

На правах рукописи

ЭМЕР НАТАЛЬЯ РУДОЛЬФОВНА

**Структурно-функциональные особенности групп микроорганизмов цикла азота в почвах с длительным применением минеральных удобрений**

Специальность – 03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

- Научный руководитель:** Нетрусов Александр Иванович,  
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.
- Официальные оппоненты:** Ананьева Надежда Дмитриевна,  
доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение науки «Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской академии наук», главный научный сотрудник.
- Кравченко Ирина Константиновна,  
кандидат биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», ведущий научный сотрудник.
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева»

Защита состоится «24» мая 2016 г. в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

Тел.8 (495) 939-54-83, эл. почта [npiskunkova@rambler.ru](mailto:npiskunkova@rambler.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Пискункова Нина Федоровна

## I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Нарастающие потребности интенсификации сельскохозяйственного производства являются причиной масштабной и активной эксплуатации почв в аграрном секторе. Интенсивное возделывание почв агросистем, сопровождающееся мощным механическим и химическим воздействием, существенно модифицирует почвенное микробное сообщество (Leff et al., 2015; Sun et al., 2004) изменяя и даже нивелируя его роль в саморегуляции почвенной системы (Barrioux, 2007). Поскольку большинство микроорганизмов, осуществляющих ключевые реакции глобальных циклов биогенных элементов, являются представителями почвенной микробиоты, сельскохозяйственная практика, несомненно, вносит изменения в интенсивность и направленность этих процессов (Acoste-Martinez et al., 2010). В первую очередь это касается этапов глобального цикла азота, которые протекают в почве (Hofman et al., 2004; Myrold, 2002). Структурно-функциональные характеристики физиологических групп почвенных микроорганизмов, участвующих в трансформации азота, являются отражением процессов, протекающих в почвенной системе (Bannert et al., 2011; Cheneby et al., 2010; Peralta et al., 2010), и могут служить источником важной информации о появлении и развитии деструктивных процессов в данной экосистеме.

Тесная взаимосвязь различных этапов цикла азота является причиной необходимости проведения обширных сопряженных исследований для выявления структурных или функциональных особенностей физиологических групп микроорганизмов цикла азота. Вместе с тем, требуется постановка длительных непрерывных экспериментов, направленных на изучение динамики составляющих его процессов, и микроорганизмов, участвующих в его осуществлении. Даже на сегодняшний день комплексные исследования в этой области, учитывающие данные особенности, насчитывают лишь единичные работы. Еще реже встречаются исследования, направленные на поиск индикаторов состояния почвенной экосистемы, опирающихся на структурные или функциональные характеристики физиологических групп азотфиксаторов, денитрификаторов или аммонификаторов. Неоднократное упоминание в научной литературе о том, что процессы денитрификации и азотфиксации, являющиеся связующими звеньями внутрпочвенного и глобального циклов азота, могут служить интегральными показателями состояния почвенной экосистемы, не сопровождается подробными рекомендациями относительно использования этих показателей в природоохранной, сельскохозяйственной практике, а также в целях почвенной ремедиации и т.п.

**Цель диссертационной работы** – изучение структурно-функциональных особенностей микробных сообществ и отдельных физиологических групп микроорганизмов, участвующих в процессах трансформации азота в почвах залежи и интенсивно возделываемого поля.

**Задачи исследования:**

1. Провести оценку динамики потенциальной и актуальной активностей процессов, являющихся интегральными показателями функционирования микробного сообщества в почвах залежи и интенсивно обрабатываемого поля.
2. Провести сравнительный анализ структурных характеристик микробных сообществ почв залежи и поля на основании результатов молекулярно-биологических исследований (ДГГЭ-анализ).
3. Провести сопряженную оценку динамики потенциальной и актуальной активностей процессов азотфиксации, денитрификации и аммонификации с учетом динамики численности соответствующих групп микроорганизмов в почвах залежи и обрабатываемого поля.
4. Оценить резистентность почвенных систем залежи и поля по специфическим (азотфиксация, денитрификация) и интегральным (дыхание, гидролиз флуоресцеин диацетата) показателям функционирования микробных сообществ.
5. Оценить спектры трофических возможностей микробных сообществ почв залежи и поля по показателям мультиреспираторного теста.

**Научная новизна.** Впервые для серых лесных почв умеренного климата, находящихся под влиянием интенсивной агротехнологии, изучена длительная ежесуточная динамика активности и численности физиологических групп микроорганизмов, участвующих в цикле азота, и проведен сравнительный анализ структурно-функциональных особенностей физиологических групп азотфиксаторов, денитрификаторов и аммонификаторов, а также микробных сообществ в целом, для двух почвенных систем: интенсивно возделываемой с длительным применением минеральных удобрений и необрабатываемой – залежной. Предложен метод анализа результатов ДГГЭ с применением классического экологического подхода оценки биоразнообразия к распределению дискретных таксономических единиц – риботипов. Сопряженное использование микробиологического, биохимического и структурного анализов в отношении динамических характеристик почвенного микробного сообщества и отдельных физиологических групп микроорганизмов – участников цикла азота в почве – выявило глубокие изменения в почвенной системе, находящейся под воздействием интенсивной обработки, которые не выявляются при использовании современных эколого-

микробиологических походов к формализации данных лишь на основе оценки устойчивости экосистем.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты исследования углубляют представления о динамике процессов цикла азота в почвах типа *серые лесные* с различной историей развития почвенных экосистем; представляют наглядную информацию о структурно-функциональных особенностях как отдельных физиологических групп микроорганизмов, принимающих участие в трансформации азотсодержащих веществ почвы, так и микробного сообщества в целом; являются надежным основанием для выбора формальных индикаторных показателей, используемых для экологической оценки устойчивости почвенных систем.

Количественные оценки динамики активности процессов азотфиксации и денитрификации могут служить основой для разработки документации природоохранного характера и при оценке воздействия на окружающую среду в зоне распространения серых лесных почв.

Материалы исследования могут быть использованы при проведении почвенно-микробиологического мониторинга, при оценке почв в качестве источника углекислого газа и закиси азота, а также при моделировании климатических изменений в регионах умеренного климата с распространением серых лесных почв; при моделировании процессов цикла азота в ненарушенной и нарушенной почвенных экосистемах.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на XX, XXI, XXII Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва 2013, Москва 2014, Москва 2015); Всероссийском конкурсе программы «Лифт в будущее» (Москва, 2013); Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии, и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2014); 5-м Всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2015).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем работы.** Диссертация включает введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, экспериментальные результаты и их обсуждение, выводы и список литературы (144 источника, из них 84 – зарубежные). Материалы диссертации изложены на 136 страницах текста, содержат 35 иллюстраций, 7 таблиц.

**Личный вклад автора.** Автор лично принимал участие на всех этапах подготовки и проведения работы: выборе пробных площадей, отборе проб, проведении анализов, математической обработке и интерпретации результатов.

**Обоснованность и достоверность результатов.** Все научные результаты и выводы получены с применением современных методик и оборудования и основываются на обширном экспериментальном материале. Достоверность результатов подтверждена статистическими методами обработки данных.

**Благодарности.** Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н. А.И. Нетрусову. Глубокую благодарность и признательность за всестороннюю помощь, ценные научные консультации и замечания выражаю д.б.н. М.М. Умарову. Искренне и бесконечно благодарю к.б.н. Н.В. Костину за неоценимую помощь в проведении всех этапов исследования. Выражаю глубокую благодарность д.б.н. П.А. Кожевину за возможность проведения широкого спектра значимых для исследования экспериментов, помощь и ценные рекомендации. Искренне благодарю к.б.н. М.В. Голиченкова за участие в проведении длительных исследований динамик и к.б.н. В.В. Демина за возможность проведения части исследовательской работы на базе лаборатории почвенного стационара МГУ имени М.В. Ломоносова. Искренне благодарю к.б.н. Е.А. Цавкелову и Л.А. Кошкарнову за помощь, внимание к работе и ценные рекомендации. Выражаю искреннюю благодарность д.б.н. А.М. Семенову, под научным руководством которого были проведены исследования длительных ежесуточных динамик, к.б.н. А.Л. Брюханову и к.б.н. В.А. Корнеевой за содействие при выполнении молекулярно-биологических исследований. Выражаю благодарность и признательность к.б.н. Н.Б. Зиняковой и руководству учебного центра «Миттлайдер агро» за возможность отбора материала. Искренне благодарю к.б.н. В.В. Зеленева, И.А. Бубнова, к.б.н. Н.Ф. Пискункову, к.б.н. М.А.Егорову, к.б.н. Е.С. Милько, к.б.н. Е.В.Семенову, В.Н. Федоренко, к.б.н. А.А. Осмоловского, Е.С. Звонареву, а также всех сотрудников кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

## **II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ЦИКЛ АЗОТА В ПОЧВЕ.**

В пяти разделах литературного обзора рассмотрены основные процессы, составляющие цикл азота, представлена характеристика физиологических групп микроорганизмов, участвующих в трансформации азота в почве, отмечены особенности физиологии бактерий и грибов, осуществляющих определенные реакции в процессах круговорота азота в почвенной системе, приведены имеющиеся на сегодняшний день данные об особенностях строения и функционирования ферментных систем микроорганизмов, выполняющих ключевые функции в процессах превращения азотсодержащих веществ. Описаны экологические факторы, влияющие на активность функционирования физиологических групп микроорганизмов, интенсивность протекания основных процессов цикла азота и направленность этих процессов в почве. Приведена таксономическая принадлежность представителей азотфиксаторов, аммонификаторов, денитрификаторов и нитрификаторов. Информация, представленная в обзоре литературы, также касается некоторых актуальных современных направлений исследований, связанных с использованием отдельных представителей микроорганизмов – участников цикла азота в сельскохозяйственной практике и той части природоохранной деятельности, которая связана со снижением химической нагрузки на окружающую среду.

### **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для проведения экспериментальной работы использовали серую лесную почву, образцы которой отбирали осенью 2012-2015 гг после уборки урожая на картофельном поле учебного центра «Миттлайдер агро» в п. Заокский Тульской области. Система земледелия Миттлайдера характеризуется интенсивным возделыванием почвы с ежегодным внесением минеральных удобрений по схеме N180P180K180. Продолжительность интенсивного использования почвы для возделывания культур в учебном центре – более 20 лет.

В качестве контрольной использовали почву участка залежи, расположенного на расстоянии около 100 м от поля. Возраст залежной почвы составляет более 20 лет. Почва покрыта густой травянистой растительностью, формирующей дерновый слой, который срезали и после отбора проб возвращали на прежнее место. Травянистую растительность участка залежи составляли пырей ползучий (*Elytrigia repens*), тысячелистник

обыкновенный (*Achillea millefolium*), земляника лесная (*Fragaria vesca*), лопух большой (*Arctium lappa*), чертополох поникающий (*Carduus nutans*) и др. Древесные представители – дуб черешчатый (*Quercus robur*) и береза повислая (*Betula pendula*).

Пробы отбирали с глубины 5–20 и 0–20 см для почвы залежи и поля соответственно. Образцы высушивали в сухом проветриваемом помещении, освобождали от корешков и просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм.

Основные агрохимические свойства исследуемых почв представлены в таблице 1 (Зинякова и др., 2013).

Таблица 1. Агрохимические свойства серой лесной почвы

Показатель	Залежь		Поле	
	Весна	Осень	Весна	Осень
C <sub>орг</sub> , (%)	1,35	2,01	1,30	1,24
pH <sub>KCl</sub>	4,9	4,5	5,1	5,2
N <sub>общ</sub> , (мг/100 г)	118	114	106	92
N <sub>мин</sub> , (мг/100 г)	2,7	1,2	4,2	2,1

*Определение актуальной активности азотфиксации и денитрификации* проводили методом ацетиленовой редукции и методом ацетиленового ингибирования соответственно в лабораторных условиях с соблюдением гидротермического оптимума. *Определение потенциальной активности азотфиксации и денитрификации* производили аналогично, но после обогащения почвенных образцов глюкозой и глюкозой с KNO<sub>3</sub> соответственно (Методы..., 1991; Степанов и др., 2002).

*Измерение концентрации CO<sub>2</sub>* осуществляли методом газовой хроматографии.

*Численность микроорганизмов* (азотфиксаторы, аммонификаторы и аммонификаторы, образующие H<sub>2</sub>S) определяли методом предельных разведений и глубинного посева с использованием соответствующих селективных агаризованных питательных сред.

*Количественное определение обменного аммония* производили фотоколориметрическим методом с использованием реактива Несслера (Беляев, 2000).

*Эффективность потребления субстратов* почвенным микробным сообществом оценивали с применением мультиреспирометрического теста (Марченко, Кожевин, 2008).

*Выделение микробной ДНК* из почвы проводили согласно методике (Yeates et al., 1998) с применением стеклянных бус и прибора "Mini beadbeater-8" (Biospec Products, Bartlesville, USA) с модификациями.



*Анализ структурной организации почвенного микробного сообщества проводили по экологической схеме «доминирование-разнообразие» на основании результатов ДГГЭ-анализа (Условия ДГГЭ: денатурирующий агент от 30-45 до 60 %; 0,5-кратный ТАЕ-буффер; 100 В; 60°C; 16 ч; 6 % акриламид; окрашивание Silver Stain Kit).*

*Оценку живой активной биомассы в образцах почв производили косвенным методом по интенсивности гидролиза флуоресцеин диацетата (ФДА) фотокolorиметрически (Schnurer and Rosswall, 1982; Кожевина, 1995).*

*Люминесцентную микроскопию стекол обрастания проводили после фиксации и окрашивания акридином оранжевым. Анализ количественных характеристик микробного роста проводили на основе модели формирования биопленки *in situ* на начальных этапах колонизации стекол обрастания (Кожевин, 1989). Расчет индекса относительной роли грибов и бактерий F/V проводили с использованием морфологических показателей (Кожевин, 1989) со значениями радиусов 0,29 и 2,5 мкм для сферы и цилиндра соответственно.*

*Актуальную и потенциальную биологическую активность почв, а также численность физиологических групп азотфиксаторов и аммонификаторов изучали в динамике (5-35 суток). Лабораторные измерения проводили на образцах почв в 3-5 кратной повторности. Подсчет КОЕ на чашках Петри проводили в 9-кратной повторности.*

*Статистическую и графическую обработку результатов проводили с использованием программных средств «Microsoft Excel»; «R», версия 3.2.0; «STATGRAPHICS»; «ImageJ», версия 1,45s.*

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Динамика актуальной и потенциальной активности азотфиксации**

Ежедневное (на протяжении 35 суток) определение актуальной активности азотфиксации выявило отсутствие статистически достоверных различий в почвах залежи и поля (критерий Уилкоксона-Манна-Уитни,  $Z = 0,688801$ ,  $\alpha = 0,1$ ), активность азотфиксации находилась на низком уровне, а средние значения не превышали 0,017 мкг  $C_2H_4$ /г в час в почве залежи и 0,009 мкг  $C_2H_4$ /г в час в почве поля.

Потенциальная активность азотфиксации в почве залежи (рис. 1А) имела достоверно более низкие значения, чем в почве поля (рис. 1Б) (критерий Уилкоксона-Манна-Уитни,  $Z = 5,869362$ ,  $\alpha = 0,01$ ), разница значений данного показателя за период исследования достигала двух порядков.

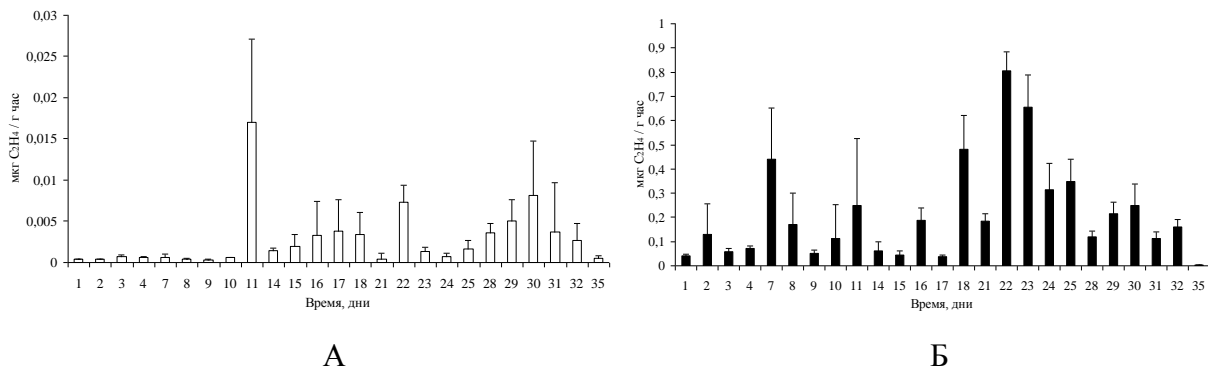


Рисунок 1. Ежедневная динамика потенциальной активности азотфиксации в почве залежи (А) и поля (Б).

Интенсивной азотфиксации в почве залежи не было обнаружено даже после внесения дополнительного источника энергии, что свидетельствует об отсутствии у микробного сообщества данной почвы острой потребности в дополнительном азоте. Высокие значения потенциальной активности азотфиксации в почве поля свидетельствуют о том, что микробное сообщество данной почвы нуждается в дополнительном источнике азота, в то же время, низкие значения актуальной активности азотфиксации в почве поля являются следствием недостатка энергетического ресурса, необходимого для осуществления энергозатратного процесса биологической азотфиксации.

### Динамика численности азотфиксаторов

При исследовании динамики численности микроорганизмов, растущих на безазотистой среде, проводили учет КОЕ на 3-й и 6-й дни после посева. Характер динамики роста микроорганизмов в каждом исследуемом образце заметно не изменялся, происходило только количественное увеличение КОЕ (рис. 2).

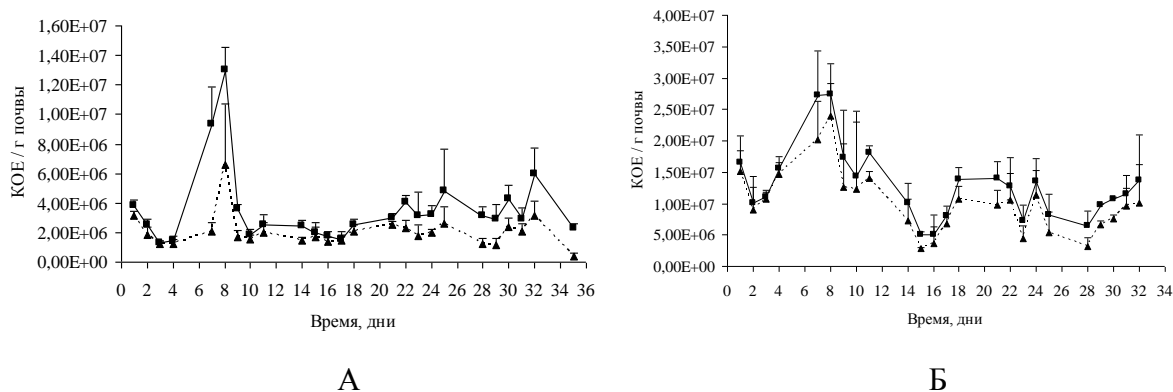


Рисунок 2. Ежедневная динамика численности азотфиксаторов почвы залежи (А) и поля (Б); ▲ – КОЕ на 3 сутки, ■ – КОЕ на 6 сутки

Численность КОЕ азотфиксаторов почвы поля достоверно превышала численность КОЕ азотфиксаторов почвы залежи в среднем в 5 раз при учете на 3-й день после высева (критерий Уилкоксона-Манна-Уитни:  $Z = 5,752883$ ,  $\alpha = 0,01$ ) и в среднем в 4 раза при учете на 6-й день (критерий Уилкоксона-Манна-Уитни:  $Z = 5,505447$ ,  $\alpha = 0,01$ ).

В течение экспериментального периода отмечались резкие изменения численности КОЕ как в образцах почвы залежи (8, 22, 25, 32-е сутки) (рис. 2А), так и поля (8, 18, 24, 32-е сутки) (рис. 2Б). Для почвы залежи характерно чередование периодов, когда большее количество колоний появляется за 1-3 сутки с периодами появления большего количества колоний за 4-6 сутки. Для почвы поля характерно равномерное появление колоний азотфиксаторов на питательной среде, либо появление большей части колоний относилось только к 1-3 суткам.

Выявленные различия между почвами залежи и поля указывают на большую структурную гетерогенность внутри сообщества азотфиксаторов почвы залежи, по сравнению с интенсивно обрабатываемой почвой поля.

#### **Динамика численности аммонификаторов**

Динамику численности аммонификаторов изучали одновременно для аммонификаторов, образующих  $H_2S$ , и аммонификаторов, не обладающих данной физиолого-биохимической активностью. Дифференцированный подход к изучению динамики численности аммонификаторов связан с попыткой выявить не только функциональные, но и структурные особенности физиологических групп микроорганизмов почв залежи и поля. Подгруппу аммонификаторов, способных метаболизировать серосодержащие аминокислоты, использовали в качестве показателя наличия или отсутствия селекционного процесса микроорганизмов по трофическому признаку.

При изучении динамики численности аммонификаторов наблюдали значительное преобладание аммонифицирующих бактерий в образцах поля, возделываемого по интенсивной системе земледелия (рис 3Б), над их численностью в залежи (рис 3А) (критерий Уилкоксона-Манна-Уитни,  $Z=5,4691$ ,  $\alpha = 0,001$ , для аммонификаторов, не образующих  $H_2S$ ). В целом, численность КОЕ в почве поля более чем на порядок превышала численность КОЕ в залежи.

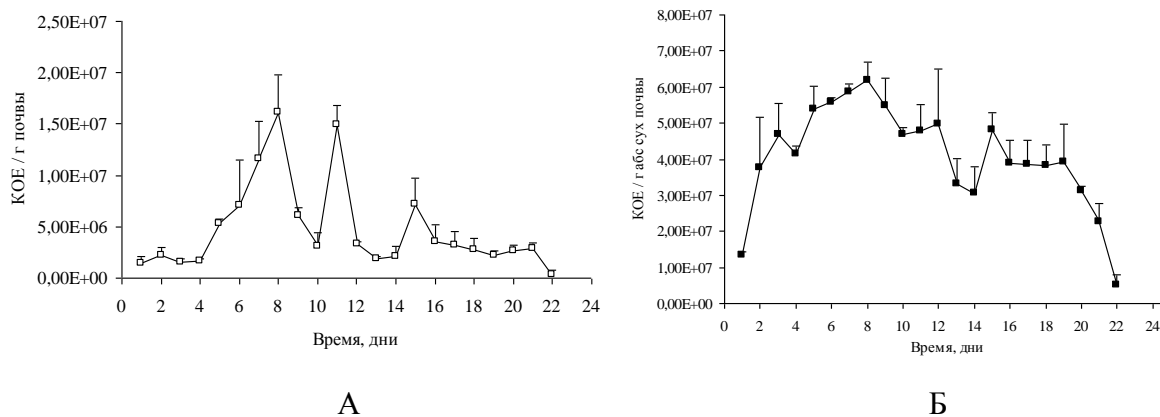


Рисунок 3. Ежедневная динамика численности аммонификаторов, не образующих  $H_2S$ , в почве залежи (А) и поля (Б).

Количество КОЕ аммонификаторов, не образующих  $H_2S$ , более чем на порядок превосходило в точках максимума число КОЕ аммонификаторов, образующих  $H_2S$  и окрашивающих среду в черный цвет, как в почве поля ( $1,63 \cdot 10^6$  КОЕ/г почвы), так и залежи ( $7,28 \cdot 10^5$  КОЕ/г почвы).

На начальных этапах сукцессии, инициированной увлажнением образцов почв, темноокрашенные колонии аммонификаторов, образующих  $H_2S$ , не обнаруживались в почве залежи, однако присутствовали в малых количествах в интенсивно обрабатываемой почве поля (рис. 4). В дальнейшем динамики КОЕ практически не различались, за исключением двукратного численного преобладания КОЕ аммонификаторов в почве поля (критерий Уилкоксона-Манна-Уитни,  $Z=3,6617$ ,  $\alpha = 0,001$ ). В залежи темноокрашенные колонии не превышали  $10^6$  КОЕ/г почвы, и, вероятно, данная группа аммонификаторов не является физиологически значимой для этой почвы (рис. 4).

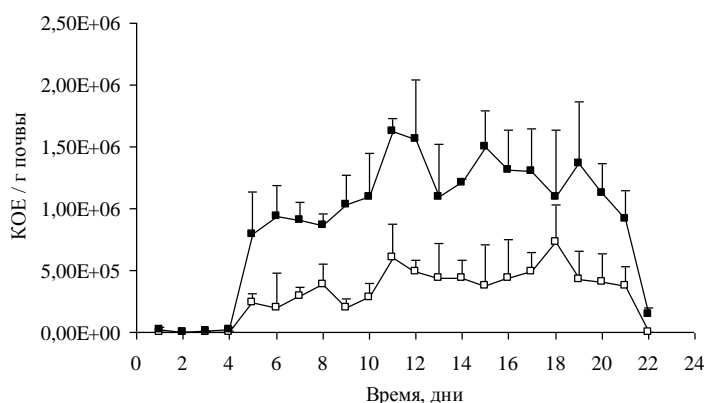


Рисунок 4. Ежедневная динамика численности аммонификаторов, образующих  $H_2S$ , в почвах залежи и поля; □ – залежь, ■ – поле.

Наблюдаемые особенности в динамике численности аммонификаторов почв залежи и интенсивно обрабатываемого поля свидетельствуют о различных траекториях развития этих физиологических групп и наличии особенностей, связанных с реализацией их трофических функциональных возможностей.

### Динамика содержания аммонийного азота в почве

В процессе ежедневного определения количества  $N-NH_4^+$  в исследуемых почвах с момента внесения в них пептона отмечали постоянное увеличение концентрации  $N-NH_4^+$ , как в почве залежи, так и поля. Более интенсивное накопление  $N-NH_4^+$  характерно для образцов почвы поля, однако эта разница статистически не достоверна. На 11 сутки эксперимента измеряемые концентрации  $N-NH_4^+$  в почве залежи и поля были равны (рис. 5).

В данном случае функциональные изменения не видны на фоне значительного изменения численности микроорганизмов. Однако повышение содержания аммонийного азота в почве поля согласуется с динамикой численности аммонифицирующих бактерий на начальном этапе сукцессии (с 1 по 8-е сутки). В почве залежи четко выраженной зависимости содержания  $N-NH_4^+$  от численности аммонификаторов не отслеживается.

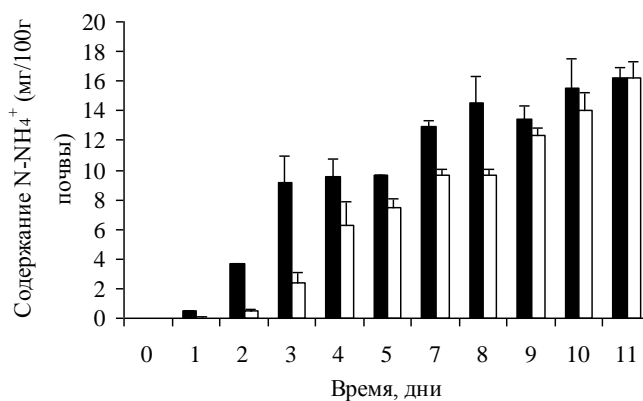


Рисунок 5. Ежедневная динамика содержания  $N-NH_4^+$  в почвах залежи и поля; □ – залежь, ■ – поле.

За сходством величин активности аммонификации скрыты различия структурной и функциональной организации физиологической группы аммонификаторов.

### Динамика актуальной и потенциальной активности денитрификации

Изучение динамики актуальной активности денитрификации выявило достоверное преобладание интенсивности образования  $N_2O$  почвой залежи (критерий Уилкоксона-Манна-Уитни:  $Z=4,5638$ ,  $\alpha = 0,001$ ) (рис 6А).

Динамика потенциальной активности денитрификации характеризовалась высокими значениями скорости образования  $N_2O$  как для образцов почвы залежи, так и для поля (рис 6Б). За исключением пяти точек (3, 8, 20, 22, 29-е сутки), потенциальная активность денитрификации в почве поля была выше, чем в почве залежи (критерий Уилкоксона-Манна-Уитни;  $Z=2,6033$ ,  $\alpha = 0,05$ ).

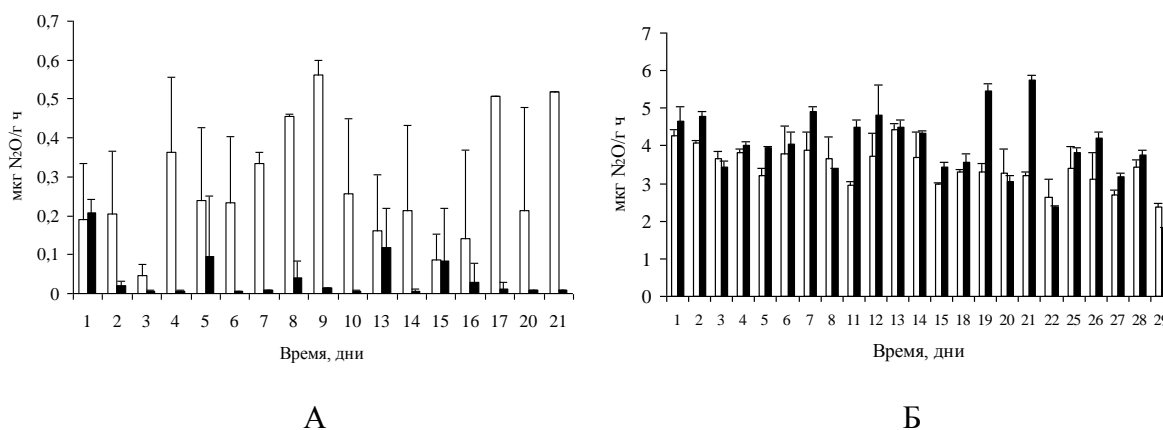


Рисунок 6. Ежедневная динамика актуальной (А) и потенциальной (Б) активностей денитрификации в почвах залежи и поля; □ – залежь, ■ – поле.

Достоверное преобладание потенциальной активности денитрификации в обрабатываемой почве над активностью в залежи и при этом, значительно более низкая актуальная активность в почве поля, свидетельствуют о возможном недостатке энергетических ресурсов в виде доступного органического вещества в почве поля, причиной чего может являться ее истощение в процессе длительного интенсивного возделывания. Данное предположение подтверждается результатами агрохимического анализа почв, согласно которым содержание активного органического вещества в интенсивно возделываемой почве с выращиванием картофеля в 2,1 раза меньше, чем под залежью, в то время как содержание минеральных форм азота в почве поля более чем в 1,5 раза превышает таковое в почве залежи (Зинякова, 2014). Поскольку практика возделывания оказывает влияние на количество доступного углерода в почве (Зинякова, 2014) усиливая микробную активность, а также оборот углерода (Monkiedje et al., 2006; Moscatelli et al., 2007), изменяется и функциональная активность отдельных физиологических групп микроорганизмов, участвующих в цикле азота, который тесно связан с циклом углерода. Потери доступных форм углерода, являющиеся результатом обработки сельскохозяйственных почв, становятся причиной ограничения активности процесса денитрификации.

Влияние на динамику потенциальной активности денитрификации характера эксплуатации почвы подтверждается результатами однофакторного дисперсионного

анализа (таблица 2) для экспериментальных периодов, характеризующихся наименьшими значениями дисперсии признака в залежи и поле и значениями коэффициента вариации, не превышающими 7 % (выделены жирным шрифтом в таблице 2).

Таблица 2. Значения критерия Фишера при определении достоверности различий между выборочными дисперсиями значений потенциальной активности денитрификации для почв залежи и поля.

Время, дни	Дисперсия факториальная	Дисперсия случайная	Критерий Фишера расчетный	Критерий Фишера табличный (при $\alpha=0,05$ / при $\alpha=0,01$ )
1	0,191261	0,096583	1,980278	7,7 / 21,2
<b>2</b>	<b>0,781553</b>	<b>0,008359</b>	<b>93,50372</b>	7,7 / 21,2
3	0,075832	0,034991	2,167207	7,7 / 21,2
<b>4</b>	<b>0,062586</b>	<b>0,008852</b>	<b>7,070273</b>	7,7 / 21,2
<b>5</b>	<b>0,790571</b>	<b>0,02156</b>	<b>36,66865</b>	7,7 / 21,2
6	0,084902	0,332128	0,255629	7,7 / 21,2
<b>7</b>	<b>1,55112</b>	<b>0,119412</b>	<b>12,9897</b>	7,7 / 21,2
8	0,114092	0,160344	0,711543	7,7 / 21,2
<b>11</b>	<b>3,58704</b>	<b>0,019431</b>	<b>184,6021</b>	7,7 / 21,2
12	1,784807	0,488675	3,652343	7,7 / 21,2
13	0,003835	0,031315	0,122465	7,7 / 21,2
14	0,629846	0,224681	2,803295	7,7 / 21,2
<b>15</b>	<b>0,338455</b>	<b>0,006285</b>	<b>53,85078</b>	7,7 / 21,2
18	0,094088	0,029666	3,171637	7,7 / 21,2
<b>19</b>	<b>6,936232</b>	<b>0,037041</b>	<b>187,2603</b>	7,7 / 21,2
20	0,076707	0,215028	0,356732	7,7 / 21,2
<b>21</b>	<b>9,50457</b>	<b>0,012455</b>	<b>763,1245</b>	7,7 / 21,2
22	0,096407	0,120977	0,7969	7,7 / 21,2
25	0,257832	0,170393	1,513162	7,7 / 21,2
26	1,856327	0,264292	7,023787	7,7 / 21,2
<b>27</b>	<b>0,354629</b>	<b>0,011834</b>	<b>29,96596</b>	7,7 / 21,2
28	0,167577	0,025761	6,505068	7,7 / 21,2
<b>29</b>	<b>0,393745</b>	<b>0,004868</b>	<b>80,88533</b>	7,7 / 21,2

Результаты сравнения выборочных распределений при проведении непараметрического однофакторного дисперсионного анализа подтверждают выявленные различия потенциальной активности денитрификации (табличное значение критерия  $\chi^2$  Пирсона при  $\alpha=0,01$  составляет 6,63, расчетное значение при соответствующем числе степеней свободы составляет 13,35).

Непараметрический однофакторный дисперсионный анализ значений актуальной активности денитрификации выявил отсутствие достоверных отличий выборочных распределений для почв залежи и поля (табличное значение критерия  $\chi^2$  Пирсона при

$\alpha=0,05$  составляет 3,84, расчетное значение при соответствующем числе степеней свободы составляет 1,52).

### Активность дыхания почв при внесении добавок

Сравнение результатов экспериментов по определению активности дыхания после внесения углерод-, азот- и фосфорсодержащих субстратов выявило достоверные различия в поведении микробных систем залежи и интенсивно возделываемого поля при воздействии на них различных количеств азотсодержащих веществ. Для почвы залежи характерно снижение активности дыхания в диапазоне высоких концентраций азота и отсутствие заметной тенденции к снижению данного показателя во времени (рис. 7 А). В почве поля, наоборот, выражен рост активности дыхания в диапазоне больших концентраций азота, но при этом скорость эмиссии  $\text{CO}_2$  имеет тенденцию к неуклонному снижению во времени (рис. 7Б).

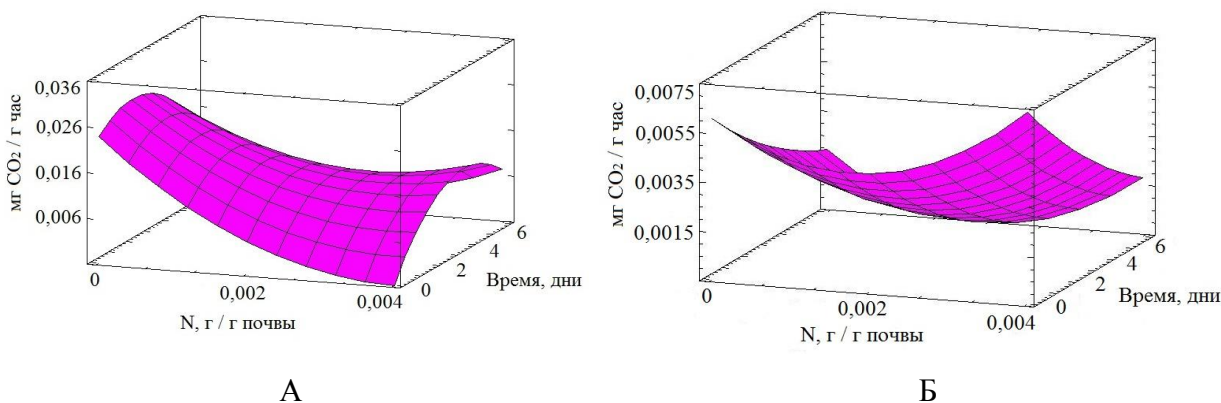


Рисунок 7. Зависимость показателя активности дыхания почвы залежи (А) и поля (Б) от концентрации азота (во времени).

Многолетняя сельскохозяйственная эксплуатация почвы, сопровождающаяся внесением высоких доз удобрений, является причиной толерантности микробного сообщества поля к воздействию высоких концентраций минерального азота в почве, которые для микробного сообщества залежи являются стрессовыми.

Сопоставление характера динамического ответа почвенных систем залежи и поля на воздействие добавок углерода и азота, отчетливо выявляет различия в реактивности данных систем. Для почвы залежи характерен быстрый интенсивный дыхательный ответ на внесение добавок. При этом дыхательная активность залежи проявлялась в форме резких подъемов и спадов скорости выделения  $\text{CO}_2$ . Для почвы поля характерен менее интенсивный и более равномерный по скорости эмиссии  $\text{CO}_2$  дыхательный ответ.



### **Активность гидролиза флуоресцеин диацетата (ФДА)**

Фотоколориметрическая оценка активности гидролиза ФДА была использована для определения живой микробной биомассы, как интегральный показатель ее активности в почвенных образцах залежи и поля. Значения стартовой ферментной активности в образцах свежей почвы и в почвах после инициирования сукцессионного процесса представлены в таблице 3.

Таблица 3. Активность гидролиза ФДА в образцах почв залежи и поля.

Активность, (OD <sub>490</sub> )	Залежь	Поле
Стартовая	0,080	0,095
Через 3 суток после внесения глюкозы	0,110	0,100

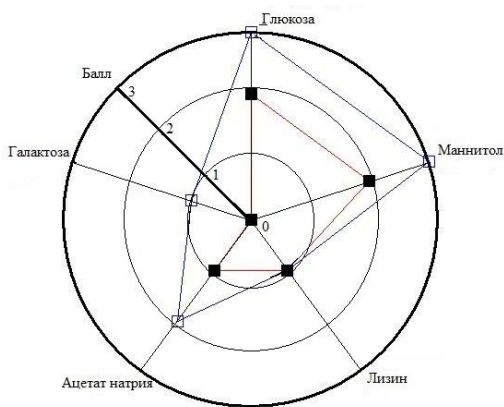
Данные результаты свидетельствуют о том, что содержание и активность живой микробной биомассы находятся практически на одном уровне в почвах залежи и поля. После внесения глюкозы в почвенные образцы в почве залежи отмечены несколько более высокие показатели ферментной активности микробной биомассы по сравнению с почвой поля.

### **Мультиреспирометрическое тестирование (МРТ)**

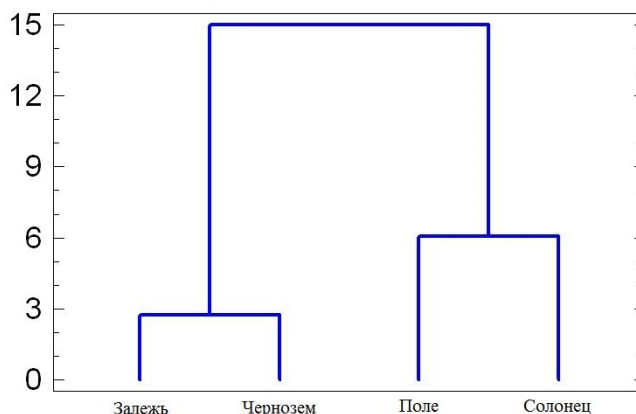
Оценка широты спектра и эффективности потребления почвенными микроорганизмами таких субстратов как сахара (глюкоза, галактоза), многоатомные спирты (маннитол), аминокислоты (лизин) и соли органических кислот (ацетат натрия) выявила существенные отличия микробных сообществ залежи и поля (рис. 8).

Микробное сообщество залежной почвы потенциально способно реализовать большее число трофических функциональных возможностей по сравнению с микробным сообществом интенсивно обрабатываемой почвы поля, трофические функции которого усечены до потребления легкодоступных источников энергии (рис. 8А).

Кластерный анализ трофических возможностей исследуемых почв, проведенный совместно с двумя контрастными образцами почв (чернозем и солонец), подтверждает наличие серьезных и значительных изменений микробного сообщества обрабатываемой почвы и наглядно демонстрирует функциональное разделение и удаленность друг от друга микробных сообществ почв залежи и интенсивно возделываемого поля (рис. 8Б).



Квадрат евклидова расстояния



А

Б

Рисунок 8. Спектр и интенсивность потребления субстратов (А) микробными сообществами почв залежи (□) и обрабатываемого поля (■); результаты кластерного анализа трофических функций почв залежи и поля (Б), проведенного совместно с образцами почв двух разных типов (чернозем и солонец).

### Структурный анализ микробных сообществ на основе результатов ДГГЭ

Анализ относительного обилия фрагментов гена 16S рРНК, представленных в качестве дискретных таксономических единиц – риботипов, производили после проведения ДГГЭ по соотношению яркости полосы в геле и яркости общей площади паттерна полос дорожки в денатурирующем геле. Относительное обилие риботипа в сообществе оценивали с присвоением ему условного названия-ранга. Последующий анализ проводили по схеме «доминирование-разнообразие» и результат представляли в координатах индекс обилия от ранга. Полученные кривые оказались почти одинаковыми для почв залежи и поля (рис. 9).

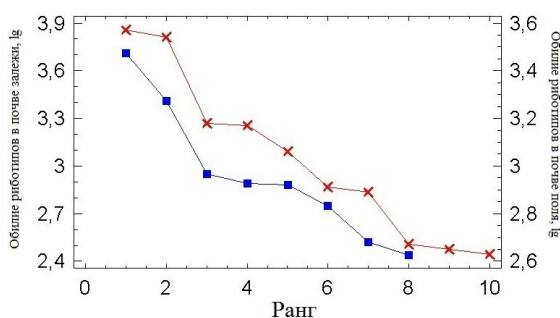


Рисунок 9. Результаты анализа обилия риботипов в почвах залежи (■) и поля (x).

Корреляционно-регрессионным анализом подтверждено, что ранговые распределения численностей риботипов аппроксимируются прямыми линиями как в почве залежи ( $r = -0,96$ ) (рис. 10А), так и поля ( $r = -0,97$ ) (рис. 10Б).

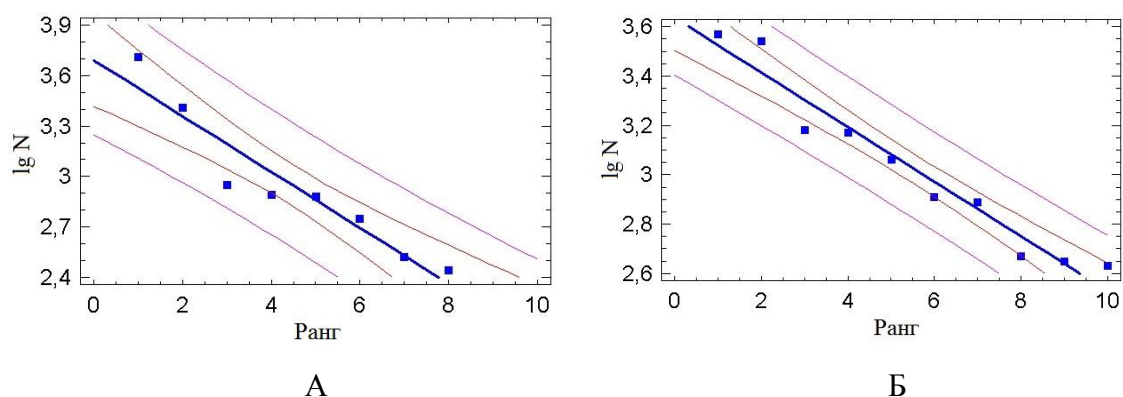


Рисунок 10. Результаты корреляционно-регрессионного анализа ранговых распределений численности риботипов в почвах залежи (А) и поля (Б).

Формально, наблюдаемая картина с малым числом обильных риботипов и большей долей гораздо менее обильно представленных с наибольшей вероятностью описывает такие сообщества, структура которых определяется одним или немногим числом экологических факторов. Как правило, это ситуация жесткой конкуренции с приоритетами в захвате экологических ниш объектами. Таким образом, бактериальные сообщества залежи и поля характеризуются схожестью по структурно-генетическим характеристикам, в то время как в функциональном плане эти же сообщества различаются принципиально.

#### Анализ количественных характеристик микробного роста

Сравнительный анализ количественных характеристик (таблица 4) микробного роста в исследуемых почвах проводили на основе модели формирования биопленки *in situ* на начальных этапах колонизации стекол обрастания (Кожевин, 1989).

Таблица 4. Количественные характеристики микробного роста.

Показатель	Залежь	Поле
Число клеток в поле зрения; N, клетки/поле зрения	31,0	3,0
Скорость миграции (прикрепления) клеток; A, клеток/(поле зрения * час)	0,069	0,010
Удельная скорость роста; $\mu$ , ч <sup>-1</sup>	0,0048	0,0018
Расчетное время генерации (удвоения); $t_{1/2}$ ,сут	6	16

Результаты, полученные для образцов почв залежи и интенсивно обрабатываемого поля (таблица 4) свидетельствуют о том, что в экосистеме залежной почвы, по сравнению с агросистемой, обеспечивается не только превышение на порядок общей численности клеток, но и существенно возрастают показатели иммиграции и роста. Увеличение

времени генерации указывает на выраженный дефицит доступных органических ресурсов в агроэкосистеме.

### **Оценка относительной роли грибов и бактерий**

При микроскопии стекол обрастания помимо количественного учета бактерий определяли длину мицелия грибов. Показатели обилия грибного мицелия в почве залежи и поля существенно и достоверно различаются (таблица 5), а индексы относительной роли бактерий и грибов F/V для залежи и поля указывают на то, что в агроэкосистеме относительная роль грибов снижается примерно в 1,5 раза.

Таблица 5. Показатели относительной роли грибов и бактерий в почве залежи и интенсивно обрабатываемого поля

Показатель	Залежь	Поле
Обилие грибного мицелия, мкм/ поле зрения	96,0	3,9
Индекс относительной роли грибов и бактерий, F/V	47,3	31,4

Внесение в качестве удобрений высоких доз минеральных форм азота повлияло на изменение естественного соотношения C/N в почве, снизив его численное значение, по сравнению с почвой залежи. Поскольку для биомассы грибов характерно более высокое значение соотношения C/N, чем для биомассы бактерий (Lavelle et al., 2005), в почве поля частично элиминировалась значимая природная составляющая и структурообразующая часть микробного консорциума почвы, а также одна из наиболее эффективных компонент азотного цикла в почве – грибы.

### **Оценка резистентности почвенных микробных сообществ**

Полноценность функционирования экосистемы обеспечивается не только ее биологическим разнообразием, но и возможностью осуществления широкого спектра функций. На сегодняшний день широко распространенным является мнение о благополучии развития и функционирования именно устойчивых систем. Представленные в данной работе результаты оценки резистентности почвенных микробных сообществ, как по интегральным, так и по специфическим показателям (таблица 6) являются свидетельством того, что устойчивое состояние системы не обязательно сопряжено с ее полноценным функционированием.

Таблица 6. Индексы резистентности (RS)\*, рассчитанные по Orwin and Wardle, 2004 на основании различных показателей

Показатель	Залежь	Поле
Активность азотфиксации	0,94	-0,98
Активность денитрификации	-0,84	-0,98
Активность гидролиза ФДА	0,45	0,90
Активность дыхания		
Глюкоза (0,0002 г С на 1 г почвы)	0,05	0,99
20 C/N	0,78	0,43
10 C/N	0,61	0,66
C = N	0,60	0,71
C/10N	0,12	0,46
C/20N	0,12	0,64
C/40N	0,01	0,97

\* Чем ближе значение RS к 1, тем более устойчива система, и наоборот, чем больше значение RS приближается к -1, тем система более лабильна.

Структурно-функциональные преобразования отдельных физиологических групп могут быть настолько глубоки, что способствуют переходу всего микробного сообщества в альтернативное состояние, характеризующееся большей устойчивостью, чем исходное, но вместе с тем, упрощением и деструктивным изменением внутренней организации, а также усечением функциональных возможностей. Структурно-функциональные особенности физиологических групп микроорганизмов, участвующих в процессах цикла азота в почве должны учитываться при выборе методов экологической оценки и ремедиации почвенных систем.

## ВЫВОДЫ

1. Интенсивное возделывание почвы способствует истощению ее энергетических ресурсов, что отражается на активности биологических процессов азотфиксации и денитрификации.

2. Внесение высоких доз минеральных азотсодержащих удобрений является причиной снижения численности и относительной роли эукариотической составляющей – микромицетов, в функционировании микробного консорциума обрабатываемой почвы.

3. Многолетняя сельскохозяйственная эксплуатация почвы по интенсивной технологии существенно не влияет на структурные характеристики бактериального сообщества агроэкосистемы, но способствует изменению количественных характеристик микробного роста: снижается удельная скорость роста и скорость миграции клеток, увеличивается время генерации.

4. Регулярное внесение удобрений, содержащих высокие концентрации минеральных форм азота, способствует формированию толерантного микробного сообщества, активность которого не подавляется такими концентрациями азота, которые являются стрессовыми для микробного сообщества залежной почвы и вызывают угнетение дыхательной активности.

5. Интенсивная агротехнология является мощным фактором отбора, формирующим в обрабатываемой почве микробное сообщество с ограниченным набором трофических функций, направленных на быстрое потребление легкодоступных источников энергии.

6. Оценка резистентности микробных сообществ обязательно должна сопровождаться характеристикой их структурно-функциональных особенностей при выборе методов экологической оценки и ремедиации почв, а также прогнозировании развития почвенных экосистем.

## **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ РАБОТ**

### **Статьи в журналах ВАК:**

1. Семёнов А.М., Бубнов И.А., Эмер Н.Р. «Определение параметра здоровья почвы при использовании различных нарушающих воздействий» // Проблемы агрохимии и экологии. – 2013. – № 3. – С. 22 – 29.

2. Эмер Н.Р., Семенов А.М., Зеленев В.В., Зинякова Н.Б., Костина Н.В., Голиченков М.В. Ежесуточная динамика численности и активности азотфиксирующих бактерий на участках залежной и интенсивно возделываемой почвы // Почвоведение. – 2014. – № 8. – С. 963-970.

3. Emer N.R., Semenov A.M., Zelenev V.V., Zinyakova N.B., Kostina N.V., Golichenkov M.V. Daily dynamics of the number and activity of nitrogen-fixing bacteria in fallow land and intensely cultivated soils // Eurasian Soil Science. – 2014. – Vol. 47, №. 8. – P. 801-808.

4. Эмер Н.Р., Костина Н.В., Голиченков М.В., Нетрусов А.И. Динамика активности денитрификации и аммонификации в залежной и интенсивно возделываемой серой лесной почве // Почвоведение. – 2016 (в печати).

### **Другие публикации:**

5. Эмер Н.Р. «Динамика аммонификаторов почвы в свете концепции волнообразного развития микробных сообществ» в сборнике «Ломоносов-2013: XX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология»; 8-13 апреля 2013 г., Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов» – М.: МАКС Пресс, 2013. – 368 с.

6. Эмер Н.Р. «Ежесуточная волнообразная динамика численности и активности азотфиксаторов как метод выявления различий в трансформации азота в почвах» в сборнике «Ломоносов-2014: XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология» 7-11 апреля 2014 г.; Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов» – М.: Издательство Московского университета, 2014. – 380 с.

7. Зеленев В.В., Эмер Н.Р., Семенов А.М., Семенова Е.В. «К параметру определения микробной активности трансформации азота в почвенной экосистеме» в сборнике «Современные проблемы физиологии, экологии, и биотехнологии микроорганизмов: Всероссийский симпозиум с международным участием. Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 24-27 декабря. 2014 г». – М.: МАКС Пресс, 2014. – 280 с.

8. Эмер Н.Р. «Использование волнообразной динамики развития микроорганизмов для определения показателей устойчивости микробного сообщества почвенной экосистемы» в сборнике «Ломоносов-2015: XXII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология»; 13-17 апреля 2015 г., Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов» – М.: МАКС Пресс, 2015. – 420 с.

9. Эмер Н.Р. «Структурно-функциональные особенности сообществ микроорганизмов цикла азота в почвах, находящихся под влиянием интенсивной агротехники» в сборнике «Автотрофные микроорганизмы: 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием». Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 21-24 декабря 2015 г. – М.: МАКС Пресс, 2015. – 192 с.



ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Подписано в печать 15.03.2016 г.  
Бумага офсетная. Печать цифровая.  
Формат А4/2. Усл. печ. л.1.  
Заказ № 370. Тираж 100 экз.  
Типография «КОПИЦЕНТР»  
119234, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д.20  
Тел. 8 (495) 213-88-17  
[www.autoreferat1.ru](http://www.autoreferat1.ru)