

ПРИМЕНЕНИЕ САПРОПЕЛЯ ДЛЯ АКТИВАЦИИ ПОЧВЕННЫХ ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

А. Ф. МИНАКОВСКИЙ, О. С. ИГНАТОВЕЦ, В. И. ШАТИЛО, Д. С. СЕРГИЕВИЧ

УО «Белорусский государственный технологический университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

В. Н. БОСАК

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407, e-mail: bosak1@tut.by

(Поступила в редакцию 04.04.2020)

Фосфор относится к основным питательным макроэлементам, которые обеспечивают рост и развитие растений, ускорение образования репродуктивных органов и созревание растений, формирование высоких и устойчивых урожаев сельскохозяйственных культур с благоприятным качеством товарной продукции. Фосфор участвует практически во всех основных метаболических процессах в растении. Наибольшую питательную ценность для сельскохозяйственных культур имеют легкоусвояемые соединения фосфора из почвы и удобрений.

Одним из перспективных направлений улучшения фосфорного питания сельскохозяйственных культур является биологическая фосфатмобилизация с помощью автохтонных почвенных микроорганизмов, способствующая переводу трудно-растворимых соединений фосфора из почвы и удобрений в доступные для культурных растений формы.

В совместных исследованиях УО «Белорусский государственный технологический университет» и УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия» отобраны и определены наиболее активные штаммы автохтонных почвенных фосфатмобилизующих микроорганизмов, а также изучена возможность применения различных типов сапропеля для активации их деятельности.

В результате совместных исследований установлено, что из выделенных из почвы 16 штаммов различных групп фосфатмобилизующих микроорганизмов лучшей фосфатмобилизующей способностью обладали штаммы M8.1, M10 и M16.1. Выделенные штаммы микроорганизмов относятся к широко распространенным почвенным бактериям родов *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp.

В качестве источника углерода для культивирования фосфатмобилизующих микроорганизмов наряду с другими органическими источниками может использоваться также сапропель. Концентрация карбонатного сапропеля в культуральной жидкости в размере 3% была оптимальной для поддержания высокой фосфатмобилизующей активности почвенных бактерий.

Ключевые слова: фосфор, биологическая фосфатмобилизация, почвенные микроорганизмы, сапропель.

Phosphorus is one of the main macronutrients that ensure the growth and development of plants, accelerate the formation of reproductive organs and the maturation of plants, the formation of high and sustainable crop yields with favorable quality of marketable products. Phosphorus is involved in almost all major metabolic processes in the plant. Easily digestible phosphorus compounds from soil and fertilizers have the greatest nutritional value for crops.

One of the promising directions for improving the phosphorus nutrition of crops is biological phosphate mobilization using autochthonous soil microorganisms, which contributes to the conversion of insoluble phosphorus compounds from soil and fertilizers to forms available for cultivated plants.

*In joint studies of Belarusian State Technological University and Belarusian State Agricultural Academy, the most active strains of autochthonous soil phosphate mobilizing microorganisms were selected and identified, and the possibility of using various types of sapropel to activate their activities was studied. As a result of joint research, it was found that of the 16 strains of various groups of phosphate mobilizing microorganisms isolated from the soil, strains M8.1, M10 and M16.1 had the best phosphate mobilizing ability. The isolated microorganism strains belong to the widespread soil bacteria of the genera *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.*

Sapropel can also be used as a carbon source for the cultivation of phosphate mobilizing microorganisms along with other organic sources. The concentration of carbonate sapropel in the culture fluid in the amount of 3 % was optimal for maintaining high phosphate mobilizing activity of soil bacteria.

Key words: phosphorus, biological phosphate mobilization, soil microorganisms, sapropel.

Введение

Фосфор, наряду с азотом и калием, относится к важнейшим макроэлементам, используемым для роста и развития растений. Фосфор содержится в клеточной протоплазме, входит в состав хромосом, нуклеиновых кислот, фосфатидов, некоторых витаминов, эфира, фитина, других органических веществ и участвует практически во всех основных метаболических процессах растений, включая фотосинтез и дыхание, передачу и запасание энергии, молекулярный биосинтез и трансдукцию сигналов, а также фиксацию азота в бобовых культурах [1–3].

Несмотря на то, что фосфор содержится в почвах в неорганических и органических формах в достаточном количестве (содержание валового фосфора в дерново-подзолистых почвах составляет от

0,06 до 0,16 %), он является лимитирующим фактором роста растений, поскольку преимущественно находится в труднодоступных для растений соединениях.

Классическим методом повышения концентрации легкодоступного водорастворимого фосфора в зоне ризосферы сельскохозяйственных растений является внесение фосфорных удобрений в виде растворимых солей ортофосфорной кислоты. Однако водорастворимые фосфорные удобрения имеют высокую себестоимость, которая обусловлена использованием импортного сырья, а также больших количеств серной и азотной кислот при их переработке [4–9].

Самым дешевым фосфорным удобрением является фосфоритная мука, получаемая из низкопроцентных фосфоритов путем размола фосфорита до состояния тонкой муки. Фосфор в ней содержится в виде соединений фторапатита, гидроксилapatита, карбонатапатита (находится в основном в форме трехкальциевого фосфата $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Эти соединения не растворимы в воде и слабых кислотах и слабо доступны для большинства растений [3].

Наиболее выгодным и экологически безопасным приемом активации низкосортных фосфоритов является применение микроорганизмов, способных высвобождать фосфаты из низкосортных фосфоритов в почвенный раствор в пределах ризосферной зоны сельскохозяйственных культур [10–18].

Способность к мобилизации труднодоступного фосфата характерна для широкого круга почвенных микроорганизмов, таких как аэробные, анаэробные и факультативно анаэробные грамположительные и грамотрицательные бактерии, в основном с палочкообразной формой клетки, спорообразующие и аспорогенные, а также грибы, психротолерантные и психрофильные.

Для культивирования микроорганизмов необходим источник углерода (например глюкоза или сахараза в среде Муромцева для культивирования фосфатмобилизующих бактерий). В качестве источника углерода наряду с другими органическими источниками может использоваться и сапрпель – донные отложения пресноводных водоемов, ресурсы которого в Республике Беларусь достаточно высоки [3, 19–23].

В различных типах сапрпелей (органический, карбонатный, кремнеземистый, смешанный) можно выделить три составляющие компонента: органическую, минеральную, а также биологически активную, которые взаимодействуют друг с другом.

Органическое вещество сапрпели представляет собой совокупность растительных и животных остатков, а также продуктов их распада. В его состав входят продукты гидролиза биополимеров, полимерные соединения, образовавшиеся в процессе биотической и абиотической деструкции, продукты синтеза органических веществ, а также продукты жизнедеятельности микроорганизмов – витамины и другие биологически активные вещества.

Органическое вещество сапрпели, характеризуется низким содержанием углерода (6–47 %) и достаточно высоким содержанием кислорода (23–39 %). В то же время в сравнении с торфом, органическое вещество сапрпелей отличается повышенным содержанием азота (4–6%) и водорода (5–9 % масс.). Групповой состав органического вещества сапрпели представлен битумоидами, гуминовыми веществами, легкогидролизуемыми (углеводный комплекс) и трудногидролизуемыми (целлюлозные и лигнинные компоненты) веществами, негидролизуемым остатком.

Биологически активный компонент сапрпели включает в себя целый комплекс разнообразных веществ: азотистые и гормоноподобные соединения, ферменты, каротины, пигменты, органические кислоты и спирты и др.

В минеральной компоненте сапрпелей содержатся SiO_2 и CaO , а также соединения железа, магния, калия, алюминия, серы, фосфора и других макроэлементов и микроэлементов.

Цель исследования – изучить возможность применения сапрпели в качестве источника углерода для активации деятельности фосфатмобилизующих микроорганизмов.

Основная часть

Исследования по изучению применения сапрпели в качестве источника углерода для активации деятельности фосфатмобилизующих микроорганизмов проводили в совместных исследованиях УО «Белорусский государственный технологический университет» и УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия» на протяжении 2019–2020 гг.

В качестве источников нерастворимых соединений фосфора использовали Вятско-Камский фосфорит (Россия), содержащий 23,0 % мас. P_2O_5 и фосфорит месторождения Хурибга (Марокко), содержащий 31,6 % мас. P_2O_5 .

В качестве образцов сапрпелей были отобраны образцы двух основных типов: кремнеземистый (озеро Дикое, Петриковский район) и карбонатный (месторождение Дитва, Лидский район).

Выделение фосфатмобилизирующих бактерий проводили из ризосферы растений, растущих на бедных дерново-подзолистых почвах. Выбор места отбора проб вызван присутствием в таких почвах большого количества нерастворимых фосфатов в минеральной и органической форме, что обуславливает наличие разнообразных фосфатмобилизирующих микроорганизмов в отобранных пробах почвы. Всего в ходе эксперимента исследовано три пробы почв.

Для выделения преимущественно фосфатмобилизирующих бактерий использовали главный селективный фактор – отсутствие в питательной среде водорастворимых фосфатов, что обуславливает преимущественное развитие микроорганизмов, способных переводить нерастворимые фосфаты в растворимую форму. Для создания селективных условий при выделении в качестве единственного источника фосфора использовали фосфатную руду Вятско-Камского месторождения, отмытую от водорастворимых фосфатных примесей.

Выделение почвенных бактерий производили высевом методом Коха почвенной суспензии на питательный агар из разведения 10^{-5} , инкубировали 24 часа при температуре 30 °С [24–25].

Применение питательного агар-агара обусловлено полноценностью данной среды. Его состав обеспечивает питательные потребности большинства бактерий. Однако при высевах колоний выделенных бактерий с питательного агара на глюкозо-аммонийную среду некоторые бактерии совсем не образовывали колоний или наблюдался замедленный рост выделенных культур, что обусловлено наличием в питательном агаре водорастворимого фосфата. Кроме того, использование питательного агара затрудняет выявление наличия гало вокруг колоний. Поэтому в дальнейших исследованиях была использована ГАА среда, в которой фосфор был представлен только в виде фосфата кальция.

В результате исследований на первом этапе было выделено и расчищено 16 штаммов бактерий.

На следующем этапе произвели отбор наиболее активных фосфатмобилизирующих бактерий и произвели оценку их активности, при высевах на поверхность плотной среды, содержащей фосфат кальция. При этом степень фосфатмобилизирующей активности определяли по индексу растворимости фосфата.

На основе индекса растворимости фосфата, выделенные почвенные бактерии разделили на две группы. К первой группе относятся бактерии, которые показали индекс растворимости фосфата более 1,5, таких оказалось 8 штаммов. Остальные относятся ко второй группе, у них индекс растворимости фосфата <1,5 или вовсе не определился.

Наибольший интерес для дальнейших исследований представляли бактерии, относящиеся к первой группе. Индекс растворимости фосфата представлен в табл. 1.

Таблица 1. Результат оценки активности фосфатмобилизирующих бактерий

Номер штамма	Диаметр «бляшки», d_{61} , мм	Диаметр гало, d_r , мм	Индекс растворимости фосфата d_r/d_{61}
M1.1	6	16,8	2,8
M1.2	10	17,0	1,7
M1.3	5	8,0	1,6
M5	7	10,0	1,4
M6	7	12,0	1,7
M8.1	5	21,0	4,3
M8.2	7	10,0	1,4
M10	5	24,0	4,8
M12.1	5	6,4	1,3
M12.2	6	10,2	1,7
M16.1	5	20,0	4,0

Результаты исследований показали, что наиболее активными фосфатмобилизаторами оказались штаммы M8.1, M10 и M16.1.

Для характеристики выделенных фосфатмобилизирующих бактерий произвели исследования включающие окраску по Граму, изучение морфологии и культуральных признаков.

Согласно данным исследования морфологии клеток и культуральных признаков, выделенные фосфатмобилизирующие бактерии можно отнести к разным группам микроорганизмов, что свидетельствует о широкой распространенности фосфатмобилизирующей активности среди почвенных бактерий.

Более точным методом определения фосфатмобилизирующей активности бактерий является метод, заключающийся в культивировании фосфатмобилизирующих бактерий в жидкой среде в присутствии сырья, содержащего минеральный фосфор и определении накопления фосфата в культуральной жидкости, на основе спектрофотометрического метода [26].

В табл. 2 представлены результаты исследования динамики накопления фосфата в жидкой среде под действием наиболее активных фосфатмобилизирующих бактерий. В качестве источника нерастворимого фосфата использовали Вятско-Камскую фосфоритную муку.

Таблица 2. Динамика накопления фосфата в жидкой среде наиболее активными штаммами фосфатмобилизирующих бактерий

Номер штамма	Концентрация фосфата в КЖ С(PO ₄ ⁻³), ммоль/л		
	1 день	3 день	5 день
Контроль	0,013	0,122	0,309
<i>Pseudomonas sp.</i> M1.1	0,151	0,675	0,932
<i>Pseudomonas sp.</i> M8.1	0,883	1,527	2,848
<i>Bacillus sp.</i> M10	0,987	3,536	–
<i>Bacillus sp.</i> M16.1	0,632	2,084	–

Во всех случаях в ходе культивирования проб для определения динамики накопления фосфата наблюдали подкисление культуральной жидкости: от нейтральной в первый день до pH 4,6–5,7 в пятый день, что свидетельствует о возможном участии органических кислот в процессе мобилизации фосфата из фосфоритов.

На пятый день культивирования штаммов M10 и M16.1 невозможно было измерить показания оптической плотности культуральной жидкости в смеси с реактивом, так как даже при разведении образца в 4 раза наблюдалось выпадение осадка, что делало применение спектрофотометрического метода для измерения непригодным.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что из выделенных и исследованных бактерий наибольшей фосфатмобилизирующей активностью обладают штаммы M8.1, M10 и M16.1, относящиеся к широко распространенным почвенным бактериям таких родов, как *Bacillus sp.* и *Pseudomonas sp.*

Для подбора оптимальных условий культивирования бактерий, способных осуществлять перевод нерастворимого фосфора в подвижный, а также последующем выявлении концентрации сапропеля, при которой наблюдается ингибирование роста, в качестве тест-культуры был выбран штамм *Bacillus sp.* M10 как самый активный, на основании данных, полученных при первичном анализе фосфатмобилизирующей активности.

Выбор вида используемого сапропеля начали с изучения влияния данного источника углерода на рост наиболее активного штамма бактерий. Для этого провели эксперимент с добавлением в синтетическую среду GAA сапропелей каждого вида в концентрации 5 %.

Как показали результаты исследований, использование кремнеземистого сапропеля месторождения озеро Дикое приводило к небольшому угнетению роста бактерий *Bacillus sp.* M10, что обусловило выбор в пользу карбонатного сапропеля месторождения Дитва. Полученные результаты хорошо согласуются с компонентным составом сапропелей, где было установлено, что сапропели озера Дикое содержат большую концентрацию железа, что может являться ингибирующим фактором по отношению к бактериям.

Изучение оптимальных концентраций сапропеля месторождения Дитва, не вызывающих ингибирования тест-бактерий, а значит, способных выступать в данных концентрациях в качестве источника углерода для культивирования бактерий показало, что лучшие показатели получены при концентрации сапропеля от 1 до 5 % (табл. 3).

Таблица 3. Зависимость концентрации бактерий от концентрации сапропеля

Концентрация сапропеля в суспензии, %	Концентрация бактерий, КОЕ/мл
0	$1,1 \cdot 10^8$
1	$(2,6 \pm 1,0) \cdot 10^8$
2	$(3,4 \pm 1,2) \cdot 10^7$
3	$(5,2 \pm 0,8) \cdot 10^7$
4	$(8,9 \pm 1,1) \cdot 10^7$
5	$(5,4 \pm 2,0) \cdot 10^7$
10	$(4,0 \pm 1,2) \cdot 10^7$

Дальнейшее изучение различных концентраций (1–5%) сапропеля показало, что в культурах со всеми концентрациями сапропеля наблюдается увеличение концентрации фосфата в течении времени культивирования и она выше, чем концентрация фосфата в контрольной пробе без тест-культуры (табл. 4).

Таблица 4. Динамика накопления фосфата в оптимизированной среде с сапропелем

Концентрация сапропеля, %	Концентрация фосфата в КЖ С(PO ₄ ³⁻), ммоль/л			Концентрация клеток, КОЕ/мл
	1 день	3 день	5 день	
K ₁	0,072	0,078	0,074	–
K ₂	0,190	0,192	0,192	–
K _г	0,980	1,219	1,415	(1,6±0,3)·10 ⁸
1	0,051	0,053	0,060	(1,3±0,2)·10 ⁸
2	0,153	0,150	0,155	(1,0±0,1)·10 ⁸
3	0,177	0,179	0,181	(2,6±0,4)·10 ⁸
4	0,126	0,127	0,130	(1,7±0,9)·10 ⁸
5	0,144	0,149	0,153	(1,6±1,2)·10 ⁸

При этом результаты получились несколько ниже по сравнению с результатами для штамма M10, культивированного в среде с глюкозой в качестве источника углерода. Однако ингибирования роста бактерий не наблюдалось, а при концентрации сапропеля 3 %, напротив, концентрация жизнеспособных клеток возросла, что свидетельствует о пригодности сапропеля как источника углерода для культивирования фосфатмобилизирующих бактерий.

Заключение

Применение почвенных фосфатмобилизирующих микроорганизмов для мобилизации труднодоступных соединений почвы и удобрений в доступные формы является перспективным направлением оптимизации фосфорного питания растений.

В результате исследований выделено 16 штаммов различных групп фосфатмобилизирующих микроорганизмов, что свидетельствует о широкой распространенности фосфатмобилизирующей активности среди автохтонных почвенных бактерий.

Лучшей фосфатмобилизирующей способностью обладали штаммы M8.1, M10 и M16.1, которые относятся к широко распространенным почвенным бактериям родов *Bacillus sp.* и *Pseudomonas sp.*

Для культивирования фосфатмобилизирующих микроорганизмов в качестве источника углерода может быть использован карбонатный сапропель с концентрацией 3%, которая является оптимальной для поддержания высокой фосфатмобилизирующей активности бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вильдфлуш, И. Р. Фосфор в почвах и земледелии Беларуси / И. Р. Вильдфлуш, А. Р. Цыганов, В. В. Лапа. – Минск: Хата, 1999. – 196 с.
2. Выделение и характеристика почвенных фосфатмобилизирующих микроорганизмов / Н. А. Белясова, О. С. Игнатовец, Д. С. Сергиевич, А. Ф. Минаковский, В. Н. Босак, Т. В. Сачивко // Вестник БГСХА. – 2018. – № 2. – С. 93–97.
3. Справочник агрохимика / В. В. Лапа, Н. И. Смеян, И. М. Богдевич [и др.]; Ин-т почвоведения и агрохимии. – Минск: Белорусская наука, 2007. – 390 с.
4. Босак, В. Н. Оптимизация питания растений / В. Н. Босак. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 203 с.
5. Босак, В. Н. Фосфатный и калийный режим дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы при длительном применении удобрений в зернотравяном севообороте / В. Н. Босак, О. Ф. Смеянович, Е. С. Малей // Почвоведение и агрохимия. – 2005. – № 2. – С. 102–106.
6. Рекомендации по оптимизации фосфорного и калийного статуса пахотных почв в зависимости от уровня интенсификации земледелия по областям и районам Беларуси / И. М. Богдевич, В. В. Лапа, И. Д. Шмигельская и др.; Ин-т почвоведения и агрохимии. – Минск, 2008. – 28 с.
7. Смеянович, О. Применение удобрений в севообороте / О. Смеянович, В. Босак. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2013. – 108 с.
8. Смеянович, А. Ф. Фасфатны і калійны рэжым дзярнова-падзолістай лёгкасуглінкавай глебы ў залежнасці ад умоў жыццелення / А. Ф. Смеянович, В. М. Босак // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2008. – № 2. – С. 26–30.
9. Bosak, V. Changes of potassium and phosphorus content of Podzoluvisol in long-term experiment on fertilizer application / V. Bosak, A. Smeyanovich // Archives of Agronomy and Soil Science. – 2003. – Vol. 49. – P. 101–103.
10. Агроэкономическая эффективность применения минеральных удобрений и Фитостимифоса при возделывании сельскохозяйственных культур / В. Н. Босак, В. В. Скорина, З. М. Алещенкова и др. // Вестник БГСХА. – 2011. – № 1. – С. 76–79.
11. Босак, В. Н. Применение бактериальных препаратов при возделывании зернобобовых культур / В. Н. Босак // Научные труды Академии управления при Президенте Республики Беларусь. – 2015. – Вып. 17. – С. 46–52.
12. Влияние различных форм фосфорных удобрений на фосфатный и микробиологический режимы почвы / А. Ф. Минаковский, В. И. Шатило, В. Н. Босак, Т. В. Сачивко, Д. С. Сергиевич, Е. Ю. Смушь // Технологические аспекты возделывания сельскохозяйственных культур. – Горки: БГСХА, 2019. – С. 184–188.
13. Кошман, М. Е. Особенности применения минеральных удобрений и биопрепарата фитостимифос при возделывании томата / М. Е. Кошман, В. Н. Босак // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2015. – № 41. – С. 40–43.
14. Особенности фосфатмобилизирующей способности почвенных микроорганизмов / А. Ф. Минаковский, О. С. Игнатовец, В. И. Шатило, В. Н. Босак, Т. В. Сачивко // Технологические аспекты возделывания сельскохозяйственных культур. – Горки: БГСХА, 2020. – С. 265–267.

15. Пуронен, С. В. Выделение активных культур фосфатмобилизирующих микроорганизмов из ризосферы / С. В. Пуронен, А. М. Жусупова, О. А. Тен // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – №3. – С. 77–82.
16. Способ оптимизации фосфатного режима почвы при возделывании сельскохозяйственных культур / В. Н. Босак, Г. В. Сафронова, З. М. Алещенкова, О. Н. Минюк // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2016. – Т. 8. – С. 148–162.
17. Фосфатный режим почвы и урожайность растений в зависимости от применения удобрений / В. Н. Босак, А. Ф. Минаковский, В. И. Шатило, Т. В. Сачивко, Д. С. Сергиевич // Инновационная деятельность науки и образования в агропромышленном комплексе. – Курск: КГСХА, 2019. – Ч. 1. – С. 62–66.
18. Deepshikha, T. Phosphate solubilising microorganisms: role in phosphorus nutrition of crop plants / T. Deepshikha, K. Rajesh, S. Vineet // *Agricultural Review*. – 2014. – Vol. 35. – P. 159–171.
19. Босак, В. Н. Органические удобрения / В. Н. Босак. – Пинск: ПолесГУ, 2009. – 256 с.
20. Босак, В. Н. Сапропель в Беларуси / В. Н. Босак, Б. В. Курзо // *Наше сельское хозяйство*. – 2012. – № 8. – С. 45–49.
21. Инструкция по использованию сапропеля в сельскохозяйственном производстве / Н. Н. Бамбалов, В. В. Лапа, В. Н. Босак и др. – Минск: БелНИВНФХ в АПК, 2007. – 30 с.
22. Курзо, Б. В. Закономерности формирования и проблемы использования сапропеля / Б. В. Курзо. – Минск: Белорусская наука, 2005. – 224 с.
23. Макаренко, Т. И. Технологии производства сапропелевых удобрений для органического сельского хозяйства (на примере Кличевского района Могилевской области) / Т. И. Макаренко, Б. В. Курзо, О. М. Гайдукевич, Т. М. Серая // *Главный агроном*. – 2019. – № 7. – С. 12–14.
24. Звягинцев, Д. Г. Биология почв / Д. Г. Звягинцев, И. П. Бабьева, Г. М. Зенова. – Москва: Изд-во МГУ, 2005. – 328 с.
25. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильников, Г. И. Переверзева. – Москва: ООО «Дрофа», 2004. – 256 с.
26. Kucey, R. M. N. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils / R. M. N. Kucey // *Can. J. Soil Sci.* – 1983. – Vol. 63. – P. 671–678.