

## МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО ПОЧВЫ: ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ\*

(обзор)

Ю.В. КРУГЛОВ

Исследование таксономического и функционального разнообразия ассоциации почвенных микроорганизмов имеет исключительно большое теоретическое значение для понимания структуры микробного сообщества почвы, характера взаимодействия отдельных видов микроорганизмов, входящих в это сообщество, а также их участия в процессах почвообразования и круговороте веществ. В настоящей статье дается краткая история представлений о функционировании микробного комплекса почвы, обеспечивающего трансформацию и минерализацию органического вещества в процессах почвообразования. Почва как среда обитания микроорганизмов гетерогенна и гетерофазна, что определяет микроразнообразие характера распределения и жизнедеятельности микроорганизмов, обитающих в ней. Структура ассоциации микроорганизмов и ее физиологические параметры изменяются во времени и пространстве, подвержены значительному влиянию природных и антропогенных факторов (Д.Г. Звягинцев, 1987), что вызывает методические трудности и определяет значительную вариабельность результатов при оценке почвенной микрофлоры в работах разных авторов. В настоящем обзоре обсуждаются методические подходы при определении физиологического разнообразия ассоциации почвенных микроорганизмов. Традиционные методы применения селективных питательных сред на протяжении столетия позволили выявить многочисленные физиологические группы микроорганизмов и составить представление об их роли в круговороте веществ, процессах почвообразования и питании растений. Однако за последние 20 лет подобные работы практически не дали ничего принципиально нового как в экологических исследованиях, так и в агрономии. В конце 1990-х годов для изучения физиологического разнообразия были предложены методика анализа спектра потребления органических субстратов (СПС) природной ассоциацией микроорганизмов на базе системы BIOLOG, используемой ранее главным образом в медицинской и общей микробиологии для характеристики исследуемого штамма (J.L. Garland, A.L. Mills, 1991). Такой подход получил дальнейшее развитие (Н. Insam, 1997; М.В. Горленко, П.А. Кожевин, 2005 и др.). Разработаны модификации этого метода (EcoPlates, Эколог и др.), различающиеся по набору органических субстратов, которые, как полагают авторы, с наибольшей вероятностью присутствуют в природных средах. Приборное обеспечение системы Эколог (М.В. Горленко, П.А. Кожевин, 2005) позволяет определить не только спектр используемых микроорганизмами органических субстратов, но и дать количественную оценку потребления каждого из них. Для обработки и интерпретации значительного объема информации, получаемой при анализе почвенных образцов, предложен аппарат многомерной математической статистики, рангового распределения, кластерный анализ, а также экологические индексы Шеннона и Пielу. Метод СПС (мульти-субстратное тестирование) имеет высокую производительность, хорошую разрешающую способность ( $10^4$ ), удовлетворительную воспроизводимость и служит высокотехнологичным и эффективным инструментом оценки физиологического разнообразия. В статье рассматриваются положительные и отрицательные стороны метода. СПС отражает в той или иной степени потенциал аэробной почвенной микрофлоры, использующей низкомолекулярные органические соединения в процессах катаболизма. Однако наличие нескольких модификаций системы, а также вопросы технического характера служат причиной того, что затруднено сопоставление результатов, полученных разными авторами, отсутствует унифицированный протокол анализа СПС, который требуется для выполнения сравнительных экологических исследований и создания соответствующих национальных и международных баз данных. Таким образом, система анализа спектра потребления органических субстратов находится в состоянии развития и апробации и с накоплением экспериментальных данных и их критического анализа имеет хорошие перспективы для использования в области экологии почвы, изучения взаимоотношения микроорганизмов и растений, а также оценки действия антропогенных факторов.

**Ключевые слова:** ассоциация, физиологические группы, физиологическое разнообразие бактерий, спектр потребления субстратов, мультисубстратное тестирование, системы BIOLOG, ЭКОЛОГ, EcoPlates.

Впервые на почву как живую систему, один из ключевых факторов

\* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-26-00094).

функционирования которой составляют микроорганизмы, обратили внимания основоположники научного почвоведения В.В. Докучаев и П.А. Костычев. Почва как среда обитания и продукт жизнедеятельности микроорганизмов представляет собой сложную систему, включающую разнообразные по физиологии виды, обеспечивающие биологический круговорот веществ, процессы формирования почв и их устойчивость к природным и антропогенным факторам. Этим определяется теоретическое и прикладное значение экологических исследований микробных сообществ. Ключевые факторы экологии микроорганизмов — таксономическое и функциональное разнообразие микробного сообщества и характер взаимодействия членов этого сообщества, обеспечивающие формирование почвы и минеральное питание растений.

В представленной статье обсуждаются модели функционирования микробного сообщества и условия жизнедеятельности микроорганизмов в почве. Рассматриваются методические подходы к изучению физиологического разнообразия ассоциации почвенных микроорганизмов, положительные и негативные стороны предлагаемых методов.

Экологический подход к изучению почвенной микрофлоры, ее видового и функционального разнообразия связан с классическими работами С.Н. Виноградского (1). На основании собственных исследований и накопившегося к тому времени опыта он приходит к выводу, что жизнедеятельность микрофлоры почвы основана на принципе «разделения труда, которое находит выражение <...> в способности к взаимодействию членов его коллектива». С.Н. Виноградский пишет: «Микробиологические процессы в почве состоят из множества фаз, сменяющих одна другую, каждая из которых связана с одним возбудителем или небольшой группы их» (1). Исходя из этого, он выделил две крупные последовательные фазы разрушения органического вещества в почве и две крупные группы (ассоциации) микробов, различающиеся по функциональной роли в этих процессах. На первой фазе происходит разложение растительных и животных остатков, осуществляемое зимогенной микрофлорой, попадающей в почву с растительными и животными остатками, на второй — разложение гумуса автохтонной микрофлорой почвы (1). При этом он считал, что автохтонная микрофлора представлена специфической группой микроорганизмов, использующих гумус в качестве энергетического материала и источника питания. С.Н. Виноградский в своих работах оставляет без внимания вопросы гумусообразования. Но априори можно предполагать, что оно происходит в процессе разложения растительных остатков зимогенной микрофлорой.

Н.М. Лазарев (2), развивая концепцию С.Н. Виноградского, рассматривал уже три большие функциональные группы микроорганизмов. Первая из них — собственно зимогенная микрофлора, усваивающая белок и мономеры, которые попадают в почву с растительными остатками. Вторая — аутохтонная микрофлора А, участвующая в разложении разнообразных растительных биополимеров (с широким варьированием соотношения углерода и азота), в процессе трансформации которых образуются так называемые  $\alpha$ -гуматы, богатые азотом. По мере их накопления в почве жизнедеятельность названной группы микроорганизмов постепенно затухает вследствие исчерпания исходного материала и аккумуляции гуматов, которые представляют собой продукты жизнедеятельности этих микроорганизмов и токсичны для них, то есть наблюдается своего рода катаболическая репрессия. Далее наступает этап разложения  $\alpha$ -гуматов автохтонной микрофлорой Б. В представлении Н.М. Лазарева, в процессе трансформации органического вещества изменяется его качественный состав и, соответственно, структура микробного сообщества. В современном понимании

происходит сукцессия микрофлоры, обусловленная изменением источников питания и физико-химических параметров среды обитания микроорганизмов. По мнению Н.М. Лазарева, поверхность минералов, органическое вещество и микроорганизмы образуют комплекс, который он называл биоорганоминеральным. К сожалению, эта концепция не получила дальнейшего развития. Е.Н. Мишустин, принимая в целом концепцию С.Н. Виноградского (3), вводит в систему еще две группы олиготрофных и хемоавтотрофных микроорганизмов.

Дальнейшее развитие идеи С.Н. Виноградского получили в работе Т.В. Аристовской (4), которая, опираясь на принцип «специализации и разделения труда» в ассоциации микроорганизмов, выдвинула концепцию об элементарных почвенно-биологических процессах (ЭПБП), включающих биологическую трансформацию растительного опада, образование и разложение гумуса, деструкцию минералов почвообразующей породы, минералообразование, ортштейнообразование и засоление почв, причем первые пять из семи перечисленных ЭПБП, по ее мнению, обязательны для всех типов почвообразования и отражают саму сущность этого явления (4). Глее-, ортштейно- и бокситоразование, засоление и, возможно, другие трансформации, в которых участвуют микроорганизмы, могут характеризовать лишь формирование некоторых специфических типов почв (4).

Г.А. Заварзин в качестве основного дифференциального признака функционирования микрофлоры почвы выделяет две функциональные группы: микроорганизмы, способные продуцировать гидролитические экзоферменты (гидролитики), что дает им преимущество на начальных стадиях разложения биополимеров, и так называемая микрофлора рассеяния, использующая мономеры, которые представляют собой продукты распада биополимеров (5). Функционально эти две группы взаимосвязаны в системе и работают последовательно.

Развивая взгляды Г.А. Заварзина, В.С. Гузев и П.И. Иванов (6) предложили схему функционирования зимогенной части микробной системы в почве, где процесс разложения биополимеров, попадающих туда в виде растительных остатков, начинают микроорганизмы-гидролитики, которые, выделяя гидролитические экзоферменты, разлагают биополимеры до мономеров. Последние, накапливаясь в почве, по принципу обратной связи вызывают репрессию синтеза экзогидролаз, что обуславливает переход микроорганизмов-гидролитиков в покоящееся состояние. Образующиеся при этом мономеры используются другой группой — копиотрофами, интенсивное развитие которых приводит к резкому снижению содержания мономеров. В результате истощения пула мономеров в почве копиотрофы переходят в неактивное состояние, после чего начинается активная фаза деятельности олиготрофов, использующих мономеры в крайне низких количествах. При этом катаболическая репрессия синтеза гидролаз снимается, и цикл разложения биополимера повторяется. Таким образом, деятельность каждой из описанных групп микроорганизмов носит пульсирующий характер. По-видимому, предлагаемая этими авторами схема функционирования микробного сообщества почвы в одинаковой мере может быть использована в отношении как зимогенной, так и автохтонной микрофлоры, поскольку в том и другом случае основная часть органического вещества представлена биополимерами, составляющими энергетический ресурс и источник углеродного питания микроорганизмов.

Таким образом, в естественных экосистемах при постоянном притоке растительного опада, включающего различные биополимеры, происходит устойчивое функционирование микробной системы почвы. Как

Н.М. Лазарев, так и Т.В. Аристовская учитывали сложный химический состав попадающих в почву растительных остатков. Они отмечали, что трансформация органического вещества и минералов ассоциацией микроорганизмов включает последовательно и одновременно происходящие различные биохимические реакции, обусловленные трофическими и иными связями в самонастраивающейся системе. Концепция ЭПБП, по нашему мнению, наиболее полно отражает суть микробиологических процессов почвообразования. Т.В. Аристовская, не вдаваясь в детали биохимических реакций переработки субстрата, предпочитала рассматривать таксономический состав микрофлоры, принимающей участие в трансформации органического вещества и минералов. Н.М. Лазарев и его школа сосредоточили свое внимание на изучении физиологических групп микроорганизмов, предполагая, что именно последние могут быть своего рода индикаторами того или иного этапа в процессах трансформации.

Все изложенные выше модели предполагают, что микробиологические процессы в почве проходят в результате коллективной деятельности ассоциации микроорганизмов. Поведение отдельных видов, входящих в ассоциацию, и их физиологическая активность существенно отличаются от того, что наблюдается в чистой культуре, растущей на искусственной питательной среде. На формирование этих ассоциаций и их деятельность в почве огромное влияние оказывает минералогический состав, физико-химические свойства и структура почвы, а также состояние и характер распределения органического вещества в ней.

Структура почвы и распределение микроорганизмов. Почва (как продукт и среда обитания микроорганизмов) по структуре гетерогенна и включает в себя элементарные частицы, микро- и макроагрегаты, которые пронизаны капиллярами, имеет поры и пустоты разного объема, заполненные почвенным раствором, органоминеральным гелем и газами, состоящими главным образом из азота, кислорода и углекислоты (7). Степень этого наполнения может быть разной и изменяется в зависимости от влажности, температуры, конкретных метеоусловий, интенсивности протекающих в почве биохимических процессов и т.д.

Жизнедеятельность микроорганизмов связана с почвенными агрегатами (8-10). Они распределяются в виде пленок (11, 12) и микроколоний (13-15) на поверхности минералов и частиц органического вещества, попадающих в почву с растительными остатками, в пленочной воде на стенках пор и капилляров, в виде одиночных (реже множества) клеток в почвенном растворе, заполняющем поровое пространство почвенных агрегатов (8). Как правило, колонии и пленки формируются одним, иногда несколькими видами микроорганизмов (9, 15).

Взаимодействие микроорганизмов с поверхностью почвенных агрегатов имеет сложную природу и зависит от минералогического состава, характера органического вещества, размеров порового пространства (9, 10). Биохимическая активность микроорганизмов выше в крупных порах и практически отсутствует в мелких капиллярах, соизмеримых с размерами микроорганизмов (9). По данным Д.Г. Звягинцева (9), бактерии лучше развиваются в пленках толщиной от 10 мкм. Активность бактерий, сорбированных (иммобилизованных) на поверхности почвенных частиц, а также погруженных в органоминеральный гель, как правило, ниже, чем в растворе (9, 15).

Отмечено, что размеры бактериальных клеток, толщина грибного мицелия в почве меньше, чем в искусственной культуре микроорганизмов, выращиваемых на питательных средах (16).

Органическое вещество на разных этапах трансформации расти-

тельных остатков имеет неодинаковый состав и распределено неравномерно. Соответственно, топография распространения микроорганизмов в почве характеризуется микроразнообразием и мозаична как таксономически, так и функционально (2, 10, 17, 18). Поэтому в столь сложной гетерогенной среде, как почва, одновременно происходит разложение органического вещества растительного опада, формирование гумуса и его разложение, а также деструкция и новообразование минералов, которые находятся на разных фазах преобразований и разделены в пространстве как по профилю почвы, так и горизонтально.

Экологически микрофлора почвенных макроагрегатов представляет собой что-то вроде синузии, включающей популяции различных видов микроорганизмов и сложившейся в результате конкурентной борьбы за источники питания в конкретных физико-химических условиях почвенных агрегатов. В них жизнедеятельность микроорганизмов, по-видимому, строится по типу консорциума, а взаимоотношения между популяциями отдельных видов основаны на кооперации и проявляются разным образом — от симбиоза до синтрофии (19), что определяет устойчивость системы в сложившихся условиях. Смена этих условий приводит к конкурентной борьбе, перестройке ассоциации в соответствии с изменением физико-химических параметров почвы. Надо полагать, что таксономическое и функциональное разнообразие микроорганизмов подвержено значительным изменениям вследствие временной и пространственной вариабельности физико-химических свойств почвенных агрегатов.

Среди внешних факторов, обуславливающих эти изменения, ведущую роль играют осадки, периодическое пересыхание почвы и температура. В переувлажненных почвах поровое пространство почвенных агрегатов заполняется водой, снижается содержание кислорода, развиваются анаэробные процессы, происходит перестройка микробного комплекса почвы (20). Развиваются восстановительные процессы, обуславливающие образование закиси железа и марганца, сероводорода, метана, органических кислот и токсических соединений (4, 7, 20). Наоборот, пересыхание почвы приводит к усадке агрегатов, сужению порового пространства (7), включению микроорганизмов в матрицу обезвоженного органоминерального геля, повышению осмотического давления почвенного раствора, сосредоточенного главным образом в капиллярах и пленках (9). Это снижает биохимическую активность микроорганизмов, служит причиной их частичной гибели и перестройки микробсообщества в целом.

Основной внутренней фактор изменения таксономического и функционального разнообразия микрофлоры почвенных агрегатов — это сама жизнедеятельность микроорганизмов, которая вызывает качественные изменения органического вещества и накопление продуктов метаболизма, приводя к перестройке микробного комплекса (2, 9). В соответствии с этим изменяется его таксономический состав и физиологическое разнообразие.

Таким образом, микрофлора почвы — это самонастраивающаяся система, формируемая на уровне почвенных агрегатов и микрон, включающих главным образом растительные остатки, гумусовые комплексы и поверхность минералов. Таксономическое и функциональное разнообразие почвенной микрофлоры весьма изменчиво и зависит от капризов природы, внутренних закономерностей процессов разложения и синтеза органического вещества и физико-химических свойств почвы.

Физиологические группы микрофлоры почвы. Практически все исследования таксономического и функционального разнообра-

зия почвенных микроорганизмов основаны на анализе средних почвенных образцов и дают нам некоторые интегральные представления о качественном составе микрофлоры для достаточно крупного массива почвы. При этом надо четко понимать, что эти данные отражают доминирующие процессы и доминирующую микрофлору на дату отбора образцов в определенных метеоусловиях года и при определенном состоянии растительного покрова. Исследования почвенных образцов с тех же участков поля при отборе в других условиях дадут иные результаты, которые могут перечеркнуть сделанные ранее умозаключения.

Изучение функционального и таксономического разнообразия микрофлоры почвы довольно интенсивно проводится с начала XX столетия. Значительные успехи были достигнуты после появления твердых питательных сред, предложенных Р. Кохом (Robert Koch), и особенно после введения в практику исследований агар-агара (21). Из почвы было выделено огромное количество бактерий, актиномицетов, мицелиальных грибов, дрожжей, микроскопических водорослей, протистов, которые составляют основной фонд микроорганизмов, представленных в коллекциях различных научных центров мира. Неоценимую роль в исследованиях почвенных микроорганизмов сыграли селективные питательные среды и накопительные культуры, принципы применения которых были предложены соответственно С.Н. Виноградским (1) и М. Бейеринком (M. Beijerinck) (21). В последние два десятилетия наблюдается бурный рост исследований с использованием молекулярно-генетических методов. В результате число видов микроорганизмов, обнаруживаемых в почве, возросло более чем на порядок. Их значительная часть относится к так называемым некультивируемым формам (22).

Применение селективных сред позволило выделить различные физиологические группы микроорганизмов, принимающих участие в малом биологическом круговороте веществ, который отражает общие закономерности этих процессов в почве. Физиологическими группами называют совокупность микроорганизмов, выполняющих одну и ту же функцию в цепи превращения веществ в почве (23). Вместе с тем хорошо известно, что микроорганизмы — это полифункциональные системы. Поэтому при изменении условий существования они могут перестраиваться, выполнять иную (порой противоположную) функцию и быть отнесены к другой физиологической группе. Например, так называемые денитрифицирующие бактерии при дефиците минеральных соединений азота способны фиксировать молекулярный азот (24), а при наличии белка и аминокислот в среде выполняют функции аммонификаторов (25).

Отсюда понятно, что таксономический состав микроорганизмов, представляющих ту или иную физиологическую группу, непостоянен и изменяется в зависимости от конкретных условий, складывающихся в почве. Поэтому физиологические группы, выявляемые на определенных селективных средах, совсем необязательно осуществляют те же процессы в почве.

По мнению Д.Г. Звягинцева (9), устойчивость тех или иных физиолого-биохимических функций ассоциации микроорганизмов при изменении физико-химических параметров почвы обусловлена наличием нескольких дублирующих друг друга видов микроорганизмов, с одной стороны, и их адаптацией к новым условиям — с другой.

С точки зрения почвоведения и практического земледелия представляли интерес физиологические группы микроорганизмов, которые способны служить своего рода функциональными индикаторами биохими-

ческих процессов в почве, важных для ее плодородия и, соответственно, продуктивности сельскохозяйственных растений. Наиболее популярные из них и широко используемые в качестве объектов исследования в почвенной микробиологии представлены в таблице.

**Основные физиологические группы почвенных микроорганизмов и их роль в биохимических процессах в почве**

Физиологическая группа	Биохимический процесс
Аммонификаторы	Разложение органических азотсодержащих веществ до аммиака
Нитрификаторы	Окисление аммонийного азота до нитритов и нитратов
Денитрификаторы	Восстановление нитратов и нитритов до двуокиси азота и молекулярного азота
Азотфиксаторы	Фиксация молекулярного азота атмосферы
Целлюлозоразлагающие микроорганизмы	Разложение целлюлозы и гемицеллюлоз
Пектинообразующие микроорганизмы	Разложение пектина
Амилотические микроорганизмы	Гидролиз крахмала
Микроорганизмы, разлагающие гумус	Деполимеризация и минерализация гумусовых кислот
Серобактерии	Окисление восстановленных соединений серы до серной кислоты
Сульфатредуцирующие бактерии	Восстановление сульфатов до серы и сероводорода
Железобактерии	Окисление закиси железа и марганца
Фосфатрастворяющие микроорганизмы	Солубилизация труднорастворимых фосфатов кальция, железа и алюминия
Микроорганизмы, разлагающие фосфорорганические соединения	Минерализация фосфорсодержащих органических соединений

К таким часто используемым в микробиологических исследованиях физиологическим группам относятся микроорганизмы, участвующие в процессах круговорота азота: аммонификаторы, нитрификаторы, денитрификаторы, азотфиксаторы. В круговороте углерода ключевую роль играет физиологическая группа целлюлозоразлагающих микроорганизмов, поскольку до 70 % углерода, попадающего в почву с растительными остатками, составляет целлюлоза и гемицеллюлозы.

Для учета численности и выделения соответствующей физиологической группы микроорганизмов используются специальные селективные питательные среды, которые описаны в соответствующих руководствах, практикумах и оригинальных статьях (26-28).

Основные результаты почти столетних исследований физиологических групп микроорганизмов позволили вывить значительную часть органотрофных и хемоавтотрофных прокариот, участвующих в круговороте углерода, азота, фосфора, серы, железа, марганца и т.д. (4, 23). Было показано, что различные почвы имеют свой профиль в отношении численности и состава физиологических групп микроорганизмов, границы которых, однако, достаточно размыты и не могут использоваться для классификации типа почвы. Установлено, что качественный состав и численность физиологических групп микроорганизмов одной и той же почвы зависит от времени года, растительного покрова и метеоусловий, изменяется по профилю почвы. Влияние агротехнических мероприятий на численность различных физиологических групп микроорганизмов зависит от типа почвы, состава агрохимикатов, технологии обработки почвы и интенсивности применяемых агротехнологий (29-32).

Ранее с некоторыми оговорками предполагалось, что наличие в почве той или иной физиологической группы микроорганизмов и их численность отражают интенсивность соответствующих процессов превращения веществ и почвенное плодородие (33). Действительно, в целом подобная закономерность просматривается. Однако в многочисленных опытах показана высокая вариабельность результатов таких наблюдений. Данные анализов допускают разное толкование. Отсутствуют четкие критерии оценки качества почвы на основании анализа физиологических групп микроорганизмов. Все это ставит под вопрос надежность использования результатов

такого анализа в качестве показателей почвенного плодородия и эффективности агротехнических мероприятий. Поэтому в производственной системе эти показатели практически не нашли применения (21, 33).

Основной недостаток метода заключается в том, что жизнедеятельность микроорганизмов, высеянных на искусственные питательные среды, не соответствует их поведению в сложной физико-химической среде почвы в условиях их взаимодействия с другими микроорганизмами (9). Иными словами, учитывая численность той или иной физиологической группы микроорганизмов, в лучшем случае мы можем судить о некоторых потенциальных возможностях микрофлоры, которые не обязательно проявляются в почве на момент отбора почвенных образцов.

Опасность заключается в том, что дальнейшие исследования такого рода при наших ограниченных знаниях о физиологии микробной ассоциации в конкретных почвенных условиях (в отличие от физиологии отдельных видов и штаммов микроорганизмов, культивируемых на питательных средах) ведут к накоплению противоречивых и плохо (либо даже ложно) интерпретируемых данных. Выход из тупика — следовать принципу, предложенному С.Н. Виноградским, а именно изучать микрофлору и процессы, осуществляемые микроорганизмами, в естественной среде, то есть в почве. Как писал С.Н. Виноградский, «чистые культуры познакомили исследователей с общей физиологией микробов, но такое их изучение может привести только к аналогиям, к гипотезам, которые необходимо проверять прямыми опытами в условиях, по мере возможности приближающихся к естественным» (1). Вместе с тем элективные питательные среды и выделение физиологических групп микроорганизмов остаются важным инструментом выявления микроорганизмов со специфическими физиологическими свойствами для применения в биотехнологии.

Спектр потребления углеродсодержащих субстратов микроорганизмами. В 1991 году для оценки функционального разнообразия J.L. Garland и A.L. Mills (34) предложили использовать систему BIOLOG, которая широко применяется в медицинской и общей микробиологии для идентификации бактерий, и разработали основные подходы к интерпретации полученных спектров потребления углеродсодержащих субстратов (СПС) методами многомерной статистики (35).

Суть метода заключается в том, что для определения СПС используют стандартные планшеты с 96 ячейками. В каждую ячейку добавляют низкомолекулярный углеродсодержащий субстрат и соли тетразолия в качестве индикатора потребления субстрата. При росте микроорганизмов в ячейках, заполненных питательным раствором, происходит восстановление бесцветных солей тетразолия до формазана, дающего бордовое окрашивание. С помощью оптического считывающего устройства по интенсивности окрашивания среды в ячейках судят об интенсивности потребления субстрата. С использованием системы BIOLOG получен значительный объем данных, из которых 80 % касаются анализа СПС в почвенных образцах (36). Отмечено влияние механической обработки и растительных остатков (37), а также тяжелых металлов на СПС почвы (38). Показана эффективность применения этого метода для характеристики потенциала потребления различных источников углеродного питания микробными сообществами в компостах (39), сточных водах промышленных предприятий (40) и других природных средах, а также в ризосфере растений (37, 41-43).

Предложены модификации метода, в которых более рационально подобраны источники углеродного питания, потенциально соответствующие таковым для микроорганизмов из различных природных сред. В ана-



литическом обзоре J. Preston-Mafham с соавт. (36) отметили ряд таких модификаций, которые различаются главным образом по набору тестируемых субстратов. Н. Insam (44) для изучения физиологического разнообразия ассоциации микроорганизмов (СПС) в почве и ризосфере растений предложил использовать планшеты, включающие 31 субстрат. На основании этого фирма «BIOLOG, Inc.» (США) запустила в производство планшеты EcoPlates™ (45) со стандартным набором углеводов, амидов, аминокислот, карбоновых кислот, нуклеозидов и некоторых полимеров.

В системе мультисубстратного тестирования ЭКОЛОГ, разработанной на кафедре биологии почвы Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (46), использовано 47 субстратов. Нам представляется, что в системе ЭКОЛОГ их состав с экологической точки зрения более обоснован и приемлем для неформализованной интерпретации результатов. В нем отсутствуют экзотические химические соединения. В том и другом случае допускаются модификации набора субстратов для изучения физиологического разнообразия различных природных сред. При этом следует отметить, что система ЭКОЛОГ позволяет определить не только спектр используемых микроорганизмом углеродсодержащих субстратов, но и дать количественную оценку потребления каждого из них. Этим она выгодно отличается от других модификаций BIOLOG. Для обработки и интерпретации значительного объема информации, получаемой в ходе анализа почвенных образцов, предлагается аппарат многомерной математической статистики, нейросетевые алгоритмы, а также использование экологического индекса разнообразия Шеннона и рангового распределения (46). Метод мультисубстратного тестирования (МСТ), или тестирования спектра потребления субстратов (СПС), оказался хорошим инструментом для сравнительного описания физиологического разнообразия микробных сообществ почвы и ризосферы растений, а также оценки влияния природных и антропогенных факторов на ассоциацию почвенных микроорганизмов (46-50).

Вместе с тем нельзя не отметить определенные недостатки, которые, по мнению ряда авторов (36, 46, 51), ограничивают область применения методов, основанных на анализе СПС и, по-видимому, требуют доработки. Так, условия в ячейках на искусственной питательной среде в жидкой культуре не соответствуют условиям роста и физиолого-биохимическим функциям микроорганизмов *in situ* (36, 51), поэтому вклад отдельных физиологических групп в СПС не обязательно отражает их относительную долю в общем спектре потребления субстратов, которая приходится на популяцию непосредственно в почве (52).

Использование низкомолекулярных субстратов и кратковременная (2-5 сут) инкубация планшетов, инокулированных суспензией почвы, отражает рост микроорганизмов R-стратегов в индивидуальной ячейке при заданных экспериментом условиях, и совсем не факт, что эти же микроорганизмы аналогичным образом ведут себя в почве при других физико-химических параметрах среды и в ассоциации с другими микроорганизмами. Кроме того, необходимо учитывать, что в ячейки с питательным раствором может попадать не один, а несколько видов микроорганизмов, в результате чего возможно проявление синергизма или антагонизма между ними, что, несомненно, будет оказывать влияние на интенсивность трансформации солей тетразолия в формазан. При этом необходимо иметь в виду, что не все микроорганизмы способны восстанавливать соли тетразолия (36). В то же время из поля зрения совсем выпадают K-стратеги, обеспечивающие трансформацию биополимеров (целлюлоза, гемицеллюлозы, пектин, лигнин, гумусовые комплексы). Име-

ются вопросы технического характера по протоколу подготовки и анализа проб (время и способы отбора почвенных образцов, методы подготовки почвенного образца к анализу, состав питательной среды, рН буферного раствора, температура и время инкубации планшетов с ячейками, инокулированными почвенной суспензией либо супернатантом, спектр субстратов, используемых в опыте, и т.д.), который в случае мониторинговых исследований должен быть унифицирован.

Подводя итог, отметим, что изучение таксономического и функционального разнообразия почвенных микробных ассоциации имеет исключительно большое теоретическое значение для понимания структуры микробного сообщества почвы, характера взаимодействия входящих в него видов микроорганизмов, их участия в почвообразовании, формировании почвенного плодородия и круговороте веществ. Этим обусловлена роль подобного подхода в экологических исследованиях и практике земледелия, прежде всего при разработке эффективных приемов поддержания и повышения почвенного плодородия в процессе сельскохозяйственного производства.

Анализ данных о разнообразии физиологических групп микроорганизмов в почве, полученных микробиологами на протяжении почти сотни лет, показал, что методы предельных разведений и селективных питательных сред, используемые для выявления и определения численности бактерий разных физиологических групп, малоинформативны для характеристики их физиологического разнообразия в почве. В опубликованных работах учитывалось не более 5-6 физиологических групп микроорганизмов в соответствии с задачами исследования (30). Наиболее часто объектами наблюдения были микроорганизмы азотного цикла (аммонификаторы, нитрификаторы, денитрификаторы, азотфиксаторы), а также целлюлозо-разлагающие бактерии, которые рассматривались как индикаторы соответствующих процессов в почве. Полученную таким образом информацию используют для анализа плодородия и эффективности агротехнических мероприятий. Однако эти методы не получили должной оценки в практике земледелия (21). Тем не менее, с определенными оговорками можно принять, что высокими титрами нитрифицирующих и целлюлозо-разлагающих бактерий характеризуются активно протекающие процессы минерализации органического вещества почвы и, соответственно, благоприятный режим минерального питания растений. По-видимому, для комплексной экологической оценки биоразнообразия микробной ассоциации почвы методы анализа физиологических групп микроорганизмов на селективных питательных средах исчерпали себя, оставаясь, тем не менее, хорошим инструментом изучения роли микроорганизмов в процессах почвообразования и питания растений, а также выявления новых физиологических групп микроорганизмов.

Прорыв в исследованиях физиологического разнообразия ассоциации почвенных микроорганизмов связывают с методами, основанными на оценке спектра потребления углеродсодержащих субстратов микроорганизмами (СПС), с использованием различных модификаций системы BIOLOG (36, 44, 45) и системы мультисубстратного тестирования ЭКОЛОГ (46) с соответствующим программным обеспечением. Рассмотренные выше преимущества и недостатки этих систем подробно и критично описаны J. Preston-Mafham с соавт. (36). В настоящее время опубликовано более 1500 работ, в которых показаны возможности системы BIOLOG для анализа физиологического разнообразия почвы, ризосферы растений и других природных субстратов (46).

Экологический смысл этих данных понятен: любое (таксономиче-

ское или функциональное) разнообразие дает сравнительную характеристику исследуемых экосистем, поэтому показатели СПС могут быть использованы как индикаторы соответствующих изменений в них. Однако биологический смысл пока далек от понимания, прежде всего потому, что условия роста и метаболизма микроорганизмов *in vitro* не соответствуют таковым *in situ* (в ризосфере растений или почве). В результате мы имеем оценку некоего физиологического потенциала присутствующих почвенных микроорганизмов, но не его реализации в естественных условиях. Поэтому в существующем виде методы, основанные на характеристике СПС, по-видимому, удобны и достаточно информативны как индикаторы антропогенного воздействия на микрофлору, а также физиологического разнообразия микрофлоры в ризосфере растений. Однако, по мнению J. Preston-Mafham с соавт. (36), они непригодны для экологического мониторинга, что обусловлено использованием нескольких модификаций, существенно различающихся по набору субстратов, и отсутствием унифицированного протокола анализа и оценки результатов, что делает их практически несопоставимыми. В частности, для анализа отбирают свежие (53), высушенные (46), замороженные (54) образцы почвы; по одним протоколам почвенную суспензию получают при механическом встряхивании (53), по другим — ее предварительно обрабатывают ультразвуком, центрифугируют и для посева используют супернатант (46). При этом в жидкой фракции, как отмечают некоторые авторы, выявляется гораздо меньше видов, чем в осадке или почвенной суспензии (36). В замороженной почве существенно снижается численность бактерий, грибов и актиномицетов и изменяется их соотношение (55).

Итак, традиционные методы исследования функционального состояния микрофлоры почвы позволили выявить формы, участвующие в ключевых процессах круговорота углерода, азота, фосфора и других элементов. Некоторые физиологические группы все еще используются в качестве индикаторов эффективности агротехнических мероприятий и почвенного плодородия, однако это направление последние 20 лет практически не развивается. Изучение спектров потребления углеродсодержащих субстратов (СПС) (модификации системы BIOLOG, EcoPlates, ЭКОЛОГ) в настоящее время применяется в отношении более или менее ограниченного набора низкомолекулярных органических соединений и позволяет выявить физиологические группы микроорганизмов, способные участвовать в их катаболизме. Иными словами, СПС в той или иной степени отражает потенциал физиологического разнообразия органогетеротрофной аэробной и факультативно аэробной почвенной микрофлоры, использующей простые углеродсодержащие химические соединения. Наиболее эффективно СПС применяются для изучения влияния природных и антропогенных факторов на микрофлору почвы. Нам представляется, что мультисубстратное тестирование имеет хорошие перспективы для исследования ризосферы, особенно в сочетании с анализом корневых выделений, что имеет ключевое значение для понимания механизма формирования ассоциации ризосферных микроорганизмов и ее взаимодействия с растением.

*ФГБНУ Всероссийский НИИ  
сельскохозяйственной микробиологии,  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: yuvkruglov@yandex.ru*

*Поступила в редакцию  
6 августа 2015 года*

# PATTERNS AND ASSESSMENT

(review)

*Yu. V. Kruglov*

*All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology*, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail yuvkruglov@yandex.ru

Acknowledgements:

Supported by Russian Science Foundation (grant № 14-26-00094)

Received August 6, 2015

doi: 10.15389/agrobiol.2016.1.46eng

## Abstract

Study of the taxonomic and functional diversity of soil microorganisms association is of great theoretical significance for understanding the structure of the soil microbial community, the nature of the interaction of individual species of microorganisms belonging to this community, as well as their participation in the processes of soil formation and circulation of substances. This article summarises a brief history of ideas about the functioning of soil microbial complex, providing transformation and mineralization of organic matter in soil formation processes. Soil as habitat for microorganisms is heterogeneous that defines microzonal character of the distribution and activity of microorganisms that live in it. The structure of the association of microorganisms and its physiological profiles vary in time and space (D.G. Zvyagintsev, 1987). This defines methodological difficulties and the significant variability of the results of the evaluation of soil microflora by various authors. This review discusses the methodological approaches in determining the physiological diversity of soil microorganisms association. Traditional methods of elective culture media in over a century allowed to reveal numerous physiological groups of microorganisms and developed an idea about their role in the cycle of matter, processes of soil formation and plant nutrition. However, such work is almost not given anything new in principle, both in environmental studies, as well as in agronomy over the past 20 years. At the end of the 1990s a method of analysis of the carbon source utilization profiles (SUP) of natural microorganisms association by BIOLOG system used previously only in medical and general microbiology was proposed to study the physiological diversity for the test strain (J.L. Garland, A.L. Mills, 1991). This approach was further developed by H. Insam (1997), M.V. Gorlenko and P.A. Kozhevnikov (2005) and others. A number of modifications of this method (Eso-Plates, ECOLOGY and others) characterized by a set of organic substrates, which, as the authors suggest, is most likely present in natural environments were worked out. Instrumentation of ECOLOG (M.V. Gorlenko, P.A. Kozhevnikov, 2005) allows to determine not only the range of organic substrates used by microorganisms, but also to quantify the consumption of each substrate. For the processing and interpretation of a significant amount of information obtained in the course of the analysis of soil samples there are an apparatus of multidimensional mathematical statistics, cluster analysis, rank distribution, and ecological indexes of Shannon and Pielou. SUP method (multisubstrate test) possesses a high performance, good resolution ( $10^4$ ), a satisfactory reproducibility and is a high-tech and effective tool to assess the physiological diversity. The article deals with the positive and negative aspects of the method. SUP reflects to some extent the potential of aerobic soil microorganisms using low molecular weight organic compounds in the catabolism. However, because of availability of several modifications, as well as some technical problem it is difficult to compare the results obtained by different authors, there is no unified SUP analysis protocol that is required for the comparative environmental studies and the establishment of relevant national and international databases. Thus, analysis of the carbon source utilization profiles (SUP) in BIOLOG system now is under development and testing, and with the accumulation of experimental data and critical analysis, it has good prospects in soil ecology, in research of the relationship between microorganisms and plants, and in assessment of the impact of anthropogenic factors.

Keywords: association, physiological groups, physiological diversity of bacteria, range of consumed substrates, multisubstrate test, system BIOLOG, ECOLOG, EcoPlates.

## REFERENCES

1. Vinogradskii S.N. *Mikrobiologiya pochvy. Problemy i metody* [Soil microbiology. Problems and methods]. Moscow, 1952.
2. Lazarev N.M. V sbornike: *Trudy VNIISKHM za 1941-1945 gg* [In: Transactions of VNIISKHM of 1941-1945]. Moscow, 1949: 5-22.
3. Mishustin E.N. *Assotsiatsii pochvennykh mikroorganizmov* [Associations of soil microorganisms]. Moscow, 1975.
4. Aristovskaya T.V. *Mikrobiologiya protsessov pochvoobrazovaniya* [Microbiological aspects of soil formation]. Leningrad, 1980.
5. Zavarzin G.A. *Izvestiya AN SSSR, seriya biologicheskaya*, 1976, 1: 121-134.
6. Guzev V.S., Ivanov P.I. V sbornike: *Biotehnologiya mikroorganizmov v sel'skom khozy-*

- aistve /Pod redaktsiei A.I. Puponina [In: Biotechnology of microorganisms in agriculture. A.I. Puponin (ed.)]. Moscow, 1988: 78-88.
7. Voronin A.D. *Osnovy fiziki pochv* [Fundamentals of soil physics]. Moscow, 1986.
  8. Zvyagintsev D.G. *Vzaimodeistvie mikroorganizmov s tverdyimi poverkhnostyami* [The interaction of microorganisms with solid surfaces]. Moscow, 1973.
  9. Zvyagintsev D.G. *Pochva i mikroorganizmy* [Soil and microorganisms]. Moscow, 1987.
  10. *The spatial distribution of microbes in the environment*. R.B. Franklin, A.L. Mills (eds.). Dordrecht, Netherland, 2007: 179-202.
  11. Franklin R.B., Garland J.L., Bolster C.H., Mills A.L. Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 702-712 (doi: 10.1128/AEM.67.2.702-712.2001).
  12. Grundmann G.L., Gourbiere F. A micro-sampling approach to improve the inventory of bacterial diversity in soil. *Appl. Soil Ecol.*, 1999, 13: 123-126 (doi: 10.1016/S0929-1393(99)00027-X).
  13. Nunan N., Wu K.J., Young I.M., Crawford J.W., Ritz K. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2003, 44: 203-215 (doi: 10.1016/S0168-6496(03)00027-8).
  14. Chenu C., Hassink J., Bloem J. Short-term changes in the spatial distribution of microorganisms in soil aggregates as affected by glucose addition. *Biol. Fertil. Soils*, 2001, 34: 349-356 (doi: 10.1007/s003740100419).
  15. Foster R.C. Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils*, 1988, 6: 189-203 (doi: 10.1007/BF00260816).
  16. Hattori T. Soil aggregates as habitats of microorganisms. *The reports of Institute for agricultural research, Tohoku University*, 1988, 37: 23-36.
  17. Shenu S., Stotzky G. Interactions between microorganisms and soil particles: an overview. In: *Interaction between soil particles and microorganisms: impact on the terrestrial ecosystem*. P.V. Yuan, J.N. Bala, N. Sensei (eds.). Chester, England, 2002: 4-29.
  18. Sessitsch A., Weilharter A., Gerzabek M., Kirchmann H., Kandeler E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(9): 4215-4224 (doi: 10.1128/AEM.67.9.4215-4224.2001).
  19. Zavarzin G.A. S.N. *Mikrobiologiya*, 2006, 75(5): 582-592.
  20. Kozhevnikov P.A. V knige: *Ekologiya mikroorganizmov* /Pod redaktsiei A.I. Netrusova [In: Ecology of microorganisms. A.I. Netrusov (ed.)]. Moscow, 2004.
  21. Waksman S.A. *Soil microbiology*. NY—London, 1961.
  22. Wintzingerode F., Gobel U.B., Stackebrandt E. Determination of microbial diversity environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, 21(3): 213-229 (doi: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x).
  23. Bab'eva I.P., Zenova G.M. *Biologiya pochv* [Soil biology]. Moscow, 1989.
  24. Umarov M.M. *Assotsiativnaya azotfiksatsiya* [Associative nitrogen fixation]. Moscow, 1986.
  25. Kruglov Yu.V. *Trudy VNI sel'skokhozyaistvennoi mikrobiologii (Leningrad)*, 1958, 15: 121-127.
  26. *Metody pochvennoi mikrobiologii i biokhimmii* /Pod redaktsiei D.G. Zvyagintseva [Methods in soil microbiology and biochemistry. D.G. Zvyagintsev (ed.)]. Moscow, 1991.
  27. Allen J.N. *Experiments in soil bacteriology*. Minneapolis, USA, 1959.
  28. Segi I. *Metody pochvennoi mikrobiologii* /Pod red. G.S. Muromtseva [Methods of soil microbiology. G.S. Muromtsev (ed.)]. Moscow, 1963.
  29. Emtsev V.T., Mishustin E.N. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Moscow 2005.
  30. *Izuchenie vliyaniya obrabotki pochvy na mikrobiologicheskie protsessy. Trudy Instituta mikrobiologii* /Pod red. E.N. Mishustina [The study of microbiological processes as influenced by tillage: transactions of the Institute of Microbiology. E.N. Mishustin (ed.)]. Moscow, 1960.
  31. Kruglov Yu.V. *Mikroflora pochvy i pestitsidy* [Soil microflora and pesticides]. Moscow, 1991.
  32. Mishustin E.N. *Mikroorganizmy i plodorodie pochvy* [Microorganism and soil fertility]. Moscow, 1956.
  33. Poshon Zh., de Barzhak G. *Pochvennaya mikrobiologiya* [Soil microbiology]. Moscow, 1960.
  34. Garland J.L., Mills A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57: 2351-2359.
  35. Garland J.L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1997, 24: 289-300 (doi: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00446.x).
  36. Preston-Mafham J., Boddy L., Randerson P.F. Analysis of microbial functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles — a critique. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2002, 42: 1-14 (doi: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00990.x).
  37. Yang Q., Wang X., Shen Y. Comparison of soil microbial community catabolic diversity between rhizosphere and bulk soil induced by tillage or residue retention. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 2013, 13(1): 187-199 (doi: 10.4067/S0718-95162013005000017).
  38. Ellis R.J., Best J.G., Fry J.C., Morgan P., Neish B., Trett M.W., Weight-

- man A.J. Similarity of microbial and meiofaunal community analyses for mapping ecological effects of heavy-metal contamination in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 40: 113-122 (doi: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00943.x).
39. Mondini C., Insam H. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach. *European Journal of Soil Biology*, 2003, 39: 141-148 (doi: 10.1016/S1164-5563(03)00029-3).
  40. Gryta A., Frąc M., Oszust K. The application of the Biolog EcoPlate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, 174(4): 1434-1443 (doi: 10.1007/s12010-014-1131-8).
  41. Siciliano S.D., Thereot C.M., de Freitas J.R., Hucl P.J., Germida J.J. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Canadian J. Microbiology*, 1998, 44: 844-851 (doi: 10.1139/w98-075).
  42. Grayston S.J., Wang S.Q., Campbell C.D., Edwards A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30: 369-378 (doi: 10.1016/S0038-0717(97)00124-7).
  43. Campbell C.D., Grayston S.J., Hirst D.J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *J. Microbiol. Methods*, 1997, 30(1): 33-41 (doi: 10.1016/S0167-7012(97)00041-9).
  44. Insam H. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: *Microbial communities. Functional versus structural approaches*. H. Insam, A. Ranggner (eds.). Berlin, 1997: 259-260.
  45. *Microbial Community Analysis with EcoPlates™* ([http://www.biolog.com/products-static/microbial\\_community\\_overview.php](http://www.biolog.com/products-static/microbial_community_overview.php)), accessed Feb 1, 2016.
  46. Gorlenko M.V., Kozhevin P.A. *Mul'tisubstratnoe testirovanie prirodnykh mikrobynykh soobshchestv* [Multisubstrate testing natural microbial communities]. Moscow, 2005.
  47. Gorlenko M.V., Terekhov A.S., Marchenko S.A., Marchenko A.I., Vorob'ev A.V., Kozhevin P.A. *Vestnik Moskovskogo universiteta, seriya 17. Pochvovedenie*, 2003, 1: 46-49.
  48. Semenova I.N., Il'bulova G.R., Suyundukov Ya.T. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal*, 2012, 3: 311-318.
  49. Yakushev A.V., Byzov B.A. *Pochvovedenie*, 2008, 11: 1381-1387.
  50. Gorlenko M.V., Yakimenko O.S., Golichenkov M.V., Kostina N.V. *Vestnik Moskovskogo universiteta, seriya 17. Pochvovedenie*, 2012, 2: 20-27.
  51. Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biol. Biochem.*, 2013, 67: 192-211 (doi: 10.1016/j.soilbio.2013.08.024).
  52. Smolla K., Wachtendorf U., Heuer H., Li W.T., Forney L. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 1220-1225.
  53. Vinogradova Yu.A., Lapteva E.M., Perminova E.M., Anisimov S.S., Novakovskii A.B. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*, 2014, 16(5): 74-80.
  54. Chaudhry V., Rehman A., Mishra A., Chauhan P.S., Nautiyal Ch.Sh. Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microbial Ecology*, 2012, 64: 450-460 (doi: 10.1007/s00248-012-0025-y).
  55. Shishido M., Chanway C.P. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficiency. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30: 939-947.