема быстро восстанавливается. Через 17 лет после вывода опытного участка из бессменного черного



Количество копий консервативного участка ДНК бактерий (А), микромицетов (Б), архей (В) в агрегатах 1–2 мм типичного чернозема многолетних опытов: пар – бессменный чистый пар с 1964 г., картофель – бессменный картофель с 1964 г., залежь – залежь с 1997 г. после бессменного чистого пара с 1964 г., степь – ежегодно косимая степь.

пара, количество бактериальной ДНК в агрегатах не отличается от ненарушенной почвы ежегодно косимой степи.

В случае микромицетов также отмечали увеличение содержания ДНК этих микроорганизмов в ряду снижения антропогенной нагрузки бессменный пар < бессменный картофель < залежь < ежегодно косимая степь. Показатель изменялся от 2.60×10^7 до 4.97×10^7 копий/г. При этом значения соседних величин (пар—картофель и залежь—степь) в этом ряду значимо не отличались друг от друга. Вероятно, это связано с высоким варьированием количества ДНК микромицетов в почве. Таким образом, микромицеты являются менее показательными микроорганизмами при оценке антропогенной нагрузки, хотя отражают агрогенные изменения.

В целом полученные результаты соответствуют литературным данным. Показано, что сельскохозяйственные обработки снижают численность микромицетов вследствие нарушения почвенной структуры [29]. Помимо этого, в другой работе выявлена прямая зависимость количества ДНК микромицетов от логарифма количества лет, в течение которых почва не подвергалась вспашке [22].

Следует отметить, что при использовании других методов анализа микробного сообщества и его микромицетной составляющей, например, оценки биомассы мицелия и спор [12], выявляется зависимость биомассы микромицетов от степени агрогенной нагрузки. Однако целью нашей работы было сравнение микробного сообщества определенной фракции почвенных агрегатов. Известно, что микромицетный мицелий способствует формированию макроагрегатов, и его количество закономерно уменьшается при регулярном агрогенном нарушении почвенной структуры. Возможно, количество ДНК микромицетов не настолько отзывчиво на подобные воздействия.

Порядок полученных значений для количества ДНК архей соответствует оценкам с помощью метода количественной ПЦР другими авторами [20, 36, 37]. При этом по содержанию ДНК архей, от всех вариантов опыта значимо отличался только вариант ежегодно косимой степи (1.49×10^9), остальные варианты значимо друг от друга не отличались, и содержание ДНК архей в них было существенно ниже (2.75 – 4.59×10^8). Вероятно, эта филогенетическая группа резко реагирует на обработку почвы и плохо восстанавливается после снятия антропогенной нагрузки по сравнению с другими рассмотренными группами микроорганизмов. В литературе имеются указания на зависимость численности архей от вида сельскохозяйственного использования [20, 36, 37]. Однако в случае рассматриваемых черноземов, зна-

чимых отличий между почвами, подвергавшимися разной агрогенной нагрузке, не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количественная оценка содержания в почве ДНК разных филогенетических групп позволяет оценивать антропогенную нагрузку на черноземе. На основе изменения количественных показателей бактериальной ДНК следует, что бактериальное сообщество наиболее отзывчиво на вид использования черноземов и быстрее восстанавливается при переводе в залежь по сравнению с другими микроорганизмами.

Напротив, на количественном содержании ДНК архей дольше других рассмотренных групп отражается обработка почв: через 17 лет после вывода чернозема в залежь содержание ДНК архей в нем значимо не отличалось от обрабатываемых аналогов. Количество общей ДНК микромицетов при оценке агрогенной нагрузки занимает промежуточное положение между количеством ДНК архей и бактерий. Вероятно, эта филогенетическая группа менее отзывчива на обработку почвы по сравнению с бактериями, но лучше восстанавливается после снятия нагрузки в отличие от архей.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект 14-26-00079.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андронов Е.Е., Петрова С.Н., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Рахимгалиева С.Ж., Ахмеденов К.М., Горобец А.В., Сергалиев Н.Х. Изучение структуры микробного сообщества почв разной степени засоленности с использованием T-RFLP и ПЦР с детекцией в реальном времени // Почвоведение. 2012. № 2. С. 173–183.
2. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Выделение ДНК из образцов почвы (методические указания). СПб., 2011. 27 с.
3. Василенко Е.С., Кутюева О.В., Тхакахова А.К., Мартынов А.С. Изменение численности микроорганизмов в зависимости от величины агрегатов гумусового горизонта миграционно-мицелярного чернозема // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2014. Вып. 73. С. 85–97.
4. Головченко А.В., Полянская Л.М. Сезонная динамика численности и биомассы микроорганизмов по профилю почвы // Почвоведение. 1996. № 10. С. 1227–1233.
5. Даденко Е.В., Мясникова М.А., Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая активность чернозема обыкновенного при длительном использовании под пашню // Почвоведение. 2014. № 6. С. 24–733. doi 10.7868/S0032180X14060021
6. Классификация и диагностика почв СССР. М.: Колос, 1977. 223 с.
7. Козут Б.М., Сысуев С.А., Холодов В.А. Водопрочность и лабильные гумусовые вещества типичного чернозема при разном земледелии // Почвоведение. 2012. № 5. С. 555–561.

8. Кузнецова И.В., Уткаева В.Ф., Бондарев А.Г. Нормативы изменения физических свойств пахотных черноземов лесостепной зоны Европейской России в условиях интенсивного сельскохозяйственного использования // Почвоведение. 2014. № 1. С. 71–81. doi 10.7868/S0032180X14010067
9. Кутювая О.В., Лебедева М.П., Тхакахова А.К., Иванова Е.А., Андронов Е.Е. Метагеномная характеристика биологического разнообразия крайнеаридных пустынных почв Казахстана // Почвоведение. 2014. № 5. С. 554–561. doi 10.7868/S0032180X15050044
10. Мануچارова Н.А. Молекулярно-биологические аспекты исследований в экологии и микробиологии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2010. 47 с.
11. Медведев В.В., Плиско И.В., Бигун О.Н. Сравнительная характеристика оптимальных и реальных параметров черноземов Украины // Почвоведение. 2014. № 10. С. 1247–1261. doi 10.7868/S0032180X14100086
12. Полянская Л.М., Гейдебрехт В.В., Степанов А.Л., Звягинцев Д.Г. Распределение численности и биомассы микроорганизмов по профилям зональных типов почв // Почвоведение. 1995. № 3. С. 322–328.
13. Савченко Л.А. Численность и соотношение основных групп микрофлоры в мощном типичном черноземе // Мат-лы конф. “Флора и растительность Центрального Черноземья – 2012”. С. 157–160.
14. Соколов М.С., Марченко А.И. Экологический мониторинг здоровья почвы в системе “ОВОС” (методология выбора критериев оценки) // Агрохимия. 2013. № 3. С. 3–18.
15. Холодов В.А. Способность почвенных частиц самопроизвольно образовывать макроагрегаты после цикла увлажнения и высушивания // Почвоведение. 2013. № 6. С. 698–706. doi 10.7868/S0032180X13040072
16. Чернов Т.И., Тхакахова А.К., Лебедева М.П., Кутювая О.В. Полнопрофильный анализ микробиома целинного светлого солончака Джаныбекского стационара // Бюл. Почв. ин-та им В.В. Докучаева. 2015. Вып. 77. С. 66–77.
17. Шейн Е.В. Курс физики почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2005. 432 с.
18. Эмер Н.Р., Семенов А.М., Зеленев В.В., Зинякова Н.Б., Костина Н.В., Голиченко М.В. Ежесуточная динамика численности и активности азотфиксирующих бактерий на участках залежной и интенсивно возделываемой почвы // Почвоведение. 2014. № 8. С. 963–970. doi 10.7868/S0032180X14080024
19. Bach E.M., Hofmockel K.S. Soil aggregate isolation method affects measures of intra-aggregate extracellular enzyme activity // Soil Biol. Biochem. 2014. V. 69. P. 54–62.
20. Bissett A., Richardson A.E., Baker G., Thrall P.H. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function // Appl. Soil Ecology. 2011. V. 51. P. 66–78.
21. Fierer N., Jackson J.A., Vitgalys R., Jackson R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays // Appl. Environ. Microbiology. 2005. V. 71(7). P. 4117–4120.
22. Gangneux C., Akpa-Vinceslas M., Sauvage H., Desaire S., Houot S., Laval K. Fungal, bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from silty soils under different farming practices: Relationships with chloroform-labile carbon // Soil Biol. Biochem. 2011. V. 43. P. 431–437.
23. Grandy A.S., Strickland M.S., Lauber C.L., Bradford M.A., Fierer N. The influence of microbial communities, management, and soil texture on soil organic matter chemistry // Geoderma. 2009. P. 278–286.
24. Hirsch P.R., Mauchline T.H., Clark I.M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology (review) // Soil Biol. Biochem. 2010. V. 42. P. 878–887.
25. IUSS Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome. 181 p.
26. Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types // Soil Biol. Biochem. 2008. V.40. P. 2407–2415.
27. Lee Y., Lorenz N., Dick L., Dick R. Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties // Soil Sci. Soc. Am. J. 2007. V. 71. P. 1299–1305.
28. Lupwayi N.Z., Lafond G.P., Ziadi N., Grant C.A. Soil microbial response to nitrogen fertilizer and tillage in barley and corn // Soil Tillage Res. 2012. V. 118. P. 139–146.
29. Simmons B.L., Coleman D.C. Microbial community response to transition from conventional to conservation tillage in cotton fields // Appl. Soil Ecology. 2008. V. 40. P. 518–528.
30. Six J., Bossuyt H., Degryze S., Denef K. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics // Soil Tillage Res. 2004. V. 79. P. 7–31.
31. Six J., Paustian K., Elliott E.T., Combrink C. Soil structure and organic matter: I. Distribution of aggregate-size classes and aggregate-associated carbon // Soil Sci. Soc. Am. J. 2000. V. 64. P. 681–689.
32. Susyan E.A., Wirth S., Ananyeva N.D., Stolnikova E.V. Forest succession on abandoned arable soils in European Russia e Impacts on microbial biomass, fungal-bacterial ratio, and basal CO₂ respiration activity // European J. Soil Biol. 2011. V. 47 P. 169–174.
33. Tisdall J.M., Oades J.M. Organic matter and water-stable aggregates in soils // J. Soil Sci. 1982. V. 62. P. 141–163.
34. Van Elsas J.D., Boersma F.G.H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere // European J. Soil Biol. 2011. V. 47. P. 77–87.
35. Wallenius K., Rita H., Simpanen S., Mikkonen A., Nieminen R.M. Sample storage for soil enzyme activity and bacterial community profiles // J. Microbiological Methods. 2010. V. 81. P. 48–55.
36. Wang B.-Z., Zhang C.-X., Liu J.-L., Zeng X.-W., Li F.-R., Wu Y.-C., Lin X.-G., Xiong Z.-Q., Xu J., Jia Z.-J. Microbial community changes along a land-use gradient of desert soil origin // Pedosphere. 2012. V. 22(5). P. 593–603.
37. Wessén E., Hallin S., Philippot L. Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management // Soil Biol. Biochem. 2010. V. 42. P. 1759–1765.
38. Yu Y., Lee C., Hwang S. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method // Water Science and Technology. 2005. V. 52. P. 85–91.