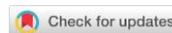


УДК 631.4

DOI: 10.19047/0136-1694-2022-112-48-72



Ссылки для цитирования:

Пилецкая О.А., Ячная Д.А. Влияние сроков и способов хранения на изменение активности ферментов черноземовидной почвы Зейско-Буреинской равнины // Бюллетень Почвенного института имени В.В. Докучаева. 2022. Вып. 112. С. 48-72. DOI: 10.19047/0136-1694-2022-112-48-72

Cite this article as:

Piletskaya O.A., Yachnaya D.A. Influence of terms and methods of storage on changes in enzyme activity of meadow chernozem-like soil on Zeya-Bureya plain // Dokuchaev Soil Bulletin, 2022, V. 112, pp. 48-72, DOI: 10.19047/0136-1694-2022-112-48-72

Влияние сроков и способов хранения на изменение активности ферментов черноземовидной почвы Зейско-Буреинской равнины

© 2022 г. О. А. Пилецкая¹, Д. А. Ячная²

¹*Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения Российской академии наук, Россия, 675000, Благовещенск, пер. Релочный, 1, <https://orcid.org/0000-0001-5126-4055>, e-mail: olgapiletskaya1988@gmail.com.*

²*ФГБОУ ВО Дальневосточный государственный аграрный университет, Россия, 675000, Благовещенск, Политехническая ул., 86, <https://orcid.org/0000-0001-5060-5452>, e-mail: darya_gusevskaya@mail.ru.*

Поступила в редакцию 21.06.2022, после доработки 19.10.2022, принята к публикации 08.11.2022

Резюме: Анализ биологических и энзиматических свойств почв является важным аспектом экологии почв, однако на результаты исследований могут сильно влиять условия хранения образцов. Разнообразие в методах и продолжительности хранения в различных исследованиях снижают способность точно интерпретировать данные и сравнивать результаты между собой. В данной работе представлено исследование влияния различных условий и времени хранения на результаты активности ферментов класса гидролаз (уреазы, фосфатазы) и класса оксидоредуктаз

(каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы) черноземовидной почвы Зейско-Буреинской равнины. Для исследований был заложен лабораторный опыт, в котором использовались естественно-влажные и воздушно-сухие образцы, хранимые в различных условиях: комнатная температура (+23 – +25 °С), низкая положительная температура (холодильник, +10 °С), отрицательная температура (морозильная камера, –10 °С) в течение 7, 28, 90 и 365 дней. В результате установлено, что высушивание почвенных образцов сразу после отбора ведет к увеличению активности уреазы, фосфатазы, пероксидазы и полифенолоксидазы. Состояние почвенных образцов (влажность) оказывает большее влияние на изменение активности ферментов, чем условия (температура) хранения. При выборе срока хранения необходимо руководствоваться целью исследований. Для оценки актуальной ферментативной активности рекомендуется использовать естественно-влажные почвенные образцы сразу после отбора; для оценки потенциальной ферментативной активности рекомендуется высушивать почву и хранить не более 7 дней. Результаты данного исследования предоставляют полезную информацию о влиянии условий хранения образцов для исследователей активности ферментов в сходных климатических условиях и способствуют дальнейшему рассмотрению и обсуждению последствий хранения образцов.

Ключевые слова: ферментативная активность почв, каталаза, нейтральная фосфатаза, уреазы, пероксидаза, полифенолоксидаза.

Influence of terms and methods of storage on changes in enzyme activity of meadow chernozem-like soil on Zeya-Bureya plain

© 2022 г. **O. A. Piletskaya¹, D. A. Yachnaya²**

*¹Institute of Geology and Nature Management,
Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
1 Relochniy lane, Blagoveshchensk 675000, Russian Federation,
<https://orcid.org/0000-0001-5126-4055>,
e-mail: olgapiletskaya1988@gmail.com.*

*²FSBEI of Higher Education Far Eastern State Agrarian University,
86 Polytechnic Str., Blagoveshchensk 675000, Russian Federation,
<https://orcid.org/0000-0001-5060-5452>, e-mail: darya_gusevskaya@mail.ru.*

Received 21.06.2022, Revised 19.10.2022, Accepted 08.11.2022

Abstract: The analysis of the biological and enzymatic properties of soils is an important aspect of soil ecology, but the results of studies can be strongly influenced by the storage conditions of the samples. Variation in storage methods and duration studies reduces the ability to accurately interpret data and compare results. This work presents a study of the influence of various storage conditions and time on the results of the activity of enzymes of hydrolase class (urease, phosphatase), and oxidoreductases class (catalase, peroxidase and polyphenoloxidase) of meadow chernozem-like soil of the Zeya-Bureya plain. For the research, a laboratory experiment was performed, in which naturally moist and air-dry samples were taken and stored under various conditions: room temperature (+23 – +25 °C), low positive temperature (refrigerator, +10 °C), negative temperature (freezer, –10 °C) within 7, 28, 90 and 365 days. As a result, we found that drying soil samples immediately after sampling increases the activity of urease, phosphatase, peroxidase and polyphenoloxidase. Storage conditions do not significantly affect the activity of enzymes. To assess the actual enzymatic activity, we recommend using naturally moist soil samples immediately after sampling; to assess potential enzymatic activity, drying the soil and storing it for no more than 7 days are recommended. The results of this study provide useful information on the impact of sample storage conditions for researchers of enzyme activity in similar climates and contribute to further consideration and discussion of the implications of sample storage.

Keywords: soil enzymatic activity, catalase, neutral phosphatase, urease, peroxidase, polyphenoloxidase.

ВВЕДЕНИЕ

Все биохимические процессы в почве, которые связаны с превращением веществ и энергии, осуществляются с помощью биокатализаторов – ферментов, которые ускоряют данные реакции в живых организмах ([Лабутова, 2013](#)). Вопрос стабильности почвенных ферментов является одним из наиболее значимых в почвенной энзимологии, так как уровень их иммобилизации зависит от химического состава, физических и физико-химических свойств, условий почвообразования и т. д.

Выявлено, что для каждого типа почв существует определенный предел фиксации ферментов, поэтому их уровень в естественных условиях остается практически постоянным ([Галстян, 1982](#)). Относительно стабильный уровень ферментативной актив-

ности различных типов почв позволяет использовать его в качестве диагностического показателя, с помощью которого можно установить характер и степень изменения активности ферментов при антропогенном воздействии на почвенный покров. Это дает возможность избежать вероятных негативных процессов при нерациональном сельскохозяйственном использовании почв, а также снижения их плодородия ([Абрамян, 1992](#); [Личко, 1998](#); [Якушев и др., 2014](#); [Verchot, 1999](#)).

При мониторинге микробной биомассы и активности ферментов решающее значение для результатов могут иметь условия хранения образцов почвы перед анализом ([Stenberg et al., 1998](#)). При проведении исследований необходимо рационально планировать сроки и способы отбора проб почв с учетом пространственного варьирования и временной динамики показателей энзиматической активности и соблюдать условия подготовки и выполнения анализов ([Даденко, 2004](#)).

Обычно предпочтительны исследования, проводимые на свежесобранной почве, но они не всегда возможны по практическим причинам ([Stenberg et al., 1998](#)). Когда немедленный анализ образцов почвы невозможен, рекомендации по хранению почвы часто включают охлаждение или замораживание полевой влажной почвы в промежутке между сбором и анализом ([Verchot, 1999](#)). Различные результаты можно ожидать в зависимости от того, хранятся ли образцы почвы при температуре на несколько градусов выше нуля или заморожены. В охлажденной почве можно ожидать медленного истощения легкодоступного субстрата из-за продолжающейся микробной активности ([MacLeod, 1976](#)).

Однако есть исследования, в которых не рекомендуется любой вид хранения и, наоборот, исследования, не указывающие на какие-либо недостатки. Согласно стандарту [ISO 10381-6:2009](#), не рекомендуется использовать замораживание как метод хранения почвы для лабораторной оценки аэробных микробных процессов. Согласно руководству OECD ([1995](#)), напротив, почвы могут храниться в замороженном виде (минус 20 ± 2 °C) в течение 1 года.

В настоящее время часто проводят оценку микробной биомассы почвы из-за важности почвенных организмов в круговороте питательных веществ и их роли в качестве источника и поглотите-

ля питательных веществ для растений ([Jenkinson, 1976](#)). Обычно микробную биомассу измеряют как можно скорее после отбора проб почвы либо в “свежих” образцах, либо в тех, которые были “предварительно инкубированы” в течение нескольких дней ([Jenkinson, 1988](#)). Однако при использовании этих методов хранения разными авторами наблюдались изменения биомассы.

Например, Ross et al. ([1980](#)) при изучении влияния хранения в течение 28 и 56 дней при +25 °С, +4 °С и –20 °С на содержание микробной биомассы в луговых почвах пришел к выводу, что ни одна температура хранения не была удовлетворительной для всех показателей микробной биомассы. Lee et al. ([2007](#)) в своих исследованиях также сделал выводы, что необходимо избегать хранения образцов на протяжении длительного времени, потому что это может привести к снижению микробной биомассы.

Различные исследования были сосредоточены на влиянии, которое оказывают различные методы хранения почвы на активность почвенных ферментов, доказывая, что системы хранения зависят от тестируемого фермента, характеристик почвы и даже от типа и количества растительных остатков, присутствующих в почве ([Brohon, 1999](#); [Pancholy, 1972](#); [Speir, 1975](#); [Zantua, 1975](#)). В исследованиях Даденко ([2009](#)) и O.O. da Silva Aragão et al. ([2020](#)) было установлено, что время хранения образцов почвы существенно влияет на генерируемые данные и может изменить способ интерпретации этих данных, что приводит к ошибочным выводам.

Таким образом, информация о влиянии срока и способа хранения образцов на микробиологические показатели качества почвы недостаточна и часто противоречива. Время и условия хранения определяются целью и экспериментальной установкой исследования. Различные исследования показали, что неподходящие условия хранения образцов почвы могут отрицательно повлиять на микробные сообщества, уменьшая их размер и активность.

Цель исследования – изучить изменение ферментативной активности черноземовидной почвы при разных условиях и способах хранения почвенных образцов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Исследуемым объектом является черноземовидная почва – Stagnic Phaeozems (WRB, 2014), которая распространена в основном в пределах Зейско-Буреинской равнины и составляет основу пахотного фонда Амурской области – 40%. Данные почвы формируются на плоских водораздельных поверхностях, на низких выложенных длинных склонах, обладают достаточно высоким потенциальным плодородием и интенсивно насыщены микроорганизмами (Голов, 1982; Ивлев и др., 2001; Пилецкая, 2015; Хазиев, 2005).

Отбор почвенных образцов был произведен 22 сентября 2020 г. в Благовещенском районе в селе Грибское. Географические координаты: N 50°11'21.38", E 127°46'19.39". Образцы отобраны площадным методом, по ГОСТ 17.4.3.01-2017 и ГОСТ 17.4.4.02-2017. На площадке 5×5 м отобрано 5 точечных образцов, из которых методом конверта составлена объединенная проба, массой 1 кг; глубина отбора – 0–20 см. После отбора часть почвы в естественно-влажном состоянии была измельчена и просеяна через сито с диаметром отверстий 3 мм. Другая часть высушена до воздушно-сухого состояния, измельчена и просеяна через сито с диаметром отверстий 2 мм.

Энзиматическая активность почв определялась в 3-кратной повторности. Образцы весом 100 г хранили в темном месте в стеклянных бюксах с притертой крышкой для сохранения постоянной влажности. Эксперимент имел 6 вариантов по три повторности:

1. Естественно-влажные образцы, хранимые при комнатной температуре (+23 – –25 °С).

2. Естественно-влажные образцы, хранимые при низкой положительной температуре (холодильник; +10 °С).

3. Естественно-влажные образцы, хранимые при отрицательной температуре (морозильная камера; –10 °С).

4. Воздушно-сухие образцы, хранимые при комнатной температуре (+23 – –25 °С).

5. Воздушно-сухие образцы, хранимые при низкой положительной температуре (холодильник; +10 °С).

6. Воздушно-сухие образцы, хранимые при отрицательной температуре (морозильная камера; –10 °С).

Контролем служили свежееотобранные образцы для анализа естественно-влажной почвы и образцы, высушенные до воздушно-сухого состояния – для анализа воздушно-сухой почвы.

При этом, согласно исследованиям (Галстян, 1974, 1978, 1982; Звягинцев, 1976; Dick, 1996; Stenberg et al., 1998; Trabue et al., 2006), проводимым в разных почвенно-климатических зонах, выбраны допустимые сроки хранения: 7, 28, 90 и 365 дней.

Энзиматическая активность черноземовидной почвы определена по активности ферментов класса оксидоредуктаз (каталаза, пероксидаза и полифенолоксидаза) и класса гидролаз (фосфатаза, уреазы). Активность каталазы определена перманганатометрическим методом по Джонсону и Темпле (Муртазина, 2006); активность нейтральной фосфатазы – по методу С.Г. Малахова (гидролиз фенолфталеин фосфата натрия) (Временные..., 1984); активность уреазы – методом АШ. Галстяна (Муртазина, 2006); активность ферментов пероксидазы и полифенолоксидазы – методом А.Ш. Галстяна (Хазиев, 2005).

Результаты лабораторных анализов обработаны методами математической статистики в программе R Studio, версия 4.0.3. Зависимость ферментативной активности от высушивания в день отбора и ее изменение в зависимости от срока и способа хранения были оценены с помощью тестов для несвязанных выборок и аналогов попарного сравнения – t-test Стьюдента и wilcox.test.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных вариантах высушивание почвенных образцов привело к увеличению активности уреазы практически в 6 раз (до 0.375 мг) (p -value<0.0003), фосфатазы в 2 раза (p -value<0.007), пероксидазы в 6 раз (p -value<0.002) и полифенолоксидазы в 2 раза (p -value<0.008). При изучении активности каталазы установлено, что высушивание почвенных образцов приводит к уменьшению активности фермента в 1.5 раза (p -value<0.04) (рис. 1).

Повышение активности ферментов после высушивания может быть связано с активацией определенных функциональных групп их белковой молекулы под воздействием кислорода воздуха. Снижение активности может быть обусловлено изменением структуры белковой молекулы фермента, что приводит к частич-

ной инактивации (Галстян, 1974). Также следует учесть тот факт, что ферменты проявляют устойчивость к неблагоприятным условиям, в том числе и к изменению влажности. И в случае, когда окружающие условия изменяются и становятся неблагоприятными для жизнедеятельности микроорганизмов, метаболизм почвы может остаться относительно постоянным благодаря активации внеклеточной ферментативной активности.

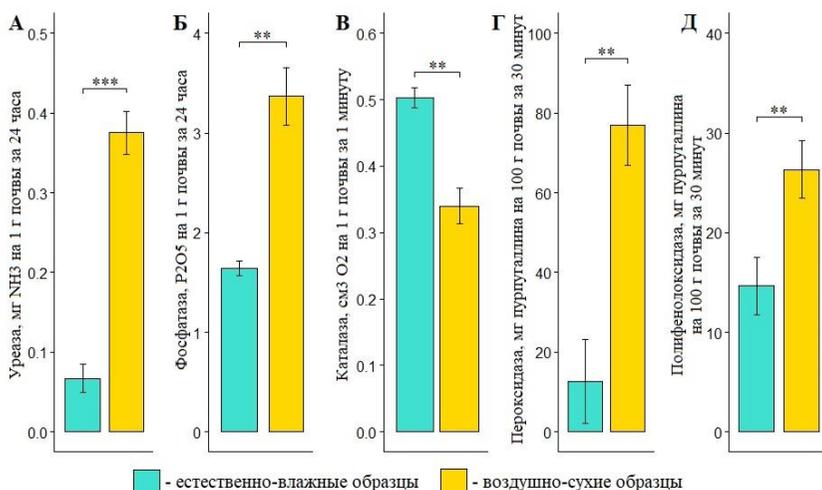


Рис. 1. Влияние высушивания на активность ферментов класса гидролаз и оксидоредуктаз в образцах черноземовидной почвы: **А** – уреаза, **Б** – фосфатаза, **В** – каталаза, **Г** – пероксидаза, **Д** – полифенолоксидаза. **Примечание.** Уровень значимости: ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

Fig. 1. The effect of drying on the activity of enzymes of the class of hydrolases and oxidoreductases in samples of meadow chernozem-like soil: **A** – urease, **B** – phosphatase, **B** – catalase, **Г** – peroxidase, **Д** – polyphenol oxidase. **Note.** Significance level: ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

Активность уреазы в естественно-влажном состоянии во все сроки хранения была выше контроля в 4–9 раз соответственно (p -value < 0.005). Данная активность может быть связана с гидролизом мочевины в почве в процессе аммонификации, под действием микроорганизмов, обладающих ферментом уреазой. При достаточном количестве влаги и кислорода в почве мочевина интенсифи-

но разлагается, активируется биологическая деятельность, и как следствие, – активность уреазы.

В воздушно-сухом состоянии активность фермента значительно увеличилась – в 1.5 раза в условиях 23–25 °С через 7 дней (p -value<0.04); через 28 и 90 дней – снизилась в 1.5 раза (p -value<0.02). При хранении в условиях 10 °С статистически-значимые изменения были зафиксированы через 7 дней, где активность уреазы была ниже контроля в 4 раза (p -value<0.05). При хранении в условиях –10 °С произошло снижение активности фермента в 8 раз через 7 дней (p -value<0.003), в 1.5 раза – через 28 и 90 дней (p -value<0.04) (рис. 2).

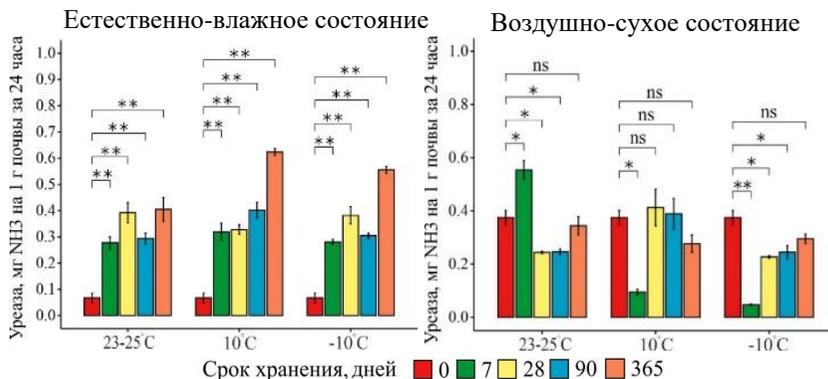


Рис. 2. Активность уреазы при разных сроках и способах хранения в образцах черноземовидной почвы. **Примечание.** ns – $p > 0.05$; уровень значимости: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

Fig. 2. The activity of urease at different periods and methods of storage in samples of meadow chernozem-like soil. **Note.** ns – $p > 0.05$; significance level: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

Уреаза может терять активность с течением времени, поскольку каталитические центры становятся менее доступными из-за диффузии мочевины в почве. Дополнительным объяснением может служить уменьшение микроорганизмов ризосферы, благодаря которым продуцируется уреаза, вследствие чего происходит снижение уровня и активности этого фермента (Чевурдин, 2015).

Активность фосфатазы в естественно-влажном состоянии была значительно выше контроля через 7 и 365 дней и ниже – через 28 и 90 в 1.5–2 раза соответственно (p -value<0.01). В воздушно-сухом состоянии через 7 дней статистически значимые изменения произошли в условиях 23–25 °С, где активность была выше контроля в 1.6 раз (p -value<0.008). Значительное увеличение фосфатазной активности может быть связано с тем, что почвенное микробное сообщество испытывало недостаток фосфора в семидневный период, так как известно, что одним из факторов, непосредственно влияющих на фосфатазную активность, является обеспеченность почвы подвижными фосфатами, доступными для микроорганизмов. Почвенная микрофлора при недостатке доступного фосфора способна активизировать синтез фосфатаз для превращения труднодоступных органических форм фосфора в легкодоступные минеральные формы, что, в свою очередь, зависит и от гидротермических условий.

При хранении почвенных образцов в течение 28 и 90 дней во всех условиях активность фермента была ниже контроля в 2 и 3 раза соответственно (p -value<0.02) (ри. 3).

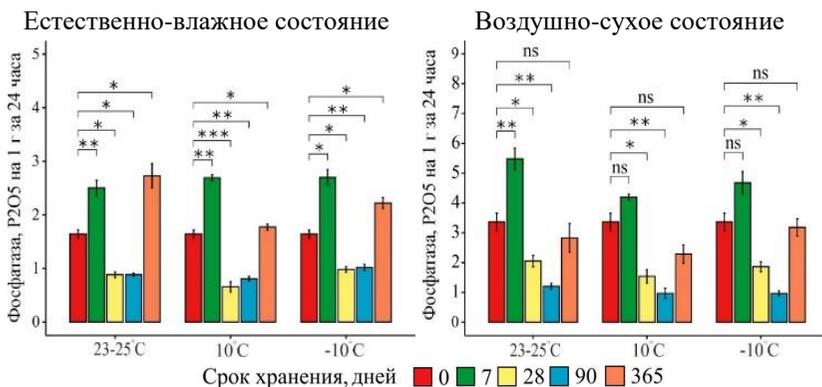


Рис. 3. Активность фосфатазы при разных сроках и способах хранения в образцах черноземовидной почвы. **Примечание.** ns – $p > 0.05$; уровень значимости: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

Fig. 3. The activity of phosphatase at different periods and methods of storage in samples of meadow chernozem-like soil. **Note.** ns – $p > 0.05$; significance level: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

Полученные нами результаты по фосфатазе противоречат исследованиям других авторов. Например, Lee et al. (2007), da Silva Aragão et al. (2020) установили, что после хранения активность фосфатазы существенно не изменилась. В наших исследованиях снижение активности фосфатазы может быть обусловлено повышением уровня легкозамменяемого фосфата во время хранения, потому что растворимый фосфат снижает активность фосфатазы за счет ингибирования продукции (Speir, 1978).

Активность каталазы в естественно-влажном состоянии в условиях 23–25 °С была статистически ниже контроля в 1.5 раза (p -value<0.02) только через 365 дней. В условиях 10 °С зафиксировано значимое снижение активности фермента через 28, 90 и 365 дней – в 1.5 раза (p -value<0.02). В условиях –10 °С – снижение активности в течение всего периода в 1.5–2 раза соответственно (p -value<0.02) (рис. 4).

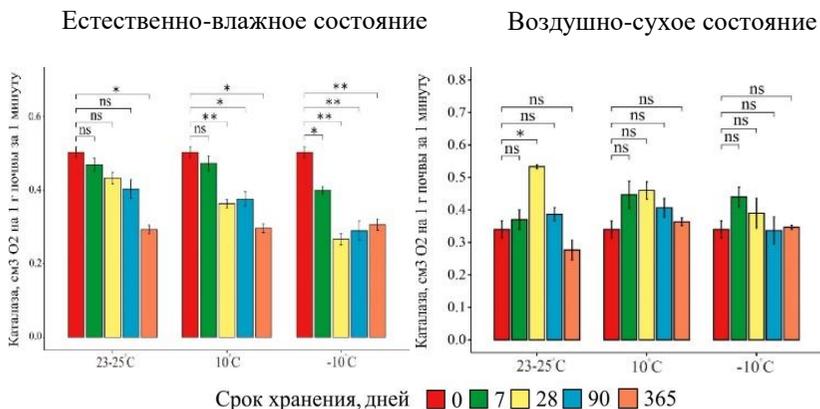


Рис. 4. Активность каталазы при разных сроках и способах хранения в образцах черноземовидной почвы. **Примечание.** ns – $p > 0.05$; уровень значимости: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

Fig. 4. The activity of catalase at different periods and methods of storage in samples of meadow chernozem-like soil. **Note.** ns – $p > 0.05$; significance level: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

Хранение почвенных образцов в воздушно-сухом состоянии в течение всех сроков не привело к статистически значимым изменениям величины активности фермента, за исключением варианта хранения при 23–25 °С в течение 28 дней, где активность каталазы была выше контроля в 1.5 раза (p -value<0.01).

Полученные нами результаты подтверждаются в исследованиях Даденко (2004), где наблюдалось снижение активности каталазы в естественно-влажных образцах и минимальные изменения в воздушно-сухих образцах.

Активность пероксидазы в естественно-влажном состоянии в течение всех сроков хранения была выше контроля в 7–15 раз соответственно вариантам (p -value<0.001). В воздушно-сухом состоянии статистически значимые различия были зафиксированы через 90 дней во всех вариантах, где активность фермента увеличилась в 2 раза относительно контрольного варианта (p -value<0.01). Также значимое повышение наблюдалось через 365 дней в условиях 10 °С, где активность выше контроля в 0.3 раза (p -value<0.02) (рис. 5).

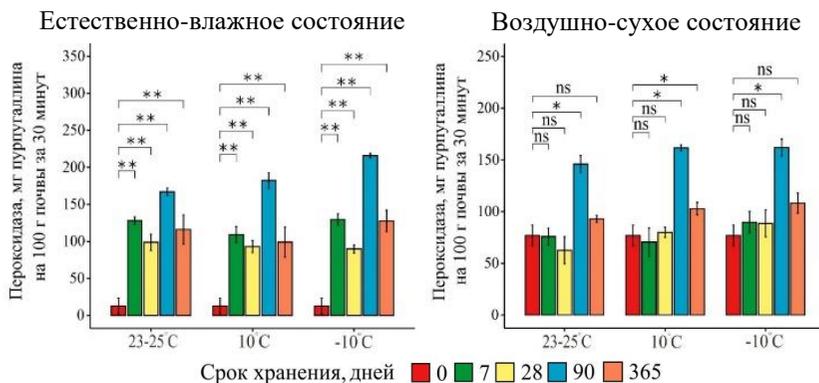


Рис. 5. Активность пероксидазы при разных сроках и способах хранения в образцах черноземовидной почвы. **Примечание.** ns – $p > 0.05$; уровень значимости: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

Fig. 5. The activity of peroxidase at different periods and methods of storage in samples of meadow chernozem-like soil. **Note.** ns – $p > 0.05$; significance level: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

Активность полифенолоксидазы в естественно-влажном состоянии в условиях 23–25 °С значимо не изменилась в течение всего срока хранения. При хранении в условиях 10 °С зафиксировано повышение активности фермента через 90 дней в 3 раза (p -value<0.05), в условиях –10 °С – через 28 и 90 дней в 2–3 раза (p -value<0.01) относительно контроля (рис. 6).

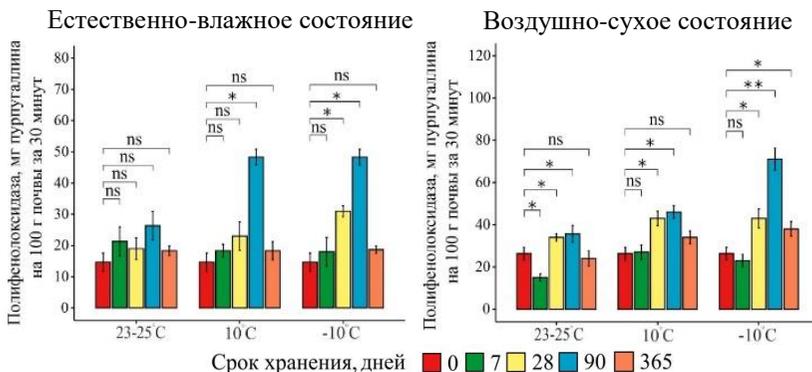


Рис. 6. Активность полифенолоксидазы при разных сроках и способах хранения в образцах черноземовидной почвы. **Примечание.** ns – $p > 0.05$; уровень значимости: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

Fig. 6. The activity of polyphenol oxidase at different periods and methods of storage in samples of meadow chernozem-like soil. **Note.** ns – $p > 0.05$; significance level: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

В воздушно-сухом состоянии в условиях 23–25 °С наблюдалось значимое снижение активности фермента в 1.5 раза через 7 дней и небольшое повышение через 28 и 90 дней (p -value<0.02). В условиях 10 °С статистически-значимые различия были зафиксированы через 28 и 90 дней, где произошло повышение активности фермента в 1.5 раза относительно контроля (p -value<0.02). В условиях –10 °С зафиксировано значимое повышение активности в 1.5–3 раза через 28, 90 и 365 дней относительно контроля (p -value<0.01) (рис. 6).

Повышение активности пероксидазы и полифенолоксидазы с течением времени может быть обусловлено изменением соотношения аэробы-анаэробы в микробном сообществе. Смена аэроб-

ных условий на анаэробные могла послужить причиной замещения активности одного типа ферментов активностью другого типа окислительных ферментов, действующих при недостатке кислорода в почве, вследствие чего произошло увеличение активности ферментов в период хранения (Якушев и др., 2014; Zvyagintsev, 2001).

Согласно шкале сравнительной оценки биологической активности почвы, черноземовидная почва характеризуется очень слабой и слабой активностью уреазы, высокой и очень высокой – фосфатазы, очень слабой – каталазы (табл. 1).

Таблица 1. Шкала сравнительной оценки биологической активности почвы (Э.И. Гапонюк, С.В. Малахов, 1985)

Table 1. Scale for comparative assessment of biological activity of soils (E.I. Gaponyuk, S.V. Malakhov, 1985)

Биологическая активность почвы	Каталаза, см ³ О ₂ /г за 1 мин	Фосфатаза, мг Р ₂ О ₅ на 1 г за 24 часа	Уреазы, мг NH ₃ на 1 г за 24 часа
Очень слабая	<1	<0.05	<0.3
Слабая	1–3	0.05–0.15	0.3–1.0
Средняя	3–10	0.15–0.5	1.0–3.0
Высокая	10–30	0.5–1.5	3.0–10
Очень высокая	>30	>1.5	>10

Гидротермический режим (температура и влажность) почв является одним из важнейших факторов, регулирующих интенсивность протекающих в почве биохимических процессов и сезонные изменения активности почвенных ферментов. Прямое воздействие температуры и влажности заключается в непосредственном участии воды во многих биохимических реакциях, а протекание ферментативных процессов возможно лишь в определенном интервале температур. Косвенное влияние проявляется через условия жизнедеятельности почвенных организмов и корней растений, так как от их состояния зависит интенсивность поступления ферментов в почву.

По мнению многих ученых, при низких температурах энзиматическая активность снижается, однако при повышении темпе-

ратуры скорость реакции возрастает, а при очень высоких температурах ферменты денатурируют, и активность теряется. Максимальная активность ферментов проявляется при температуре 45–60 °С, полная инактивация происходит при 100 °С. При отрицательных значениях температуры актуальная биологическая активность практически не проявляется, хотя потенциальная активность остается неизменной. Доказано, что для интенсивного развития микроорганизмов благоприятные условия создаются в почве при влажности 15–25% и температуре 15–23 °С.

Избыток либо недостаток влаги в одинаковой степени негативно сказываются на ферментативной активности. Однако наиболее существенные изменения происходят при высушивании почвенных образцов. В воздушно-сухой почве активность, как правило, снижается на 20–30%, а при переувлажнении, наоборот, восстанавливается.

Сочетание оптимальных показателей температуры и влажности разнится в зависимости от складывающихся климатических условий. Наиболее благоприятные гидротермические условия создаются при сочетании температуры 20–30 °С и влажности 40–60 °С ([Темботов, 2017](#); [Хазиев, 2018](#)).

Для оценки общей динамики изменения концентрации ферментов в зависимости от состояния (влажности) и условий хранения (температуры) были просчитаны относительные показатели по отношению к исходным данным. В наших исследованиях исходными показателями является активность исследуемых ферментов в день отбора, относительными показателями – их активность через 7, 28, 90 и 365 дней (рис. 7).

Согласно относительным расчетам, энзиматическая активность черноземовидной почвы в естественно-влажных образцах выше, чем в воздушно-сухих, в 3–4 раза соответственно срокам хранения. Хранение почвенных образцов в различных условиях не привело к значимым различиям в активности ферментов. Таким образом, установлено, что влажность оказала большее влияние на изменение активности ферментов, чем температура.

Ведущее значение увлаженности почвы в энзиматических процессах связано с тем, что, во-первых, влага определяет физиологическое состояние микроорганизмов и растений и тем самым

поступление ферментов в почву; во-вторых, свободная вода необходима для поддержания в каталитически активном состоянии самих ферментов в почве, а также для транспорта субстратов.

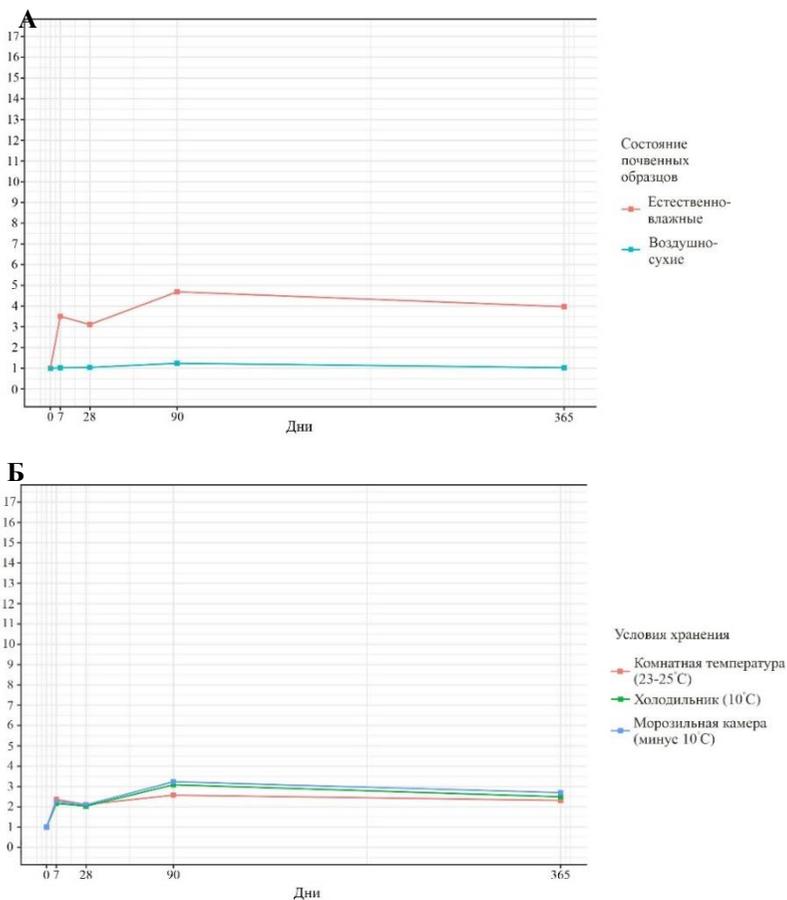


Рис. 7. Общая динамика изменения концентрации ферментов в образцах черноземовидной почвы относительно исходных данных в зависимости от: **А** – состояния, **Б** – условий хранения.

Fig. 7. The general dynamics of changes in the concentration of enzymes in samples of meadow chernozem-like soil relative to the initial data, depending on: **A** – condition, **B** – storage conditions.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высушивание почвенных образцов сразу после отбора ведет к увеличению активности уреазы, фосфатазы, пероксидазы и полифенолоксидазы. Активность уреазы при хранении почвы во все исследовательские сроки в естественно-влажном состоянии достоверно увеличивается; в воздушно-сухом состоянии – уменьшается. Активность фосфатазы значительно увеличивается при хранении почвы в течение 7 дней и уменьшается при хранении в течение 28 и 90 дней. Активность каталазы достоверно уменьшается при хранении естественно-влажной почвы во все исследовательские сроки. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы достоверно увеличивается во все исследовательские сроки хранения почвы.

Черноземовидная почва характеризуется очень слабой активностью каталазы, очень слабой и слабой активностью уреазы, высокой и очень высокой активностью фосфатазы.

Установлено, что состояние почвенных образцов (влажность) оказывает большее влияние на изменение активности ферментов, чем температура хранения. При выборе срока хранения необходимо руководствоваться целью исследований. Если необходимо оценить актуальную (естественную) ферментативную активность, характеризующую интенсивность протекающих энзиматических процессов в почве, то рекомендуется использовать естественно-влажные почвенные образцы сразу после отбора, для исключения влияния различных факторов хранения. Для оценки потенциальной ферментативной активности, степени загрязнения, удобренности, окультуренности почвы, при проведении почвенно-экологического мониторинга рекомендуется высушивать почву и хранить не более 7 дней, так как для большинства исследуемых ферментов при более длительном хранении происходят значительные динамические изменения, которые связаны с изменением доступности субстрата из-за микробиологической активности, с изменением размеров, активности и структуры микробной биомассы, являющейся основным источником ферментов и рядом действующих при хранении физико-химических факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамян С.А.* Изменение ферментативной активности почвы под влиянием естественных и антропогенных факторов // Почвоведение. 1992. № 7. С. 70–82.
2. Временные методические рекомендации по контролю загрязнения почв / *С.Г. Малахов*. М.: Московское отделение гидрометеоздата, 1984.
3. *Галстян А.Ш.* Ферментативная активность почв Армении. Ереван: Айастан, 1974. 275 с.
4. *Галстян А.Ш.* Унификация методов исследования активности ферментов почв // Почвоведение. 1978. № 2. С. 107–113.
5. *Галстян А.Ш.* Об устойчивости ферментов почв // Почвоведение. 1982. № 4. С. 108–110.
6. *Голов Г.В.* Почвы и экология агрофитоценозов Зейско-Буреинской равнины. Владивосток: Дальнаука, 2001. 162 с.
7. *Даденко Е.В., Казеев К.Ш.* Влияние различных сроков и способов хранения почвенных образцов на ферментативную активность чернозема // Известия вузов. Естественные науки. Приложение. 2004. № 6. С. 61–65. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-razlichnyh-srokov-i-sposobov-hraneniya-pochvennyh-obraztsov-na-fermentativnuyu-aktivnost-chnozema/viewer>.
8. *Даденко Е.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф.* Изменение ферментативной активности при хранении почвенных образцов // Почвоведение. 2009. № 12. С. 1481–1486. URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_12988857_18993356.pdf.
9. *Звягинцев Д.Г.* Биология почв и их диагностика // Проблемы и методы биологической диагностики и индикации почв: материалы всесоюзного совещания. М.: Наука, 1976. С. 175–189.
10. *Ивлев А.М., Дербенцева В.И., Голов В.И., Трегубова В.Г.* Агрохимия почв юга Дальнего Востока. М.: Круглый год, 2001. 104 с.
11. *Лабутова Н.М., Банкина Т.А.* Основы почвенной энзимологии. СПб: Изд-во СПбГУ, 2013. 104 с.
12. *Личко В.И.* Ферментативная активность как индикатор экологического состояния почв: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 03.00.27. Воронеж: Воронежский Государственный Университет, 1998. 18 с.
13. *Муртазина С.Г., Гайсин И.А., Муртазин М.Г.* Практикум по почвоведению. Казань: Изд-во Казанской гос-ной с.-х. академии, 2006. 225 с.
14. *Пилецкая О.А.* Биологическая активность черноземовидной почвы при использовании различных систем удобрений: Автореф. дис. ... канд.

биол. наук: 03.02.08. Владивосток: ФГАОУ ВПО “Дальневосточный федеральный университет”, 2015. 24 с.

URL: [https://www.dissercat.com/content/biologicheskaya-aktivnost-
chernozemovidnoi-pochvy-pri-ispolzovanii-razlichnykh-sistem-udobre/read](https://www.dissercat.com/content/biologicheskaya-aktivnost-chernozemovidnoi-pochvy-pri-ispolzovanii-razlichnykh-sistem-udobre/read).

15. *Темботов Р.Х.* Эколого-биологическая оценка состояния почв равнин и предгорий Центрального Кавказа (в границах Кабардино-Балкарии): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 03.02.08. Ростов-на-Дону, 2017. 24 с.

URL: [https://www.dissercat.com/content/ekologo-biologicheskaya-otsenka-
sostoyaniya-pochv-ravnin-i-predgorii-tsentralnogo-kavkaza-v/read](https://www.dissercat.com/content/ekologo-biologicheskaya-otsenka-sostoyaniya-pochv-ravnin-i-predgorii-tsentralnogo-kavkaza-v/read).

16. *Хазиев Ф.Х.* Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.

17. *Хазиев Ф.Х.* Экологические связи ферментативной активности почв // Экобиотех. 2018. № 2. С. 80–92. URL:

<http://ecobiotech-journal.ru/2018/pdf/ecbtch1802080.pdf>.

18. *Чеве́рдин Ю.И., Рябцев А.Н., Титова Т.В.* Научное обоснование и взаимосвязь агрофизических параметров с эффективным плодородием почвы // Состояние почв центрального Черноземья России и проблемы воспроизводства их плодородия. Сборник науч. докл. Всероссийской научно-практической конференции. Воронеж: Изд-во “Истоки”, 2015. С 56–61.

19. *Щапова Л.Н., Пуртова Л.Н., Костенков Н.М.* Биологическая активность почв юга Дальнего Востока России // Вестник КрасГАУ. 2014. № 5. С. 64–69. URL: [https://cyberleninka.ru/article/n/biologicheskaya-
aktivnost-pochv-yuga-dalnego-vostoka-rossii/viewer](https://cyberleninka.ru/article/n/biologicheskaya-aktivnost-pochv-yuga-dalnego-vostoka-rossii/viewer).

20. *Якушев А.В., Кузнецова И.Н., Благодатская Е.В., Благодатский С.А.* Зависимость активности полифенолпероксидаз и полифенолоксидаз в современных и погребенных почвах от температуры // Почвоведение. 2014. № 5. С. 590–596. URL:

[https://www.researchgate.net/publication/269964513_Zavisimost_aktivnosti_po-
lifenolperoksidaz_i_polifenoloksidaz_v_sovremennyh_i_pogrebennyh_pocvah-
ot_temperature](https://www.researchgate.net/publication/269964513_Zavisimost_aktivnosti_po_lifenolperoksidaz_i_polifenoloksidaz_v_sovremennyh_i_pogrebennyh_pocvah_ot_temperature).

21. *Badiane N.N.Y., Chotte J.L., Pate E.* Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semiarid tropical regions // Applied Soil Ecology. 2001. Vol. 18(3). P. 229–238.

22. *Brohon B., Delolme C., Gourdon R.* Qualification of soils through microbial activities measurements: influence of the storage period on INT-reductase, phosphatase and respiration // Chemosphere. 1999. Vol. 38. P. 1973–1984.

23. *da Silva Aragão O.O., de Oliveira-Longatti S.M., Alves Souza A., da Conceição Jesus E., Neves Merlo M., de Oliveira E.P., de Souza Moreira F.M.* The effectiveness of a microbiological attribute as a soil quality indicator

depends on the storage time of the sample // Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 2020. Vol. 20. P. 2525–2535.

24. *Dick R.P., Thomas D.R., Halvorson J.J.* Standardized methods, sampling and sample pretreatment. Methods for assessing soil quality // Soil Science Society of America. 1996. Vol. 6(49). P. 410–416.

25. *Esterman E.F., McLaren A.D.* Contribution of rhizoplane organisms to the total capacity of plants to utilize organic nutrients // Plant soil. 1961. Vol. 15. P. 243–260.

26. ISO 10381-6:2009. Soil Quality. Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass, and diversity in the laboratory. Geneva: International Organization for Standardization, 2009. 6 p.

27. *Jenkinson D.S., Powlson D.S.* The effect of biocidal treatments on metabolism in soil // Soil Biology & Biochemistry. 1976. Vol. 8. P. 209–213.

28. *Jenkinson D.S.* Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil // Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems. 1988. P. 368–386.

29. *Lee Y.B., Lorenz N., Dick L.K., Dick R.P.* Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties // Soil Biology & Biochemistry. 2007. Vol. 71. P. 1299–1305.

30. *MacLeod R.A., Calcott P.H.* Cold shock and freezing damage to microbes // The Survival of Vegetative Microbes. 1976. P. 81–109.

31. OECD. Guideline for the testing of chemicals Draft. Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems. Italy: Belgirate, 1995. 35 p.

32. *Pancholy S.K., Rice E.L.* Effect of storage conditions on activities of urease, invertase, amylase and dehydrogenase in soil // Soil Science Society of America Proceedings. 1972. Vol. 36. P. 536–537.

33. *Ross D., Tate K.R., Cairns A., Meyrick K.* Influence of storage on soil microbial biomass estimated by three biochemical procedures // Soil Biology & Biochemistry. 1980. Vol. 4. P. 369–374.

34. *Smith J.L., Paul E.A.* The significance of soil microbial biomass estimations // Soil Biochemistry. 1990. Vol. 6. P. 357–396.

35. *Speir T.W., Ross D.J.* Effects of storage on the activities of protease, urease, phosphatase and sulphatase in three soils under pasture // New Zealand Journal of Soil Science. 1975. Vol. 18. P. 231–237.

36. *Speir T.W., Ross D.J.* Soil phosphatase and sulfatase // Soil Enzymes / Burns R.G. (Ed.). 1978. Chapter 6. P. 197–250.

37. *Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjobahl-Svensson K., Stenstrom J., Torstensson L.* Microbial biomass and activities in soils as affected by frozen and cold storage // Soil biology and biochemistry. 1998. Vol. 30(3). P. 393–

402. URL:

https://www.researchgate.net/publication/223360014_Microbial_biomass_and_activities_in_soil_as_affected_by_frozen_and_cold_storage.

38. *Trabue S.L., Palmquist D.E., Lydick T., Koch-Singles S.* Effects of soil storage on the microbial community and degradation of metsulfuron-methyl // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. Vol. 54(1). P. 142–151.

39. *Verchot L.V.* Cold storage of a tropical soil decreases nitrification potential // Soil Science Society of America Journal. 1999. Vol. 63. P. 1942–1944.

40. *Vestberg M., Sirvio H., Maarit Niemi R., Vepsalainen M., Kukkonen S.* Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment // Soil Biology & Biochemistry. 2001. Vol. 33. P. 1665–1672.

41. *Zantua M.I., Bremner J.M.* Preservation of soil samples for assay of urease activity in soils // Soil Biology & Biochemistry. 1975. Vol. 7. P. 297–299.

42. *Zvyagintsev D.G.* Composition and functioning of a complex of soil microorganisms // Eurasian Soil Science. 2001. Vol. 34. P. 65–73.

REFERENCES

1. *Abramyan S.A.*, Изменение ферментативной активности почвы под влиянием естественных и антропогенных факторов (Changes in the enzymatic activity of the soil under the influence of natural and anthropogenic factors), *Pochvovedenie*, 1992, No. 7, pp. 70–82.

2. *Malakhov S.G.*, *Vremennye metodicheskie rekomendatsii po kontrolyu zagryazneniya pochv* (Temporary guidelines for soil pollution control), Moscow: Moskovskoe otdelenie gidrometeoizdata, 1984.

3. *Galstyan A.Sh.*, *Fermentativnaya aktivnost' pochv Armenii* (Enzymatic activity of Armenian soils), Erevan: Aiastan, 1974, 275 p.

4. *Galstyan A.Sh.*, Unifikatsiya metodov issledovaniya aktivnosti fermentov pochv (Unification of methods for studying the activity of soil enzymes), *Pochvovedenie*, 1978, No. 2, pp. 107–113.

5. *Galstyan A.Sh.*, Ob ustoychivosti fermentov pochv (On the stability of soil enzymes), *Pochvovedenie*, 1982, No. 4, pp. 108–110.

6. *Golov G.V.*, *Pochvy i ekologiya agrofytotsenozov Zeisko-Bureinskoi ravniny* (Soils and ecology of agrophytocenoses of the Zeya-Bureya Plain), Vladivostok: Dal'nauka, 2001, 162 p.

7. *Dadenko E.V., Kazeev K.Sh.*, Vliyanie razlichnykh srokov i sposobov khraneniya pochvennykh obraztsov na fermentativnuyu aktivnost' chernoze-ma (Influence of different periods and methods of storage of soil samples on the enzymatic activity of chernozem), *Izvestiya vuzov. Estestvennye nauki. Prilozhenie*, 2004, No. 6, pp. 61–65,

URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-razlichnyh-srokov-i-sposobov->

[hraneniya-pochvennyh-obraztsov-na-fermentativnuyu-aktivnost-
chernozema/viewer.](#)

8. Dadenko E.V., Kazeev K.Sh., Kolesnikov S.I., Val'kov V.F., *Izmenenie fermentativnoi aktivnosti pri khraneniі pochvennykh obraztsov (Changes in enzymatic activity during storage of soil samples)*, *Pochvovedenie*, 2009, No. 12, pp. 1481–1486,

URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_12988857_18993356.pdf.

9. Zvyagintsev D.G., *Biologiya pochv i ikh diagnostika (Biology of soils and their diagnostics)*, *Problemy i metody biologicheskoi diagnostiki i indikatsii pochv: materialy vsesoyuznogo soveshchaniya*, Moscow: Nauka, 1976, pp. 175–189.

10. Ivlev A.M., Derbentseva V.I., Golov V.I., Tregubova V.G., *Agrokhimiya pochv yuga Dal'nego Vostoka (Agrochemistry of soils in the south of the Far East)*, Moscow: Kruglyi god, 2001, 104 p.

11. Labutova N.M., Bankina T.A., *Osnovy pochvennoi enzimologii (Fundamentals of soil enzymology)*, St.Petersburg: Izd-vo SPbGU, 2013, 104 p.

12. Lichko V.I., *Fermentativnaya aktivnost' kak indikator ekologicheskogo sostoyaniya pochv: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk (Enzymatic activity as an indicator of the ecological state of soils, Extended abstract of cand. biol. sci. thesis)*, 03.00.27, Voronezh: Voronezhskii Gosudarstvennyi Universitet, 1998, 18 p.

13. Murtazina S.G., Gaisin I.A., Murtazin M.G., *Praktikum po pochvovedeniyu (Workshop on soil science)*, Kazan': Izd-vo Kazanskoi gos-noi s.-kh. akademii, 2006, 225 p.

14. Piletskaya O.A., *Biologicheskaya aktivnost' chernozemovidnoi pochvy pri ispol'zovanii razlichnykh sistem udobrenii: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk (Biological activity of chernozem-like soil when using various fertilizer systems, Extended abstract of cand. biol. sci. thesis)*, 03.02.08, Vladivostok: FGAOU VPO “Dal'nevostochnyi federal'nyi universitet”, 2015, 24 p., URL: <https://www.dissercat.com/content/biologicheskaya-aktivnost-chernozemovidnoi-pochvy-pri-ispolzovanii-razlichnykh-sistem-udobre/read>.

15. Tembotov R.Kh., *Ekologo-biologicheskaya otsenka sostoyaniya pochv ravnin i predgorii Tsentral'nogo Kavkaza (v granitsakh Kabardino-Balkarii): Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk (Ecological and biological assessment of the state of soils in the plains and foothills of the Central Caucasus (within Kabardino-Balkaria, Extended abstract of cand. biol. sci. thesis)*, 03.02.08, Rostov-na-Donu, 2017, 24 p., URL:

<https://www.dissercat.com/content/ekologo-biologicheskaya-otsenka-sostoyaniya-pochv-ravnin-i-predgorii-tsentralnogo-kavkaza-v/read>.

16. Khaziev F.Kh., *Metody pochvennoi enzimologii* (Methods of soil enzymology), Moscow: Nauka, 2005, 252 p.
17. Khaziev F.Kh., Ekologicheskie svyazi fermentativnoi aktivnosti pochv (Ecological relationships of soil enzyme activity), *Ecobiotech*, 2018, No. 2, pp. 80–92, URL: <http://ecobiotech-journal.ru/2018/pdf/ecbtch1802080.pdf>.
18. Cheverdin Yu.I., Ryabtsev A.N., Titova T.V., Nauchnoe obosnovanie i vzaimosvyaz' agrofizicheskikh parametrov s effektivnym plodorodiem pochvy (Scientific justification and relationship of agrophysical parameters with effective soil fertility), In: *Sostoyanie pochv tsentral'nogo Chernozem'ya Rossii i problemy vosproizvodstva ikh plodorodiya: sbornik nauch. dokl. Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii* (Proc. Russian sci.-pract. Conf. The state of soils of the Central Chernozem region of Russia and the problems of reproduction of their fertility), Voronezh: Izd-vo "Istoki", 2015, pp. 56–61.
19. Shchapova L.N., Purtova L.N., Kostenkov N.M., Biologicheskaya aktivnost' pochv yuga Dal'nego Vostoka Rossii (Biological activity of soils in the south of the Russian Far East), *Vestnik KrasGAU*, 2014, No. 5, pp. 64–69, URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/biologicheskaya-aktivnost-pochv-yuga-dalnego-vostoka-rossii/viewer>.
20. Yakushev A.V., Kuznetsova I.N., Blagodatskaya E.V., Blagodatskii S.A., Zavisimost' aktivnosti polifenolperoksidaz i polifenoloksidaz v sovremennykh i pogrebennykh pochvakh ot temperatury (Dependence of the activity of polyphenol peroxidases and polyphenol oxidases in modern and buried soils on temperature), *Pochvovedenie*, 2014, No. 5, pp. 590–596, URL: https://www.researchgate.net/publication/269964513_Zavisimost_aktivnosti_polifenolperoksidaz_i_polifenoloksidaz_v_sovremennykh_i_pogrebennykh_pochvah_ot_temperatury.
21. Badiane N.N.Y., Chotte J.L., Pate E., Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semiarid tropical regions, *Applied Soil Ecology*, 2001, Vol. 18(3), pp. 229–238.
22. Brohon B., Delolme C., Gourdon R., Qualification of soils through microbial activities measurements: influence of the storage period on INT-reductase, phosphatase and respiration, *Chemosphere*, 1999, Vol. 38, pp. 1973–1984.
23. da Silva Aragão O.O., de Oliveira-Longatti S.M., Alves Souza A., da Conceição Jesus E., Neves Merlo M., de Oliveira E.P., de Souza Moreira F.M., The effectiveness of a microbiological attribute as a soil quality indicator depends on the storage time of the sample, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2020, Vol. 20, pp. 2525–2535.

24. Dick R.P., Thomas D.R., Halvorson J.J., Standardized methods, sampling and sample pretreatment. Methods for assessing soil quality, *Soil Science Society of America*, 1996, Vol. 6(49), pp. 410–416.
25. Esterman E.F., McLaren A.D., Contribution of rhizoplane organisms to the total capacity of plants to utilize organic nutrients, *Plant soil*, 1961, Vol. 15, pp. 243–260.
26. ISO 10381-6:2009, Soil Quality, Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass, and diversity in the laboratory, Geneva: International Organization for Standardization, 2009, 6 p.
27. Jenkinson D.S., Powlson D.S., The effect of biocidal treatments on metabolism in soil, *Soil Biology & Biochemistry*, 1976, Vol. 8, pp. 209–213.
28. Jenkinson D.S., Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil, *Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems*, 1988, pp. 368–386.
29. Lee Y.B., Lorenz N., Dick L.K., Dick R.P., Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties, *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, Vol. 71, pp. 1299–1305.
30. MacLeod R.A., Calcott P.H., Cold shock and freezing damage to microbes, *In The Survival of Vegetative Microbes*, 1976, pp. 81–109.
31. OECD, Guideline for the testing of chemicals Draft, Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems, Italy: Belgirate, 1995, 35 p.
32. Pancholy S.K., Rice E.L., Effect of storage conditions on activities of urease, invertase, amylase and dehydrogenase in soil, *Soil Science Society of America Proceedings*, 1972, Vol. 36, pp. 536–537.
33. Ross D., Tate K.R., Cairns A., Meyrick K., Influence of storage on soil microbial biomass estimated by three biochemical procedures, *Soil Biology & Biochemistry*, 1980, Vol. 4, pp. 369–374.
34. Smith J.L., Paul E.A., The significance of soil microbial biomass estimations, *Soil Biochemistry*, 1990, Vol. 6, pp. 357–396.
35. Speir T.W., Ross D.J., Effects of storage on the activities of protease, urease, phosphatase and sulphatase in three soils under pasture, *New Zealand Journal of Soil Science*, 1975, Vol. 18, pp. 231–237.
36. Speir T.W., Ross D.J., Soil phosphatase and sulfatase, In: *Soil Enzymes*, Burns R.G. (Ed.), 1978, Chapter 6, pp. 197–250.
37. Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenstrom J., Torstensson L., Microbial biomass and activities in soils as affected by frozen and cold storage, *Soil biology and biochemistry*, 1998, Vol. 30(3), pp. 393–402, URL:

https://www.researchgate.net/publication/223360014_Microbial_biomass_and_activities_in_soil_as_affected_by_frozen_and_cold_storage.

38. Trabue S.L., Palmquist D.E., Lydick T., Koch-Singles S., Effects of soil storage on the microbial community and degradation of metsulfuron-methyl, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, Vol. 54(1), pp. 142–151.

39. Verchot L.V., Cold storage of a tropical soil decreases nitrification potential, *Soil Science Society of America Journal*, 1999, Vol. 63, pp. 1942–1944.

40. Vestberg M., Sirvio H., Maarit Niemi R., Vepsalainen M., Kukkonen S., Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment, *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, Vol. 33, pp. 1665–1672.

41. Zantua M.I., Bremner J.M., Preservation of soil samples for assay of urease activity in soils, *Soil Biology & Biochemistry*, 1975, Vol. 7, pp. 297–299.

42. Zvyagintsev D.G., Composition and functioning of a complex of soil microorganisms, *Eurasian Soil Science*, 2001, Vol. 34, pp. 65–73.