СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2017, том 52, № 3, с. 464-470

УДК 631.95:631.4:57.042 doi: 10.15389/agrobiology.2017.3.464rus

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И ЭМИССИЯ ЗАКИСИ АЗОТА ИЗ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ СУПЕСЧАНОЙ ПОЧВЫ С БИОУГЛЕМ

Е.Я. РИЖИЯ[1], И.М. МУХИНА[1], В.Е. ВЕРТЕБНЫЙ[1], Я. ХОРАК[2], П.Ю. КОНОНЧУК[1], Ю.В. ХОМЯКОВ[1]

В сельскохозяйственных исследованиях, связанных с применением биоугля, раскрытию механизмов его взаимодействия с почвой уделяется значительное внимание. Один из информативных подходов — анализ ферментативной активности почвы как наиболее чувствительного индикатора ее состояния. Для оценки влияния древесного биоугля на ферментативную активность дерново-подзолистой супесчаной почвы и кумулятивную эмиссию закиси азота (N_2O) мы провели 90-суточный лабораторный эксперимент, сравнив в 9-кратной повторности показатели в контроле (почва, К), в почве с биоуглем (Б), с минеральным удобрением (нитроаммофоска $N_{16}P_{16}K_{16}$, N_{90}) и при сочетании минерального удобрения с биоуглем (N_{90} + Б). Исследовали катализирующей эффект уреазы (карбамид-амидогидролаза, КФ 3.5.1.5), каталазы (H_2O_2:H_2O_2-оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6), пероксидазы (1,2,3-пирогаллол:H_2O_2-оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.7) и полифенолоксидазы (О-дифенол:кислород-оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.1). Выбор этих ферментов обусловлен их высокой чувствительностью к различным воздействиям и значимой ролью в трансформации органического вещества, от которой зависит цикл азота. Результаты исследований показали, что внесение биоугля в дозе 10 т/га достоверно ($p < 0,05$) снижало кумулятивную эмиссию N_2O из почвы в 1,4 раза по сравнению как с контролем, так и с вариантом N_{90}. Наличие биоугля в почве не оказывало существенного влияния на уреазную активность. В то же время активность изучаемых оксидоредуктаз в почве с биоуглем достоверно ($p < 0,05$) возрастала в среднем в 1,2 раза, что связано с изменением физических свойств почвы при внесении биоугля, и в первую очередь с аэрацией. Между эмиссией N_2O и каталазной активностью были установлены высокие корреляционные связи ($r = 0,85$ и $r = 0,87$ соответственно для Б и N_{90} + Б). Расчет соотношения активности полифенолоксидазы и пероксидазы свидетельствовал об усилении (на 10-13 %) процессов минерализации гумусовых веществ в присутствии биоугля по сравнению с показателями в вариантах без биоугля. Таким образом, биоуголь достоверно обусловил смену окислительно-восстановительных условий в почве, что нашло отражение в изменении активности оксидоредуктаз, усилении минерализации гумусовых веществ, уменьшении эмиссии N_2O. Изученные ферменты и эмиссия N_2O оказались чувствительными биоиндикаторами состояния почвы с биоуглем и могут быть использованы для экологической оценки эмиссии парниковых газов в системах землепользования.

Ключевые слова: дерново-подзолистая супесчаная почва, биоуголь, нитроаммофоска, ферментативная активность, уреаза (КФ 3.5.1.5), каталаза (КФ 1.11.1.6), пероксидаза (КФ 1.11.1.7), полифенолоксидаза (КФ 1.10.3.1), эмиссия закиси азота.

Воздействие различных агроприемов на почвенный покров (обработки, внесения удобрений, мелиорантов) и собственно сельскохозяйственных культур вызывает изменение микробиологической и, соответственно, ферментативной активности (1). От интенсивности и направленности этих биологических процессов, а также от комплексного эффекта почвенных и климатических факторов зависит эмиссия закиси азота (N_2O), которая существенно модифицирует климат (2).

Установлено, что внесение биоугля в почву изменяет физические и химические условия, которые влияют на деятельность микроорганизмов, контролирующих потоки C и N в биосфере (3-8). Полученные достоверные данные об эффективности снижения эмиссии N_2O из дерново-подзолистой супесчаной почвы с помощью биоугля указывают на возможность его применения на легких по гранулометрическому составу почвах, но для обоснования этого приема необходимо четко представлять механизмы происходящих процессов, в частности свойства естественного ферментативного комплекса. Особое внимание, по нашему мнению, следует уделить катализирующему эффекту гидролаз и оксидоредуктаз (9, 10). Среди названных классов ферментов выделяются уреазы (КФ 3.5.1.5), каталазы

(КФ 1.11.1.6), пероксидазы (КФ 1.11.1.7) и полифенолоксидазы (КФ 1.10.3.1). Перечисленные ферменты обладают высокой чувствительностью к различным воздействиям и выполняют важные функции в трансформации органического вещества, от которой зависит цикл N (11-13). С уреазной активностью связана аммонификация мочевины и переход азота в доступную для растений форму. Каталаза относится к окислительно-восстановительным ферментам. Полифенолоксидаза и пероксидаза участвуют в многоступенчатых процессах разложения и синтеза органических соединений ароматического ряда, влияя на образование гумуса (14). Биологическая диагностика почв по ферментативной активности позволит определить характер и степень антропогенного воздействия на почвенный покров и раскрыть механизмы взаимодействия внесенного продукта с почвой.

Нами впервые проведен сопряженный анализ влияния биоугля на процессы формирования N_2O в почве и активность ферментов, принимающих участие в трансформации углерод- и азотсодержащих веществ, и показана существенная роль окислительно-восстановительных ферментов в выявлении механизмов воздействия биоугля на почву.

Цель выполненных модельных опытов заключалась в оценке влияния биоугля на эмиссию N_2O и ферментативную активность дерново-подзолистой супесчаной почвы.

Методика. Образцы дерново-подзолистой супесчаной почвы отбирали из пахотного горизонта (0-28 см) до начала полевого сезона 2016 года (биополигон Меньковского филиала АФИ, Гатчинский р-н, Ленинградская обл.), высушивали при 22 °С и просеивали через сито (ячейка 2 мм). Биоуголь был получен быстрым бескислородным пиролизом древесины мягких лиственных пород деревьев (ольха, береза, осина) при температуре 550 °С. В почву вносили фракцию биоугля с диаметром частиц < 1 см.

По 300 г просеянной почвы, увлажненной до 23 % от наименьшей влагоемкости (НВ), помещали в вегетационные сосуды объемом 500 мл с герметичными крышками, в центре которых были установлены резиновые пробки для отбора проб воздуха при помощи шприца. В течение первых 7 сут проводили предварительную инкубацию для достижения равновесного состояния микробного сообщества и увлажненности. Затем в почву внесли биоуголь (вариант Б) в дозе 0,42 г/сосуд, что соответствовало 10 т биоугля на 1 га, нитроаммофоску $N_{16}P_{16}K_{16}$ (вариант N_{90}) в дозе 0,23 г/сосуд (90 кг N/га) или смесь биоугля и нитроаммофоски (вариант N_{90} + Б). Полученные субстраты равномерно перемешали. Контролем (К) служила почва без биоугля и удобрения, которую также предварительно инкубировали, затем перемешали. Образцы уплотняли до значения 1,2 г/см^3, что соответствовало равновесной плотности сложения изучаемой почвы в полевых условиях. Повторность опыта 9-кратная, распределение образцов рендомизированное. Сосуды помещали в биологический шкаф на инкубацию при постоянной температуре воздуха 28 °С. На протяжении всего эксперимента сосуды с почвой оставляли открытыми, закрывая только на время отбора воздуха для анализа на N_2O (на 30 мин). Влажность почвы поддерживали, ориентируясь на массу сосудов при изначально заданной влажности, почву увлажняли после отбора воздуха.

Отбор проб воздуха проводили через день на протяжении первых 2 нед после внесения биоугля и минерального удобрения, далее 2-3 раза в неделю, после 60-х сут — один раз в неделю. Общая продолжительность эксперимента — 90 сут.

Концентрацию N_2O в образцах воздуха измеряли на газовом хроматографе Fractovap 4130 («Carlo Erba Strumentazione SpA», Италия), осна-

щенном детектором электронного захвата.

Динамику ферментативной активности (отбор проб через каждые 10 сут) изучали с использованием стандартных методик (13, 14): активность каталазы определяли перманганатометрией по Джонсону и Темпле, уреазы — фотоколориметрически с реактивом Несслера по количеству окрашенных комплексов аммиака, образующегося при гидролизе мочевины; пероксидазы и полифенолоксидазы — фотоколориметрически по Галстяну (1968).

Для обработки данных использовали пакеты программ Microsoft Excel и Statistics 8.0 («StatSoft Inc.», США). Статистический анализ включал вычисления значений средних (*M*), стандартных отклонений (±SD) и коэффициентов линейной корреляции (*r*) при $p \leq 0{,}05$. Достоверность различий средних оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и метода апостериорного анализа по критерию достоверно значимой разности Тьюки (Tukey's honestly significant difference test) при $p \leq 0{,}05$ (15).

Результаты. Основные агрохимические характеристики почвы при отборе: $C_{орг.}$ — 2,4 %; $N_{общ.}$ — 0,17 %; $N\text{-}NO_3$ — 11,2 мг/кг; $N\text{-}NH_4$ — 4,5 мг/кг; подвижный P_2O_5 — 299 мг/кг; подвижный K_2O — 97 мг/кг; pH_{KCl} 5,3; характеристика биоугля: $C_{общ.}$ — 87,4 %; $N_{общ.}$ — 0,038 %, Н — 28 мг/г, pH 7,6.

Расчет кумулятивных потоков N_2O за 80 сут показал достоверные ($p < 0{,}05$) различия между всеми вариантами опыта (рис. 1). Внесение в исследуемую почву $N_{16}P_{16}K_{16}$ (N_{90}) увеличило кумулятивный поток N_2O в 2 раза по сравнению с контролем, биоугля — снизило кумулятивную эмиссию в 1,4 раза как по сравнению с контролем, так и относительно показателя для почвы с минеральным удобрением.

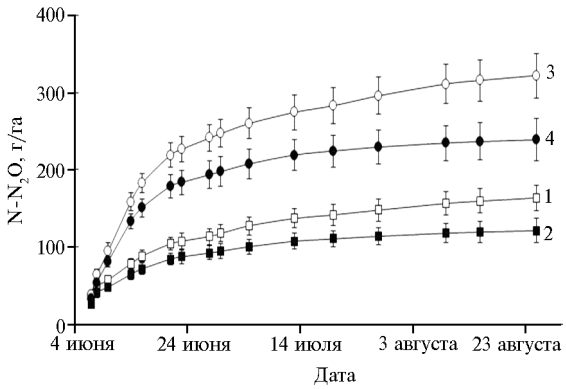

Рис. 1. Кумулятивная эмиссия закиси азота в образцах дерново-подзолистой почвы в контроле (1)**, при внесении биоуголя** (2)**, удобрения (нитроаммофоска)** (3) **и биоугля в сочетании с удобрением** (4). Приведены средние (*M*) и стандартные отклонения (±SD) (лабораторный опыт).

Полученные данные о способности биоугля снижать эмиссию N_2O согласуются с результатами других ученых, показавших, что с переводом углеродных пулов биомассы при пиролизе в ароматическую форму, труднодоступную для почвенных микроорганизмов, существенно снижается скорость образования N_2O. Это связано с изменением физических и химических условий жизнедеятельности почвенных микроорганизмов, отвечающих за образование парниковых газов. В некоторых работах показано (4-7), что эмиссия N_2O существенно снижалась после внесения биоугля в почву даже при доле водонасыщенных пор 78 %, то есть в анаэробных условиях. Улучшение водно-воздушного режима почвы и ослабление процесса денитрификации приводило к уменьшению кумулятивной эмиссии N_2O из почв.

Ранее также установлено, что биоуголь способствовал повышению активности, группового и функционального разнообразия в почвенном микробном сообществе (8, 16), стимулировал развитие почвенных плесневых грибов и аэробных целлюлозоразлагающих бактерий, активно потреб-

ляющих азот и подавляющих рост азотобактера (17, 18).

При внесении в почву органических, минеральных удобрений и мелиорантов возможно изменение активности уреазы, определяющей важные этапы превращения азотсодержащих веществ в почве. Результаты эксперимента показали, что по оценке степени обогащенности почв ферментами (19) исследуемые варианты почвы в эксперименте характеризовались как бедные по уреазной активности (от 3 до 10 мг $N\text{-}NH_4$/10 г почвы за 1 сут). Изучение динамики накопления этого фермента показало усиление активности в течение 30 сут инкубации с дальнейшим снижением к концу эксперимента. Внесение нитроаммофоски достоверно ($p < 0,05$) увеличило уреазную активность (в среднем в 1,6 раза) по сравнению с контролем, тогда как внесение биоугля не существенно снижало уреазную активность по сравнению как с контролем, так и с показателем в варианте N_{90} (рис. 2). Коэффициенты корреляции (*r*) между эмиссией N_2O и уреазной активностью были невысокими и составили (при $p < 0,05$) 0,51 (К), 0,38 (Б), 0,62 (N_{90}) и 0,67 (N_{90} + Б). В исследованиях H. Jin (20) установлено, что при внесении в почву биоугля может наблюдаться снижение уреазной активности, которое связано с изменением pH среды (в своем большинстве различные виды биоугля имеют нейтральный pH) и высокой адсорбционной способностью биоугля.

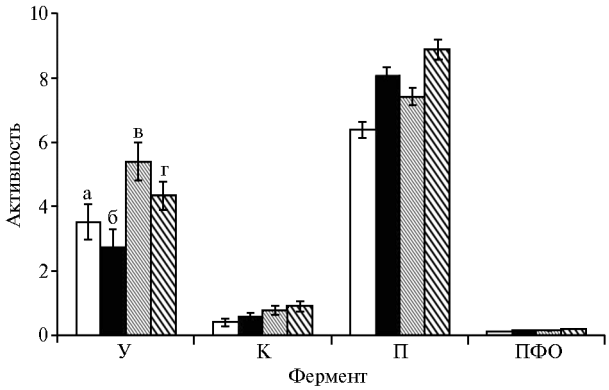

Рис. 2. Ферментативная активность дерново-подзолистой почвы в контроле (а)**, при внесении биоугля** (б)**, удобрения (нитроаммофоска)** (в) **и биоугля в сочетании с удобрением** (г): У — уреаза, мг $N\text{-}NH_4$/10 г почвы за 1 сут; К — каталаза, мг $KMnO_4$/г почвы за 20 мин; П — перокидаза, мг пурпурогаллина в 100 г почвы: ПФО — полифенолоксидаза, мг пурпурогаллина в 100 г почвы. Приведены средние (*M*) и стандартные отклонения (±SD) (лабораторный опыт).

В нашем опыте каталазная активность снижалась от начала до окончания наблюдения во всех исследованных вариантах. Подобную тенденцию отмечали и в других работах, например М.А. Размахина (21) и Е.В. Даденко (22) сообщали, что в лабораторных условиях каталазная активность имела общую тенденцию уменьшения к концу эксперимента и зависела от воздушного режима, влажности почв и плотности сложения.

По обогащенности ферментами (19) почвы в вариантах эксперимента характеризовались как очень бедные по каталазной активности (< 1 мг $KMnO_4$/1 г за 20 мин). В контроле содержание этого фермента было минимальным и варьировало от 0,89 до 0,23 мг $KMnO_4$/г за 20 мин. Внесение N_{90} достоверно ($p < 0,001$) усилило каталазную активность в среднем в 1,4 раза, так же как внесение биоугля ($p < 0,05$) увеличило активность фермента соответственно в 1,3 и 1,2 раза по сравнению с контролем и показателем в почве с нитроаммофоской (см. рис. 2). Коэффициенты корреляции между эмиссией N_2O и каталазной активностью были высокими ($p < 0,05$) и составили 0,89 (К), 0,85 (Б), 0,84 (N_{90}) и 0,87 (N_{90} + Б).

Результаты исследований показали, что активность пероксидазы была в среднем в 50 раз выше, чем активность полифенолоксидазы, а внесение биоугля существенно ($p < 0,05$) увеличило активность этих ферментов, по сравнению с таковой в вариантах без биоугля. Скорее всего, это

связано с особыми условиями аэрации, которые обеспечивались благодаря пористой структуре биоугля (в отличие от образцов, где он отсутствовал) (22-24). Однако коэффициенты корреляции между эмиссией N_2O и пероксидазной активностью, а также полифенолоксидазной активностью были низкими и составили (при $p < 0,05$) соответственно –0,42 и 0,45 (К), –0,47 и 0,59 (Б), –0,39 и 0,46 (N_{90}), –0,47 и 0,41 (N_{90} + Б).

Соотношение полифенолоксидазной к пероксидазной активности принято считать условным коэффициентом гумификации ($K_{гум.}$) органического вещества, который в определенной мере может характеризовать направленность (минерализация или иммобилизация) образования специфического гумусового вещества в почве (22, 25). Величина $K_{гум.}$, рассчитанная по соотношению активности этих ферментов, оказалась < 1 во всех вариантах опыта, что свидетельствовало о преобладании процессов минерализации гумусовых веществ над их синтезом. Внесение биоугля способствовало несущественному усилению минерализации — в среднем в 1,1 раза по сравнению с контролем и почвой с минеральными удобрениями.

Таким образом, при внесении биоугля (10 т/га) в дерново-подзолистую супесчаную почву эмиссия N_2O была достоверно ($p < 0,05$) ниже (в среднем в 1,4 раза), чем в контроле и в почве с минеральным удобрением. При этом уреазная активность снижалась в среднем в 1,2 раза (без существенных различий с вариантами без биоугля). Активность изучаемых оксидоредуктаз достоверно ($p < 0,05$) возрастала: каталазы — в 1,3 раза, пероксидазы и полифенолоксидазы — в 1,2 раза, что связано с изменением физических свойств почвы при внесении биоугля (в первую очередь аэрации) и отражает изменения окислительно-восстановительных условий. Между эмиссией N_2O и каталазной активностью установлена высокая положительная корреляция ($r = 0,85$ и $r = 0,87$ соответственно для биоугля и сочетания биоугля с нитроаммофоской). Соотношение активности полифенолоксидазы к пероксидазе свидетельствовало об усилении минерализации гумусовых веществ в присутствии биоугля. Все изученные ферменты, кроме уреазы, оказались чувствительными биоиндикаторами состояния почвы и могут использоваться для экологической оценки систем землепользования.

[1]*ФГБНУ Агрофизический научно-исследовательский институт*, 195220 Россия, г. Санкт-Петербург, Гражданский просп., 14, e-mail: alenarizh@yahoo.com, muhinairina1989@gmail.com, verteb22@mail.ru, 7911717774@yandex.ru, himlabafi@yandex.ru;
[2]*Slovak University of Agriculture, Faculty of Horticulture and Landscape Engineering, Department of Biometeorology and Hydrology,* 949 76 Slovakia, Nitra, Hospodárska, 7, e-mail: jan.horak@uniag.sk

Поступила в редакцию 28 марта 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2017, V. 52, № 3, pp. 464-470

SOIL ENZYMATIC ACTIVITY AND NITROUS OXIDE EMISSION FROM LIGHT-TEXTURED SPODOSOL AMENDED WITH BIOCHAR

E.Ya. Rizhiya[1], I.M. Mukhina[1], V.E. Vertebniy[1], J. Horak[2], P.Yu. Kononchuk[1], Yu.V. Khomyakov[1]

[1]*Agrophysical Research Institute*, Federal Agency of Scientific Organizations, 14, Grazhdanskii prosp., St. Petersburg, 195220 Russia, e-mail alenarizh@yahoo.com (corresponding author), muhinairina1989@gmail.com, verteb22@mail.ru, 7911717774@yandex.ru, himlabafi@yandex.ru;
[2]*Slovak University of Agriculture, Faculty of Horticulture and Landscape Engineering, Department of Biometeorology and Hydrology,* 949 76 Slovakia, Nitra, Hospodárska, 7, e-mail jan.horak@uniag.sk
ORCID:
Rizhiya E.Ya. orcid.org/0000-0001-7920-867X
Mukhina I.M. orcid.org/0000-0002-6506-9813
Horak J. orcid.org/0000-0003-0078-9083
Kononchuk P.Yu. orcid.org/0000-0003-0449-5189

Vertebniy V.E. orcid.org/0000-0002-2936-5949 Khomyakov Yu.V. orcid.org/0000-0002-9149-3247
The authors declare no conflict of interests
Received March 28, 2017 doi: 10.15389/agrobiology.2017.3.464eng

Abstract

Soil amendment with biochar has been proposed as a tool to mitigate soil N_2O emissions by altering soil physical, chemical and biological properties. Little work has been focused on the effect of biochar on the soil enzymatic activity as the most sensitive indicator to diagnose the changes in soil quality. The 90-day laboratory experiment to study the effect of biochar on the dynamics of some soil enzymes and cumulative N_2O emissions from the loamy sand Spodosol was conducted with the aim to justify the sensitiveness of the enzymes to soil amendments with biochar. The experimental setup was a randomized block design with 9 replicates and included the soil control (K), the soil with biochar (BC), the soil with mineral fertilizer ($N_{16}P_{16}K_{16}$, N_{90}) and the soil with fertilizer and biochar mixture (N_{90} + BC). The hydrolases (urease) and oxidoreductases (catalase, peroxidase and polyphenol oxidase) were selected due to their high sensitivity to the changes in the soil quality and the significance in the nitrogen cycle. The results of the experiment have shown that the soil amendment with 10 t/ha of biochar significantly ($p < 0.05$) reduced (1.4-fold) cumulative N_2O emissions from the soil compared to the K and N_{90} treatments. The presence of biochar in the soil had no significant effect on the urease activity, while activity of the catalase, peroxidase and polyphenol oxidase was significantly ($p < 0.05$) higher (1.2 times in average) due to the changes in the physical properties of the soil (aeration in particular). There was high positive correlation between N_2O flux and catalase activity ($r = 0.85$ and 0.87 for BC and N_{90} + BC, respectively). Based on the calculation of the humification coefficient (polyphenol oxidase activity to peroxidase activity) revealed that soil mineralization increased by 10-13 % after soil amendment with BC, compared to the treatments without BC. The soil amendment with biochar significantly changed the red-ox soil conditions. That was reflected in the changes of enzymatic activity, N_2O emission and mineralization of humic substances. All the studied enzymes, except urease, were sensitive bio-indicators of soil conditions and could be used in the environment assessment methodology for land-use systems with biochar amendments.

Keywords: loamy sand Spodosol, biochar, mineral N-fertilizer, enzymatic activity, urease, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, nitrous oxide emission.

REFERENCES

1. Mishustin E.N. *Mikroorganizmy i produktivnost' zemledeliya* [Microorganisms and productivity of arable farming]. Moscow, 1972 (in Russ.).
2. Kudeyarov V.N. Nitrogen cycle and nitrous oxide production. *Eurasian Soil Science*, 1999, 32(8): 892-901. Available https://elibrary.ru/item.asp?id=13312593. No date.
3. Verheijen F., Jeffery S., Bastos A.C., van der Velde M., Diafas I. *Biochar application to soils. A critical scientific review of effects on soil properties, processes and functions.* European Commission, Joint Research Centre, 2010 (doi: 10.2788/472).
4. Van Zwieten L., Kimber S., Morris S., Downie A., Berger E., Rust J., Scheer C. Influence of biochars on flux of N_2O and CO_2 from Ferrosol. *Austr. J. Soil. Res.*, 2010, 48: 555-568 (doi: 10.1071/SR10004).
5. Lehmann J., Rillig M.C., Thies J., Masiello C.A., Hockaday W.C., Crowley D. Biochar effects on soil biota — a review. *Soil Biol. Biochem.*, 2011, 43: 1812-1836 (doi: 10.1016/j.soilbio.2011.04.022).
6. Zheng H., Wang Z., Deng X., Herbert S., Xing B. Impacts of adding biochar on nitrogen retention and bioavailability in agricultural soil. *Geoderma*, 2013, 206: 32-39 (doi: 10.1016/j.geoderma.2013.04.018).
7. Gomez J.D., Denef K., Stewart C.E., Zheng J., Cotrufo M.F. Biochar addition rate influences soil microbial abundance and activity in temperate soils. *Eur. J. Soil Sci.*, 2014, 65: 28-39 (doi: 10.1111/ejss.12097).
8. Rizhiya E.Ya., Buchkina N.P., Mukhina I.M., Belinets A.S., Balashov E.V. *Pochvovedenie*, 2015, 2: 211-220. Available https://elibrary.ru/item.asp?id=22840918. No date (in Russ.).
9. Hochstein L.I., Tomlinson G.A. The enzymes associated with denitrification. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1988, 42: 231-261 (doi: 10.1146/annurev.mi.42.100188.001311).
10. McCarty G.W. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils*, 1999, 29: 1-9 (doi: 10.1007/s003740050518).
11. Jin K., Sleutel S., Buchan D., De Neve S., Cai D., Gabriels D., Jin J.Y. Changes of soil enzyme activities under different tillage practices in the Chinese Loess Plateau. *Soil and Tillage Research*, 2009, 104(1): 115-120 (doi: 10.1016/j.still.2009.02.004).
12. Rajapaksha A.U., Vithanage M., Zhang M., Ahmad M., Mohan D., Chang S.X., Ok Y.S. Pyrolysis condition affected sulfamethazine sorption by tea waste biochars. *Bioresource Technology*, 2014, 166: 303-309 (doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.100).

13. Khaziev F.Kh. *Sistemno-ekologicheskii analiz fermentativnoi aktivnosti pochv* [Ecological assay of soil enzymatic activity]. Moscow, 1982 (in Russ.).
14. Khaziev F.Kh. *Metody pochvennoi enzimologii* [Methods of soil enzymology]. Moscow, 2005 (in Russ.).
15. *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computin, Vienna, 2014.* Available https://www.r-project.org/. No date.
16. Signor D., Cerri C.E.P., Conant, R. N_2O emissions due to nitrogen fertilizer applications in two regions of sugarcane cultivation in Brazil. *Environ. Res. Lett.*, 2013, 8(1): 015013 (doi: 10.1088/1748-9326/8/1/015013).
17. Wang C., Lu H., Dong D., Deng H., Strong P.J., Wang H., Wu W. Insight into the effects of biochar on manure composting: evidence supporting the relationship between N_2O emissions and denitrifying community. *Environ. Sci. Technol.*, 2013, 47(13): 7341-7349 (doi: 10.1021/es305293h).
18. Bailey V.L., Fansler S.J., Smith J.L., Bolton H., Jr. Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. *Soil Biol. Biochem.*, 2010, 43(2): 296-301 (doi: 10.1016/j.soilbio.2010.10.014).
19. Zvyagintsev D.G. *Pochva i mikroorganizmy* [Soil and microorganisms]. Moscow, 1987 (in Russ.).
20. Jin H. *Characterization of microbial life colonizing biochar and biochar-amended soils. PhD diss.* Cornell University, Ithaca, 2010. Available https://ecommons.cornell.edu/han-dle/1813/17077. No date.
21. Razmakhina M.A. *Materialy VII Mezhdunarodnoi studencheskoi elektronnoi nauchnoi konferentsii «Studencheskii nauchnyi forum-2015»* [Proc. VII Int. eConf. «Student Science Forum-2015]. Available http:// www.scienceforum.ru/2015/826/8691. No date (in Russ.).
22. Dadenko E.V., Denisova T.V., Kazeev K.Sh., Kolesnikov S.I. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal*, 2013, 4: 385-393. Available http://www.sevin.ru/volecomag/issues/2013_4.html#a5. No date (in Russ.).
23. Bach C.E., Warnock D.D., Van Horn D.J., Weintraub M.N., Sinsabaugh R.L., Allison S.D., German D.P. Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, L-DOPA, and ABTS: Effect of assay conditions and soil type. *Soil Biol. Biochem.*, 2013, 67: 183-191 (doi: 10.1016/j.soilbio.2013.08.022).
24. Kolb S.E., Fermanich K.J., Dornbush M.E. Effect of charcoal quantity on microbial biomass and activity in temperate soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 2009, 73: 1173-1181 (doi: 10.2136/sssaj2008.0232).
25. Gul'ko A.E., Khaziev F.Kh. *Pochvovedenie*, 1992, 11: 55-68 (in Russ.).