

**Автономная некоммерческая общеобразовательная
организация "Физтех-лицей"
(АНОО «Физтех-лицей» им. П.Л. Капицы)**

XX научно-практическая конференция

«Старт в инновации»

**Азотфиксирующие бактерии различных почв
и их влияние на рост и урожайность
культурных растений**

Выполнила:
Могилевская А. 10 «Г»
Руководитель:
Сальникова Е. И.

Московская область, г. Долгопрудный

2021 г.

Оглавление

Введение	3
1. Актуальность	3
2. Связывание азота	3
3. <i>Azotobacter</i>	5
4. Биохимия процесса	6
Материалы и методы	7
Материалы:	7
Методы	8
1. Отбор почв методом конверта	8
2. Определение механического состава почвы	8
3. Капельные реакции	8
4. Измерение рН	9
5. Окраска по Граму	9
6. Фотометрический анализ	9
Ход работы	10
Результаты	11
Обсуждение	14
Заключение	14
Выводы	14
Список литературы	15

Введение

1. Актуальность

Азот является составляющей частью ДНК, белков, АТФ и других важнейших органических молекул [1]. Он является макроэлементом, его содержание в клетке оценивается как 1,5-3,0% сухой массы [2]. Основным источником азота для биосферы – атмосфера (азот составляет примерно 78% воздуха по объему), где он находится в виде молекул N_2 , которая из-за наличия трех ковалентных связей является инертной [3], поэтому живые организмы в основном не способны усваивать молекулярный азот [4]. Так, растения могут усваивать лишь ионы аммония и нитраты, а животные получают азот только из белков других организмов. Таким образом, наличие растворимых форм азота в почве является важным лимитирующим фактором для экосистемы. Людям необходимо получать азот с пищей, то есть для полноценного питания обязательно содержание достаточного количества азота в пищевой продукции, а значит, его растворимые формы должны в достаточном количестве содержаться в почвах, используемых для земледелия [5].

2. Связывание азота

Существуют несколько способов перевода азота в растворимую форму – его фиксации (связывания): в результате действия физических сил природы (например молний), промышленного синтеза и биотической азотфиксации (рис. 1). В первом случае происходит взаимодействие атмосферного кислорода и азота под влиянием высоких температур, возникающих во время грозных разрядов. Промышленный синтез аммиака в основном ведется с помощью процесса Габера [5]. Биогенная фиксация азота осуществляется прокариотическими организмами, которые могут быть как находясь в симбиозе с растениями (*Rhizobium*), так и быть свободноживущими (*Clostridium*, *Azotobacter*) (табл. 1).

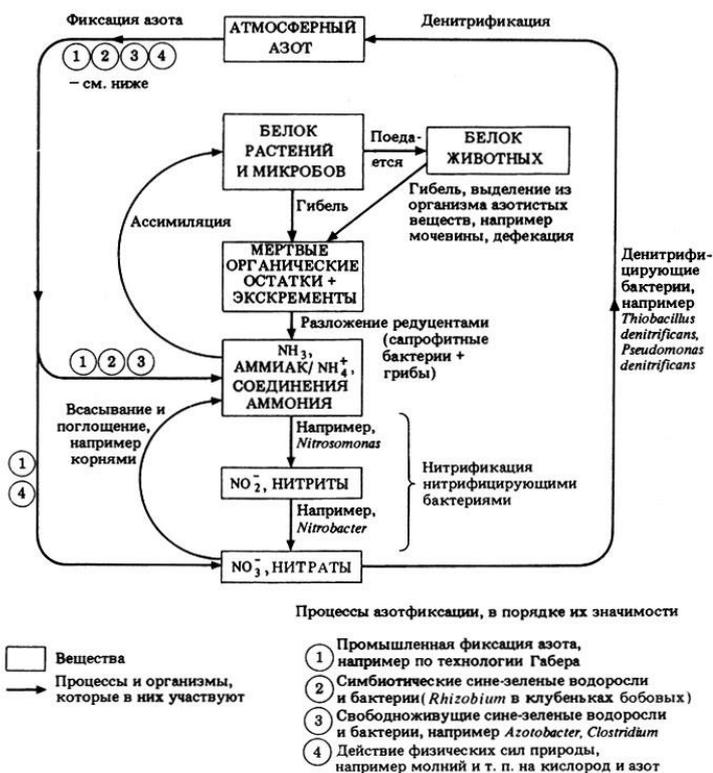


Рис. 1. Круговорот азота [5]

Тип фиксации	Масса фиксированного N ₂ , млн т.
Абиотический	
Промышленная фиксация	50
Из ископаемого топлива	20
Гроза	10
Итого	80
Биотический	
С/х территории	90
Леса и не с/х территории	50
Море	35
Итого	175

Таблица 1. Количество азота, фиксируемого различными путями (по данным 1998 г.) [6]

Так как действие физических сил природы непредсказуемо, этот процесс фиксации азота нельзя использовать для повышения плодородности почв. Промышленно фиксированный азот используется для получения удобрений, которые затем вносятся в почву, однако это может привести к отрицательным последствиям: они могут накапливаться в почве и в растениях, делая их небезопасными для потребления, их применение может вызвать эвтрофикацию водоемов [7]. Таким образом, для обогащения почв растворимыми формами азота остается использовать биотический способ фиксации. Возможно внесение бактериальных удобрений, содержащих азотофиксирующие бактерии (например, ризоторфина, нитрагина и азотобактерина) [8]. Однако в почвах часто содержатся азотофиксаторы и без вмешательства человека. Вопросы изучения состава азотофиксирующих бактерий, их жизнедеятельности, ее активизации, получения препаратов на основе выделенных высокопродуктивных штаммов поднимались в работах микробиологов с момента открытия способности бактерий фиксировать молекулярный азот в 1893 году С. Виноградским [9, 10, 11, 12]. Однако, с возникновением современных методов секвенирования геномов, появились новые перспективы для поиска высокопродуктивных штаммов, изучения генетики процессов азотификсации и, возможно, создания генномодифицированных организмов, способных осуществлять микробиологическую фиксацию азота в реакторах для получения связанных форм азота или биосинтеза необходимых аминокислот для пищевой промышленности, минуя цепочку растение-производитель – консумент 1-травоядное животное. Многообразие бактерий и варибельность их геномов очень высока, поэтому одной из задач, стоящей перед современными исследователями является изучение максимально возможного количества штаммов бактерий, а для этого их необходимо выделить из различных почв. Наша работа является частью большого проекта, запущенного ИХБФМ СО РАН в рамках изучения азотофиксирующих бактерий Российской Федерации. Провести секвенирование геномов выделенных штаммов в рамках школьного проекта не представляется возможным, поэтому оценка штаммов будет произведена с использованием классических методов, а выделенные штаммы будут переданы в лабораторию НШУ для секвенирования и дальнейшего изучения.

Из этих соображений была сформулирована **цель:**

Выделить и описать штаммы азотофиксирующих бактерий из различных почв Московской области.

Для достижения этой цели должны быть выполнены следующие задачи:

1. Подобрать участки почв в Московской области, обладающие разной характеристикой с точки зрения антропогенной нагрузки (с/х назначения, лесных массивов и городских территорий).
2. Собрать образцы почв, проанализировать их физические и химические характеристики, антропогенную нагрузку
3. Выделить из почв культуры азотфиксирующих бактерий и описать их
4. Получить культуральную жидкость для обработки семян зеленных культур
5. Оценить влияние обработки разными штаммами бактерий зеленных культур

Гипотеза: штаммы *Azotobacter*, выделенные из различных почв обладают разной микробиологической активностью.

Эта работа может способствовать достижению второй Цели устойчивого развития «Ликвидация голода».

3. *Azotobacter*

Исследование проводилось на примере бактерий рода *Azotobacter*, который был выбран из-за своей распространенности, изученности и простоты в культивировании. Это род грамотрицательных бактерий, обитающих преимущественно в слабокислых, нейтральных и слабощелочных почвах (рост и азотфиксация возможны в диапазоне pH от 4,8 до 8,5, оптимально – 7,0 – 7,5). Бактерии рода азотобактер являются свободноживущими азотофиксаторами, однако они способны жить в ассоциации с некоторыми растениями. Первым описанным видом этого рода является *Azotobacter chroococcum*, был открыт в 1901 году Мартином Бейеринком. Всего в этом роде содержатся 6 видов, наиболее распространены *Azotobacter chroococcum* (типовой вид), образующий колонии бурого, почти черного цвета (рис. 2), *Azotobacter agilis*, для которого характерны бесцветные колонии, и *Azotobacter vinelandii*, чьи колонии флуоресцирующей желтовато-зеленой окраски. Клетки относительно крупные (1-2 мкм в диаметре), как правило имеют овальную форму, но возможен широкий полиморфизм от палочковидной до сферической формы. Клетки могут располагаться одиночно, парами, неправильными скоплениями, цепочками. Клетки образуют цисты, не образуют спор. В ранних культурах клетки имеют жгутики [13, 14].

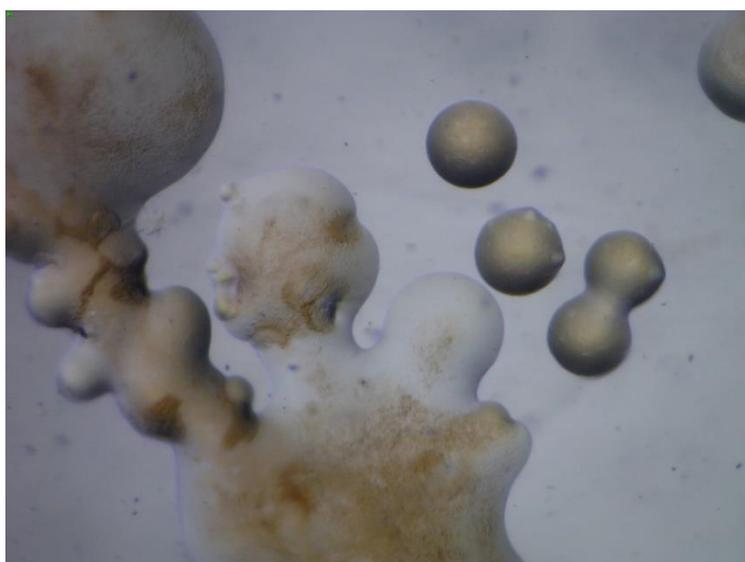
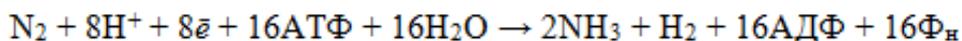


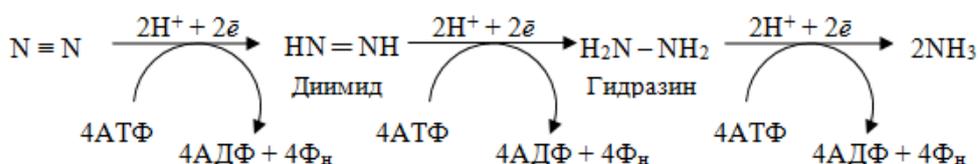
Рис. 2. Колонии *Azotobacter chroococcum* (собственная фотография, 40x)

4. Биохимия процесса

Фиксация азота – сложный энергозатратный процесс, который начинается при недостатке нитратов и аммиака и катализируется ферментом нитрогеназой. Суммарная реакция восстановления N_2 до NH_3 в клетке описывается таким уравнением:



Этот процесс проходит в несколько стадий:



Как видно из уравнения реакции, для ее протекания нужна энергия в виде АТФ и источник электронов, то есть восстановитель. Они синтезируются в результате процессов брожения, дыхания или фотосинтеза. Восстановителем в этой реакции является восстановленный ферредоксин [15], который может иметь различное происхождение в зависимости от типов питания организма, например, у бактерий рода *Azotobacter*, являющихся аэробными хемотрофами, это происходит при окислении НАДФН до НАДФ⁺. Таким образом процесс фиксации азота можно схематично отобразить так (рис. 3):



Рис. 3. Схема фиксирования азота [15]

Азотфиксация ингибируется молекулярным кислородом, поэтому аэробные азотфиксаторы приобретают адаптации для защиты нитрогеназы от влияния O_2 . Это может быть дыхательная защита, конформационная защита, морфологическая или поведенческая адаптация. Бактериям рода *Азотобактер* свойственна дыхательная защита (они обладают разветвленной дыхательной цепью) и морфологическая адаптация – они выделяют слизь [16]. Возможно, что выделяемые ими пигменты тоже служат этой цели [14].

Материалы и методы

Материалы:

1. 7 проб почв (для удобства им были даны короткие названия, представленные в скобках) :
 - 1) С поля, на котором выращивается клевер («Клевер»)
 - 2) С поля, на котором выращиваются злаки: овсяница луговая, тимофеевка луговая, ежа сборная («Злаки 2»)
 - 3) С поля, на котором выращиваются злаки: овсяница луговая, тимофеевка луговая, ежа сборная, райграс высокий и бобовые травы: клевер луговой и гибридный, люцерна, эспарцет, лядвенец рогатый, чина лесная, вика мышиная («Клевер и злаки»),
 - 4) С поля, на котором выращиваются злаковые и бобовые многолетние травы в севообороте, на момент сбора почв 2-й год выращивания злаков («Злаки 1»)
 - 5) Из ельника («Ель»)
 - 6) Из соснового леса («Сосна»)
 - 7) С пришкольного участка, почва собранная под елью («Город»)

Пробы 1- 4 были взяты с полей ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» (ранее ФГБНУ «ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса»), 5-6 – из заказника «Журавлиная родина» (Талдомский и Сергиево-Посадский г. о.).

2. Семена салата (*Lactuca sativa*) 'Задор'
3. Среда Эшби

Состав, г/л:

Сахароза – 20,0

Калий фосфорнокислый однозамещенный (K_2HPO_4) – 0,2

Сульфат магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) – 0,2

Хлорид натрия ($NaCl$) – 0,2

Сульфит калия (K_2SO_4) – 0,1

Карбонат кальция ($CaCO_3$) – 5,0

Агар-агар – 15,0 г

Вода дистиллированная – 1,0

4. Материалы для микроскопирования (объективы x4, x10, x40, x100 с масляной иммерсией)
5. Термостат Binder
6. Спектрофотометр UNICO модель 2800
7. pH-метр pH-410 «Аквилон», магнитная мешалка
8. Реактивы для качественных реакций ($BaCl_2$, $AgNO_3$, раствор дифениламина, KI, HCl, желтая кровяная соль)
9. Материалы для окраски по Граму (красители генцианвиолет, раствор Люголя, фуксин)
10. Материалы для обработки фотографий и статистической обработки (фотоаппарат, компьютер с установленными программами Excel и WebPlotDigitizer)
11. Чашки Петри, пробирки, штативы для пробирок, пробирки типа Фалькон, пипетки Пастера, спиртовка, микробиологические петли, химическая посуда, весы,

Методы

1. Отбор почв методом конверта

Для исключения влияния случайных факторов, отбор почв обычно осуществляется методом конверта. Для этого выбирают 5 точек на местности так, что если мысленно их соединить, получается рисунок запечатанного конверта (рис. 4). Длина стороны конверта должна составлять от 2 до 5-10 м. Далее в местах отмеченных точек берут точечные пробы, которые затем объединяют [17].

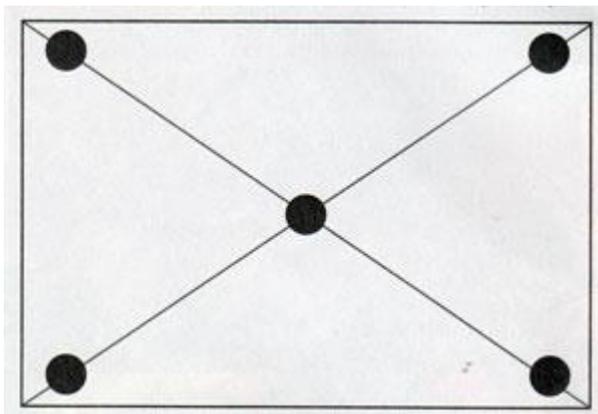


Рис. 4. Схема расположения точечных проб

2. Определение механического состава почвы

Для определения механического состава почвы почву смешивают с водой до получения вязкой массы, из которой надо попробовать скатать шарик, затем растянуть его в жгут и соединить в кольцо. В зависимости от типа почвы, при скатывании:

- a. почва не скатается в шарик – песчаная почва
- b. почва не скатается в шарик, но слепится в непрочные шарики – супесчаная почва
- c. почва образует непрочный шарик, который в жгут не раскатывается – легкосуглинистая почва
- d. почва образует сплошной жгут, который разламывается при соединении в кольцо – среднесуглинистая почва
- e. почва образует сплошной жгут, который покрывается трещинами при соединении в кольцо – тяжелосуглинистая почва
- f. почва образует сплошной жгут, который соединяется в кольцо – глинистая почва [13]

3. Капельные реакции

Химические характеристики почв могут быть оценены с помощью капельных реакций, для которого реагенты берут в количестве нескольких капель (в таком случае реагентом будет являться не сама почва, а ее водная выжимка). Выжимка почвы и второй реагент с помощью пипетки Пастера наносились на предметное стекло, результаты реакции оценивались невооруженным глазом или через микроскоп [18].

4. Измерение рН

Водородный показатель (рН) среды является важной химической характеристикой, от которой зависит биоразнообразие населяющей ее организмов. Простейшим способом измерения рН является использование индикаторной бумаги. Для измерений с большей точностью можно использовать рН-метр (рис. 5). В случае почв для обоих методов применяется почвенная выжимка.



Рис. 5 рН-метр, схема устройства рН-метра

5. Окраска по Граму

Окраска по Граму – метод окраски микроорганизмов, позволяющий дифференцировать микроорганизмы по строению клеточной стенки (рис. 6). Этот метод часто используется для классификации бактерий [19].

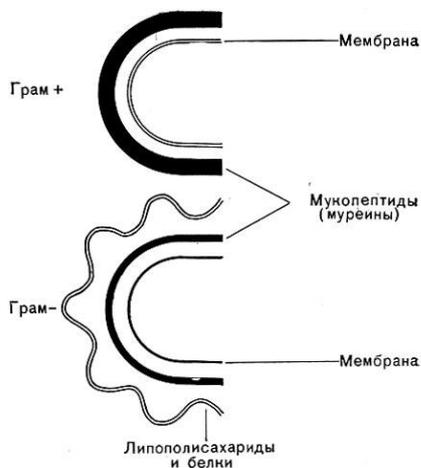


Рис. 6. Схема строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий

6. Фотометрический анализ

Фотометрический анализ основан на поглощении света анализируемым раствором. Это поглощение описывается обобщенным законом Бугера — Ламберта — Бера:

$$\lg \frac{I_0}{I} = \kappa cb$$

где I_0 – интенсивность падающего на объект света, I – интенсивность света, прошедшего через него, κ – показатель поглощения раствора, концентрация которого равна единице, c – концентрация раствора, b – толщина слоя вещества. Величина в левой части равенства обозначается буквой D и называется оптической плотностью [20]. Таким образом, измеряя

оптическую плотность, можно оценить концентрацию микроорганизмов в образце (рис. 7) [21].

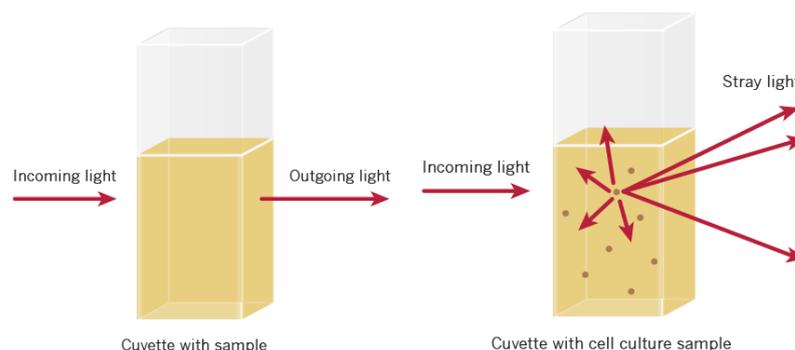


Рис 7. Связь оптической плотности и концентрации [21]

Ход работы

Согласно ГОСТ 17.4.4.02-84 [22], почвы для исследования были отобраны методом конверта. Для исследования были выбраны 7 образцов почв: с территории ООПТ (заказника «Журавлиная родина»), почв с/х назначения (поля ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»), городской территории (пришкольный участок – газон, на котором растет ель). Таким образом, изучаемые образцы были отобраны с территорий, испытывающих разную антропогенную нагрузку и с разной историей.

Для культивирования бактерий была использована среда Эшби. Среда стерилизовалась в автоклаве при температуре 120°C и давлении 1 атм в течении 20 минут. Почвенная выжимка разводилась в 1000 раз, после чего она помещалась на чашки Петри. Бактерии культивировались в термостате при температуре 28°C в течении 2 суток. Выросшие на чашках Петри колонии фотографировались и обрабатывались на компьютере в программе WebPlotDigitizer [23], в результате чего было посчитано процентное отношение площади чашки Петри, покрытой колониями, ко всей ее площади. Полученные на этом этапе бактерии использовались приготовления фиксированных микропрепаратов с окраской по Граму. Затем чашки просматривались под биноклем на x10, из выросших колоний отбирались типичные колонии двух типов – коричневые и неокрашенные, которые повторно пересеивались на твердую среду Эшби и культивировались 4 суток. На этом этапе проводилось микроскопирование колоний на малом (объектив x4, окуляр x10) увеличении. Далее бактерии неделю культивировались на жидкой среде Эшби (совпадающую по составу с твердой средой Эшби, но без добавления агар-агара). Для полученных культур была измерена оптическая плотность при длине волны 600 нм, после чего в данной культуральной жидкости были замочены семена салата на сутки. Салат выращивался при круглосуточном освещении и комнатной температуре в течении 25 суток, после чего было произведено измерение длины третьего листа, так как этот лист был сформирован у всех растений и являлся наиболее показательным. Измерялись 20 случайно выбранных растений, затем полученные данные обрабатывались на компьютере.

Вся работа с микробиологическим материалом производилась в стерильных условиях (ламинар), использовавшиеся инструменты подвергались стерилизации или были одноразовыми.

Химический анализ почв состоял из измерения рН и качественных реакций на некоторые ионы. Значение рН водной вытяжки почвы, разведенной в 100 раз, измерялось с помощью

pH-метра. Качественные капельные реакции проводились на ионы SO_4^{2-} (с BaCl_2 , качественное изменение – выпадение белого осадка BaSO_4), Cl^- (с AgNO_3 , качественное изменение – выпадение белого осадка AgCl), NO_3^- (с дифениламином $(\text{HN}(\text{C}_6\text{H}_5)_2)$, качественное изменение – появление синей окраски), Pb^{2+} (с KI , качественное изменение – выпадение желтого осадка PbI_2), CO_3^{2-} (с HCl , качественное изменение – выделение газа CO_2), Cu^{2+} (с желтой кровавой солью $(\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6])$, качественное изменение – выпадение красно-бурого осадка $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), Fe^{3+} (с желтой кровавой солью $(\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6])$, качественное изменение – выпадение синего осадка берлинской лазури). Для реакций использовались разведения $\times 5$.

Механический состав почвы был оценен согласно описанной методике.

Результаты

1. Результаты химического анализа

Проба	pH
Клевер	6,59
Клевер и злаки	6,27
Злаки 1	6,50
Злаки 2	6,79
Ель	4,81
Сосна	5,96
Город	6,82

Таблица 2. pH почв

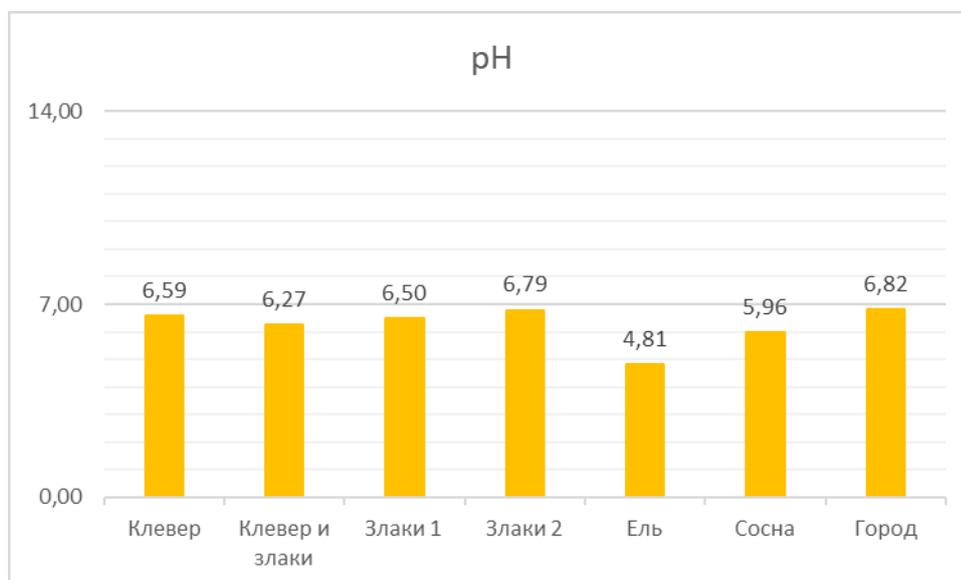


Рис. 7. Диаграмма pH почв

	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	Pb ²⁺	CO ₃ ²⁻	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Мех. Состав
Клевер	М	М	+	-	-	-	-	Среднесуглинистый
Клевер и злаки	-	-	-	-	М	-	-	Среднесуглинистый
Злаки 1	-	-	-	-	М	-	-	Среднесуглинистый
Злаки 2	М	-	+	-	М	-	-	Среднесуглинистый
Ель	-	-	М	-	М	-	-	Песчаный
Сосна	-	-	М	-	М	-	-	Песчаный
Город	+	-	+	-	М	-	-	Песчаный

Таблица 3. Результаты капельных реакций («+» – обнаружено, «-» – не обнаружено, «М» – на пределе обнаружения), механический состав исследуемых почв

2. Культивирование бактерий



Рис.8. Полученные колонии (увеличение x40). Заметно коричневое окрашивание колоний.



Рис. 9. Процент зарастания колониями чашки Петри

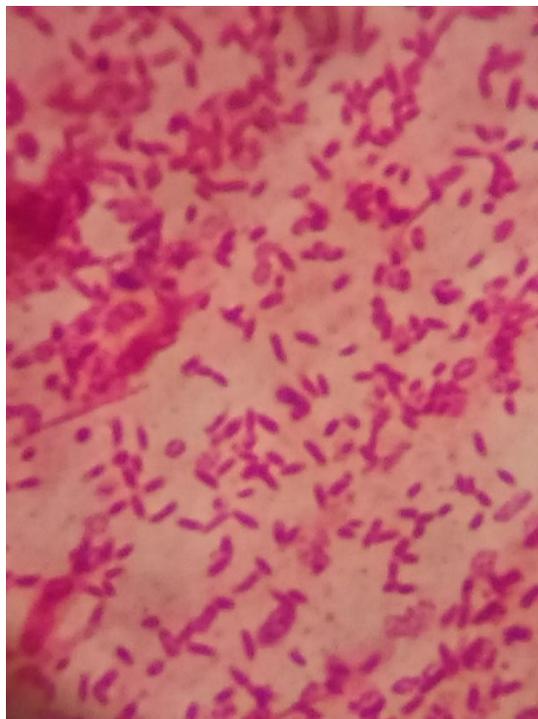


Рис. 10. Полученные бактерии (окраска по Граму, масляная иммерсия, увеличение x1000). Розовый цвет свидетельствует о том, что полученные бактерии – грамотрицательные

3. Обработка зеленных культур

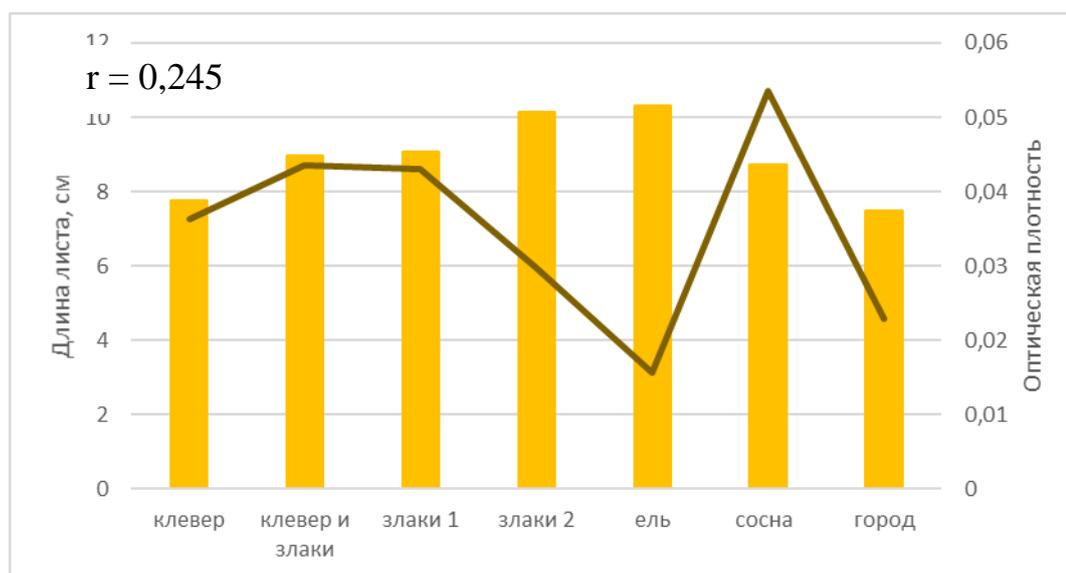


Рис. 11. Средняя длина третьего листа салата, обработанного культурой бактерий, и оптическая плотность этой культуры. r – корреляция величин

Обсуждение

Полученные из почв азотфиксирующие бактерии по морфологическим признакам (коричневый цвет колонии окраска по Граму) могут быть идентифицированы как *Azotobacter chroococcum*, однако различия в морфологии колоний и количестве колоний, выросших при одинаковых условиях и времени культивации, свидетельствуют о том, что для каждого образца почвы характерны свои штаммы бактерий. Корреляция между оптической плотностью культуральной жидкости и длиной третьего листа салата, ей обработанного, является незначительной, из чего следует, что концентрация бактерий в среде не влияет на рост этой культуры, а значит, различные штаммы бактерий имеют различную эффективность.

Заключение

Необходимые для сельскохозяйственных культур растворимые формы азота могут быть внесены в почву разными способами, одним из которых является использование азотфиксирующей активности бактерий. В ходе данной работы из почв Московской области были выделены свободноживущие азотфиксирующие бактерии, идентифицированные как *Azotobacter chroococcum*. Показано, что в различных образцах почв содержатся отличающиеся друг от друга штаммы, по-разному влияющие на рост растений.

Выводы

В результате работы были отобраны 7 образцов почв, различающиеся по своему химическому и механическому составу, антропогенной нагрузке, из которых были выделены азотфиксирующие бактерии, оказавшиеся *Azotobacter chroococcum*. Была получена культуральная жидкость данных бактерий, которой были обработаны семена зеленой культуры (салата). Этот эксперимент в совокупности с описанием культур бактерий показывает, что почвы Московской области содержат различные штаммы бактерий, различающихся своими морфологическими характеристиками и влиянием на растения.

Список литературы

- [1] Чернова Н. М. , Былова А. М. Общая экология. : Дрофа, 2004. – 416 с.
- [2] Биология. 10-11 классы: учеб. для общеобразоват. организаций: углубл. уровень: в 2. ч., ч. 1/ [П. М. Бородин, Л. В. Высоцкая, Г. М. Дымшиц и др.] под ред. В. К. Шумного и Г. М. Дымшица. – М. : Просвещение, 2014. – 303 с.
- [3] Азот [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/азот> (дата обращения: 10.01.2021).
- [4] Азотфиксация [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Азотфиксация> (дата обращения: 10.01.2021).
- [5] Биология: в 3-х т. Т. 1.: Пер. с англ./ [Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор] под ред. Р. Сопера. – М.: Мир, 1993. – 368 с., ил.
- [6] The Microbial World: The Nitrogen cycle and Nitrogen fixation. Produced by Jim Deacon [Электронный ресурс]: <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/nitrogen.htm> (дата обращения: 10.01.2020)
- [7] Азотистые удобрения [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Азотистые_удобрения (дата обращения: 10.01.2021).
- [8] Бактериальные удобрения [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Бактериальные_удобрения (дата обращения: 10.01.2021).
- [9] Виноградский С.Н. Об усвоении свободного азота атмосферы микробами // Архив биологических наук. 1895. Т. 3. Вып. 4.
- [10] Красильников М.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения, Изд. АН СССР, М. 1958, 463 с.
- [11] Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв, М. ИКЦ «Академкнига», 2002, 282 с.
- [12] Логинов О.Н. Бактерии Pseudomonas и Azotobacter как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 2005, - 166 с.
- [13] Методические рекомендации и инструкции по применению набора «Охотник за микробами»
- [14] Азотобактер [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Азотобактер> (дата обращения: 10.01.2021).
- [15] Я. Денисов. Одиссея азота. [Электронный ресурс]: Биомолекула. – URL <https://biomolecula.ru/articles/odisseia-azota> (дата обращения: 10.01.2021).
- [16] Лекции по курсу «Физиология микроорганизмов». Лектор доцент Лысак В.В. http://www.bio.bsu.by/microbio/kursy_physiology_of_microorganisms.html Тема 4 – фиксация молекулярного азота
- [17] Отбор почв [Электронный ресурс]: Аналитический центр МГУ им. М. В. Ломоносова – URL: <https://eco.chem.msu.ru/proto/help-info.pdf> (дата обращения: 10.01.2021).
- [18] Капельный анализ [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Капельный_анализ (дата обращения: 10.01.2021).

- [19] Метод Грама [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Метод_Грама (дата обращения: 10.01.2021).
- [20] Государственная фармакопея СССР. XI изд. Выпуск 1/ Министерство здравоохранения СССР. М.: «Медицина», 1987. – С. 32-33
- [21] OD600 [Электронный ресурс]: Производитель спектрофотометров «Implen» – URL: <https://www.implen.de/od600-diluphotometer/od600/> (дата обращения: 10.01.2021).
- [22] ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. [Электронный ресурс]: Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации – URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-17-4-4-02-84> (дата обращения: 10.01.2021).
- [23] Описание программы WebPlotDigitizer [Электронный ресурс]: WebPlotDigitizer – URL: <https://automeris.io/WebPlotDigitizer/> (дата обращения: 10.01.2021).