

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Факультет почвоведения
Кафедра биологии почв

На правах рукописи

Чакмазян Карина Вачиковна

**ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ
В УСЛОВИЯХ ЗАЛЕЖИ И ЭМИССИИ ВОДОРОДА**

Специальность 03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Л.М. Полянская

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
ГЛАВА 1. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ПОТОКОВ ВОДОРОДА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СОСТОЯНИЕ ПОЧВ	9
ГЛАВА 2. СОДЕРЖАНИЕ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ	18
ГЛАВА 3. ПОЧВЕННЫЕ МИРООРГАНИЗМЫ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВОДОРОД	31
3.1. Производство H_2 в почве	33
3.2. Потребление H_2 в почве	34
3.3. Эксперименты, проводимые с молекулярным водородом в почве	37
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
4.1. Почвы	41
4.2. Методика определения численности и биомассы микроорганизмов методом люминесцентной микроскопии	47
4.3. Методика определения численности и биомассы микроорганизмов методом «каскадной фильтрации»	49
4.4. Модельный опыт по продуванию почвы водородом	52
ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ В УСЛОВИЯХ ЗАЛЕЖИ	54
ГЛАВА 6. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ ЗАПАДИН ЛИПЕЦКОЙ И ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТЕЙ	66
6.1. Западина в Липецкой области (серая лесная почва)	66
6.2. Западина в Волгоградской области (чернозем обыкновенный и лугово-черноземная почвы)	72
6.3. Численность бактерий в условиях избыточного переувлажнения	80
ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА НА СТРУКТУРУ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	95
ЛИТЕРАТУРА	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Микробные системы играют важную роль в биогеоценозах. Они во многом определяют потоки энергии в круговороте веществ. Ряд звеньев круговорота веществ выполняют только микроорганизмы, часть звеньев выполняется преимущественно микроорганизмами. Известна поразительная устойчивость микробных систем почв, однако антропогенные воздействия могут приводить к ее нарушению. Вначале возникают структурные изменения, а затем и функциональные. На настоящем этапе развития экологической микробиологии необходимо иметь сведения об естественных микробиологических параметрах, характерных для разных природных экосистем, неподвергавшихся существенному воздействию человека. Эти исследования проводятся главным образом в заповедниках (Добровольская и др., 1995; Головченко, Полянская, 1996). Такое изучение дает возможность определить характер изменений, вызываемых антропогенными воздействиями (Полянская и др., 2001; Свешникова и др., 2001а, б). Перспективным представляется сопоставление микробных комплексов почв, подвергнутых антропогенному воздействию с таковыми в относительно сохранных почвах.

Помимо антропогенного влияния (сельскохозяйственное освоение), мы изучали воздействие на численность почвенных микроорганизмов такого природного фактора, как эмиссия водорода.

Отечественные и зарубежные геологи отмечают усиливающуюся водородную дегазацию из недр Земли (Sato et al., 1986; Sano et al., 1993; Newel et al., 2007; Ларин, 2010; Zgvonnik et al., 2015). Вопрос о генезисе глубинных газов принципиально решается только на базе космогонических представлений о происхождении Солнечной системы. В основном современные исследователи эндогенных газов придерживаются взглядов на их глубинное происхождение. Дискуссии же ведутся лишь о степени этой глубинности, точнее о мантийном или ядерном источнике первичных газовых потоков. Главными каналами дегазации Земли, через которые растворенные во внешнем ядре газы выходят на дневную и морскую поверхность, являются рифтовые зоны — огромные расколы литосферы, сливающиеся в единую мировую систему. Особенностью процесса является его неравномерность как во времени, так и в пространстве (Ларин, 2005).

С процессом эмиссии водорода учёные связывают многие явления, протекающие на планете, такие как: тектономагматическая активность, разрушение озонового слоя (Сывороткин, 2013), а также деградация почвенного покрова Земли (Суханова и др., 2013).

Органическое вещество почв является предметом исследования многих отечественных и зарубежных ученых на протяжении более 200 лет (История плодородия, 1940; Ваксман, 1937; Кононова, 1951, Орлов, 1992). Дегумификация пахотных почв остается одной из важнейших проблем экологии, поскольку количественное содержание и качество гумуса имеет большое значение для уровня плодородия почв. Гумусовые вещества

способствуют оструктуриванию почвенной массы и созданию благоприятного водно-воздушного режима (Добровольский, 1989). Потеря гумуса может привести к ухудшению почвенных свойств, снижению плодородия, а затем и к изменениям всей экосистемы в целом.

Чаще всего уменьшение содержания и качественного состава гумуса связывают с антропогенными процессами обработки пахотных почв, но влияние оказывают также и природные факторы, в частности, эмиссия водорода. Показано, что почвы, испытывающие влияние потока молекулярного водорода, интенсивно меняют свои свойства. В разной степени меняется подвижность многих элементов. Существует гипотеза, что гумус в таких условиях способен либо трансформироваться под воздействием скачков окислительного потенциала и, возможно, гидрогенизации, либо формироваться как более подвижный, что может приводить к выносу его за пределы почвенного профиля (Суханова и др., 2013).

Выходы глубинного водорода на поверхность наблюдаются на кольцевых структурах проседания поверхности. Такие западины хорошо обнаруживаются на космических снимках: они выражаются в виде светлых кругов в местах выходов водородных потоков (Суханова и др., 2013). Особенно четко они идентифицируемы в черноземной зоне: верхний горизонт там осветляется до серого или до светло-серого цвета, как известно, окраска почвенных перегнойно-аккумулятивных горизонтов обусловлена преимущественно гумусом (Орлов, 1992).

Цель настоящей работы – изучить влияние антропогенного фактора (пашня) и природного (эмиссия водорода) на численность и структуру микроорганизмов в почве.

Задачи исследования:

1. Оценить основные количественные характеристики микробного сообщества по профилю дерново-карбонатной почвы и выщелоченного чернозема, находящихся в условиях пашни и залежи.
2. Установить влияние временного избыточного переувлажнения и выделения водорода на микроорганизмы в почвах западин и в фоновых образцах.
3. Изучить распределение численности бактерий по размерам в профиле этих почв.
4. Исследовать и уточнить вклад именно водородных потоков в изменение структуры почвенной микробной биомассы в модельных экспериментах:
 - а) создание условий временного избыточного переувлажнения в почве,
 - б) пропускание молекулярного водорода через почву.

Научная новизна. В работе впервые показано влияние водорода, поступающего из недр Земли, на численность микробной биомассы почв. Выявлено снижение общей численности бактерий, актиномицетного мицелия, спор и мицелия грибов под воздействием водорода в полевых и лабораторных условиях.

Практическая значимость. Показано, что в качестве показателей агроэкологического состояния почв нужно учитывать следующие показатели: размеры общей микробной биомассы; соотношение прокариот и эукариот в общей микробной биомассе; соотношение доли спор и грибного мицелия в структуре грибной биомассы до и после воздействия как природных, так и антропогенных факторов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова. Положения работы были представлены на российских и международных конференциях:

1. VI съезд Общества почвоведов имени В.В. Докучаева Всероссийская с международным участием научная конференция «Почвы России: современное состояние, перспективы изучения и использования», Петрозаводск, 2012 г.;
2. Международная научная конференция XVI Докучаевские молодежные чтения «Законы почвоведения: новые вызовы», Санкт-Петербург, 2013;
3. XI Международная конференция «Государственное управление: Российская Федерация в современном мире», Москва, 2013;
4. 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 2014;
5. Международная научная конференция «Экология и биология почв», Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, 2014;

6. Международная научная конференция XVII Докучаевские молодежные чтения, Санкт-Петербург, 2015.

Публикации. По теме исследований опубликовано 2 статьи и 1 находится в печати в изданиях, рекомендованных ВАК, а также 6 тезисов в материалах российских и международных конференций.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 113 страницах, состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов, результатов и обсуждений, заключения, выводов, списка литературы (137 источников, из них 42 на иностранных языках). Работа иллюстрирована 40 рисунками, содержит 4 таблицы.

Личный вклад автора в работу. Автором проведены аналитический обзор литературы, лабораторные эксперименты, а также микробиологические анализы исследуемой почвы, интерпретация полученных результатов и статистическая обработка данных.

Автор благодарит проф., д.б.н., Степанова А.Л., проф., д.б.н. Звягинцева Д.Г., сотрудников кафедры химии почв: к.б.н. Суханову Н.И. и к.б.н. Кирюшина А.В. за консультацию, помощь в исследовании и за предоставленные образцы почв.

ГЛАВА 1. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ПОТОКОВ ВОДОРОДА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СОСТОЯНИЕ ПОЧВ

При изучении проблемы дегумификации в пахотных почвах, внимание исследователей сосредотачивается, как правило, на антропогенном влиянии: усилении минерализации при распашке, сокращении поступления в почву растительных остатков, водной и ветровой эрозии и других. Существуют факторы, не зависящие от деятельности человека, к таковым относятся, например, временное избыточное переувлажнение. Еще одним, пока практически неизученным, фактором является эмиссия глубинного водорода.

Сведения о высоких содержаниях водорода в почве и в океанической среде имеются в работах отечественных и зарубежных геологов. На территории России выходы водорода были обнаружены в Хибинах (Кривцов и др., 1967), в Нижнем Поволжье (Зингер, 1962), на плато Устюрт (Бетелев, 1965), а также вокруг озера Байкал (Щербаков, Козлова, 1988).

Повышенные концентрации водорода отмечаются исследователями в США (штат Канзас) (Angino et al., 1990; Newel et al., 2007), на Срединно-Атлантическом хребте (Charlou et al., 2008), на территории Омана (Neal, Stanger, 1983; Sano et al., 1993). Мониторинг в Калифорнии (разлом Сан Андреас и Калаверас) обнаружил показатели в 1000-4000 ppm содержания водорода (Sato et al., 1986). Возрастание концентраций водорода с глубиной было показано при изучении понижений в Северной Америке, так называемых Carolina Bay (Zgvonnik et al., 2015).

В исследованиях В.Н.Ларина (Ларин, 2010) было показано, что в местах выхода глубинного водорода формируются кольцевые структуры проседания (западины), хорошо дешифрируемые на космических снимках (они проявляются в виде светлых колец и кругов), приуроченных, чаще всего, к разломам земной коры. Наиболее четко они видны на пахотных почвах с темной окраской гумусового горизонта (черноземы, серые) (рис.1). Верхний горизонт в таких западинах осветляется от черного до серого, или светло-серого цвета.

Проведенные предварительные исследования верхнего гумусового горизонта чернозема (запад Волгоградской области) в небольшой западине с выходом водорода, где отмечено сильное выбеливание поверхности показали, следующее (Суханова и др., 2013):

- 1) на участках выделения водорода из недр земли, где формируется кольцеобразная просадка грунта, наблюдается значительное осветление гумусового горизонта. Величина коэффициента отражения по сравнению с фоновыми почвами увеличивается почти вдвое.
- 2) в области просадки грунта почва теряет некоторое количество органического углерода (0,1-0,7%), но эта потеря не может определять такое выбеливание горизонта. Почва подкисляется (величина pH меняется от 6,5 до 4,9).



А



Б

Рис. 1. Проседание грунта на месте выхода эндогенного водорода. А – Липецкая область, Б – Волгоградская область (Суханова и др., 2013).

3) в почве зоны выхода водорода резко уменьшается интенсивность окраски гуминовых веществ почв (оцениваемая по оптической плотности ГК) (рис. 2), обусловленная наличием двойных сопряженных углеродных связей в молекулах гуминовых веществ. Можно предположить, что идет водородная деструкция гуминовых веществ. (Суханова и др., 2013).

4) первый пробный лабораторный модельный опыт по пропусканию водорода через почвенный слой выявил ту же тенденцию (Суханова и др., 2013).

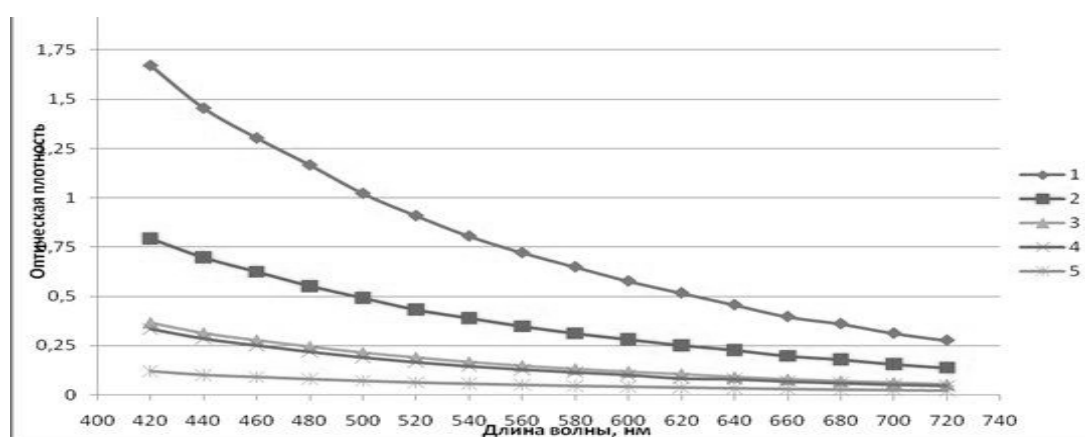


Рис. 2. Оптическая плотность вытяжек гуминовых кислот. 1, 2 – пробы дна западины, 3, 4, 5 – пробы вне западины (рис. Суханова и др., 2013).

Еще один существенный фактор, влияющий на состояние гумуса, и почвы в целом, в местах выхода водорода – это периодическое избыточное переувлажнение на кольцевых структурах почв, сопровождающееся формированием временных восстановительных условий в почвенном профиле. В результате возможно превращение стабильных гуминовых веществ в более подвижные и агрессивные низкомолекулярные фрагменты. Интенсивность окраски гумуса в таких условиях значительно ниже

(Касаткин, 1948; Урусевская, 1978; Зайдельман, 2009).

Вопрос о генезисе глубинных газов принципиально решается только на базе космогонических представлений о происхождении Солнечной системы. В отечественной геологии господствующее положение занимает гипотеза О.Ю.Шмидта (Шмидт, 1957) (или ее варианты) об аккреционном происхождении Земли. Так выглядят с этой точки зрения представления о генезисе глубинных газов, изложенные А.П.Виноградовым (1959): "Наибольший вклад паров и газов был внесен самым холодным космическим веществом (отвечающим по составу каменным метеоритам), из которого формировалась растущая планета. Однако это холодное метеоритное вещество в космическом вакууме сохранило главным образом те пары и газы, которые с метеоритным веществом давали прочные химические соединения. Поэтому, несмотря на высокую распространенность на Солнце, например H_2 , He, C (CH_4 и др.), O_2 и пр., эти газы не удержались в свободном состоянии в силикатном веществе планеты. Появление этих и других газов, например инертных, на поверхности Земли связано с последующим разогреванием вещества Земли - процессами выплавления и дегазации мантии Земли. О возможном содержании в силикатном веществе Земли (в частности, в мантии) легколетучих соединений можно получить представление по их содержанию в каменных метеоритах (хондритах)".

Предположения о том, что водород может быть доминирующим компонентом ядра Земли выдвигались учеными неоднократно (Kronig et al., 1946; Stevenson, 1977;). Антонов и др. (1980) показали, что сродство

водорода и железа значительно возрастает с давлением.

Гипотеза изначально-гидридной Земли геолога В.Н.Ларина базируется на установленной им эмпирической закономерности в распределении элементов в пределах Солнечной системы в зависимости от их потенциала ионизации. Предполагается, что в начальный момент становления Солнечной системы в условиях мощного магнитного поля Протосолнца происходила магнитная сепарация ионизированного вещества. Это привело к тому, что изначальный состав Земли был представлен водородистыми соединениями (гидридами), при этом массовая доля водорода в общей массе планеты составляла всего лишь несколько процентов. Изначальный гидридный состав Земля сохранила в своем внутреннем ядре, в то время как внешнее ядро представлено раствором водорода в металлах, основной объем мантии до глубин 400 км - сложен металлами, и лишь выше этой границы преобладают силикаты и оксиды (Ларин, 1991). Когда-то изначально гидридная Земля, по сути, целиком состояла из гидридов. Но сейчас внутреннее ядро (гидридное) занимает примерно 1% объема планеты. Развитие Земли выражается в уменьшении массы ядра и увеличении объема металлосферы в связи с дегазацией водорода. При этом водород должен проходить через всю толщу металлосферы. Атом водорода (в виде протона) проходит от ядра до литосферы менее чем за 1000 лет (Ларин, 2005).

В основном исследователи эндогенных газов придерживаются взглядов на их глубинное происхождение. Дискуссии же ведутся лишь о степени этой

глубинности, точнее о мантийном или ядерном источнике первичных газовых потоков (Williams, Hemley, 2001).

Главными каналами дегазации Земли, через которые растворенные во внешнем ядре газы выходят на дневную и морскую поверхность, являются рифтовые зоны — громадные расколы литосферы, сливающиеся в единую мировую систему (рис. 3). Многие исследования показали, что водородные аномалии обычно связаны с разломами (Wakita et al. 1980; Jones, Pirkle 1981; Ware et al. 1985; Sato et al. 1986; Щербаков, Козлова, 1988; McCarthy, McGuire 1998).

Выделение водорода из Мирового океана также весьма нередкое явление. При облучении воды шумами в ней резко увеличивается концентрация перекиси водорода – H_2O_2 . Это означает, что шумовая встряска вызывает диссоциацию части молекул воды, водород быстро уходит (благодаря своей способности к диффузии), а кислород остается в воде, и какая-то его часть идет на образование перекиси водорода. Концентрация перекиси легко определяется, но это соединение не стойкое и быстро распадается с выделением кислорода. Причина периодичности этого явления, видимо, связана с циклическим характером водородной дегазации планеты, которая активизирует эндогенную активность планеты, и в том числе ее вулканическую деятельность, влияющую на климат Земли (Ларин, 2005).

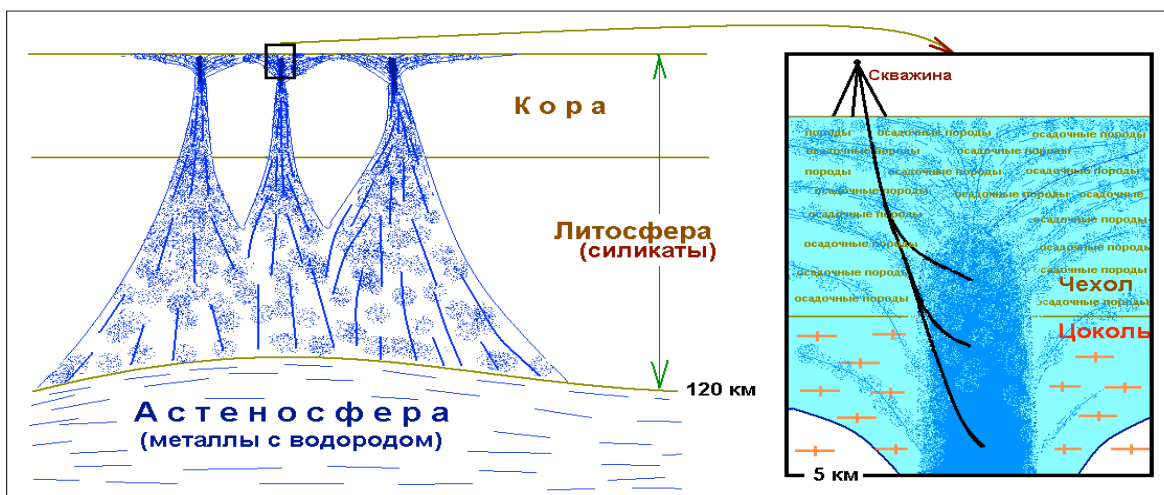


Рис. 3. Представления о характере водородной дегазации в литосфере.
(рис. Ларин, 2010)

Процесс дегазации Земли изучен довольно слабо, несмотря на уже имеющиеся данные и исследования. Наиболее полным обобщением эмпирических данных о газовых потоках в различных структурах Земли является работа, в которой суммарный годовой поток водорода с поверхности Земли оценивается в 6,0864 Тг ($1 \text{ Тг} = 10^{12} \text{ г}$), причем 4,48 Тг, или три четверти выделяется в срединно-океанических хребтах (Войтов, 1986).

Особенностью процесса глубинной дегазации является неравномерность его как во времени, так и в пространстве. Глубинная дегазация — процесс импульсный, т.е. для его количественной оценки нужны долговременные ряды наблюдений (Сывороткин, 2002). Масштабы этого явления должны быть велики, однако важную роль играет его периодичность. Известно, что водород — это газ без вкуса, цвета и запаха, и поэтому его выходы трудно обнаружить. К тому же из-за своего малого веса он не задерживается на дневной поверхности, а

очень быстро уходит в верхние слои атмосферы и далее, т.е. водород - это трудноуловимая субстанция (Ларин, 2005).

Тем не менее, в СКБ МИФИ разработан портативный анализатор, позволяющий измерять объемное содержание водорода в подпочвенном воздухе (120 см) до 1,5 объемных процента (Рудаков, 2009).

ГЛАВА 2. СОДЕРЖАНИЕ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ

Представление о микробной биомассе очень сильно менялось в связи с использованием новых и более совершенных методов. Большой прогресс был достигнут благодаря использованию прямых люминесцентно-микроскопических методов (Князева и др., 1985; Полянская, 1988; Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991; Babiuk, Paul, 1970; Anderson, Westmoreland, 1971). Постепенно складывалось представление о весьма значительных запасах биомассы в почвах (Кожевин и др., 1979; Мирчинк, Паников, 1985; Полянская, 1996; Полянская, Головченко, Звягинцев, 1995; Kjoller, Struwe, 1982).

В настоящее время огромные запасы микробной биомассы, содержащиеся в различных типах почв, являются твердо установленным фактом. Причем биомасса микроорганизмов не сосредоточена преимущественно в верхних гумусированных горизонтах, но относительно равномерно распределена по всему почвенному профилю, вплоть до подстиляющей породы. Показано, что запас микробной биомассы по всему профилю почвы может достигать от нескольких тонн до нескольких десятков т/га сухого вещества в зависимости от типа почвы. Показано, что запасы микробной биомассы представлены в основном биомассой эукариот (88-99%). Доминирование микромицетов отмечается также в работах с применением фумигационного и физиологических методов (Богоев,

Гильманов, 1982; Паников, Палеева, 1986; Anderson, Domsch, 1989; Kjoller, Struwe, 1994; Ананьева и др., 2006). Однако цифры в этих работах приводятся более низкие - 60-80% в кислых почвах. Биомасса прокариот составляет в разных почвах от 1 (каштановая почва) до 12% (серая лесная почва) (Полянская и др., 1995). В биоморфологической структуре микромицетов мицелий (70-99%) доминирует над спорами (1-30%). В прокариотном комплексе актиномицетный мицелий составляет 7-25 % от биомассы бактерий (Никонов и др., 2006).

В последние годы получил развитие биоценологический подход в почвоведении. Появился ряд работ, в которых оценивается биомасса микроорганизмов по всему профилю почв с использованием метода прямой люминесцентной микроскопии (Полянская и др., 1995а, б; Полянская и др., 1998).

Показано, что каждый тип почв характеризуется не только определенным запасом микробной биомассы, но и спецификой ее распределения в пространстве (по профилю) и во времени. Выявлено, что максимум запасов микробной биомассы приходится на минеральные горизонты, благодаря как большему удельному весу, так и большей мощности (толщины) минеральных горизонтов. Распределение биомассы не всегда носит такой характер. В болотных биогеоценозах микробная биомасса относительно равномерно распределена по всей многометровой толще торфа и может достигать сотен т/га. Такое равномерное вертикальное распределение микроорганизмов в болотных экосистемах связано с

органической природой торфяников (Головченко и др., 1993). По данным фумигационного метода в автоморфных лесных почвах на долю гумусового горизонта приходится не более 20-30% от общего запаса микробной биомассы, а в черноземах и гидроморфных – 60-80% (Наумова, 1994).

Анализ профильного распределения микроорганизмов в дерново-подзолистых почвах выявил четкую дифференциацию в накоплении микробной биомассы в зависимости от генетических горизонтов, отличающихся, в числе прочих свойств, степенью почвенной кислотности и содержанием подвижного алюминия. В литературе имеются лишь отрывочные сведения о влиянии почвенной кислотности на обилие микроорганизмов в природных местообитаниях. При изучении микробных комплексов в ненарушенных биотопах Западновинского стационара отмечено влияние кислотности на распределение актиномицетного мицелия по профилю низинного и верхового торфяников (Добровольская, 2002). Сравнение микробных сообществ в разных типах биогеоценозов Окского заповедника выявило максимальную численность бактериальных комплексов в пойменных ландшафтов с более благоприятной реакцией среды (Павлова и др., 2000). Неоднократно отмечалось, что грибы предпочитают развиваться при более высоких концентрациях водородных ионов, чем бактерии и актиномицеты (Аристовская, 1980). Водоросли в процессе жизнедеятельности могут резко менять pH, подщелачивая окружающую среду (Голлербах, Штина, 1969).

Широко распространенные на северо-востоке европейской части

России подзолистые и болотные почвы являются природными биотопами, имеющими кислую и сильноокислую реакцию среды (Широких и др., 2001). Сравнение запасов микробной биомассы различных почв и аналогичное сравнение почвенных горизонтов, различающихся реакцией почвенного раствора и содержанием подвижного алюминия, указывает на имеющуюся зависимость запасов микробной биомассы от степени кислотности почвы. Результаты корреляционного анализа подтверждают наличие в дерново-подзолистых почвах тесной связи между величиной биомассы основных групп почвенных микроорганизмов и показателями, характеризующими степень кислотности почвы. Выявлена тесная положительная ($r=0,56-0,96$) корреляция между значениями pH солевой вытяжки в отдельных горизонтах и содержанием биомассы бактерий, мицелия и спор грибов, мицелия актиномицетов в этих же горизонтах. Зависимость между содержанием в почве подвижного алюминия и накоплением биомассы основных групп микроорганизмов носила обратный характер ($r= -0,45 -0,95$), причем сильнее она была выражена в почве с более высоким содержанием алюминия.

Выявлена тесная корреляционная связь между показателями почвенной кислотности и накоплением биомассы основных групп микроорганизмов по генетическим горизонтам кислых дерново-подзолистых почв. Наиболее значительные изменения в содержании биомассы бактерий и грибного мицелия происходят при переходе от гумусового горизонта к подзолистому, а затем, к иллювиальному горизонту.

Запасы биомассы микроорганизмов в почвах не постоянны, так как их численность меняется в течение года (Мишустин, 1974). Варьирование микробной биомассы обусловлено как временной, так и пространственной изменчивостью. Так, например, увеличению подземной продукции соответствует возрастание среднесезонной величины биомассы микроорганизмов (Титлянова, Тесаржова, 1991). Показано, что сезонное варьирование биомассы не превышает 30-40% (Титлянова и др., 1993). В разных почвах максимум биомассы может приходиться на разные сезоны. Отмечено, что общая микробная биомасса нарастает от января к лету (Mao et al., 1992), при этом максимум бактерий приходится на май-июль, а максимум грибов - на осень (Богоев, 1981; Мехтиев и др., 1974) или на весну и осень (Baath, Soderstrom, 1982). По данным других авторов (Никитина, Антоненко, 1982) летом максимальна численность грибов, а не бактерий. В некоторых случаях не обнаружено весеннего максимума развития микроорганизмов в почве (Аристовская, 1980), что объясняется быстрым расходом и значительным выносом скудных запасов доступных питательных веществ. Известно, что численность микроорганизмов в почвах изменяется не только в связи с сезонными изменениями экологических условий, но и в силу внутренних закономерностей развития микробных популяций. Эти изменения носят характер пульсаций и происходят в течение очень коротких промежутков времени (Мирчинк, Паников, 1985). Наиболее непостоянным уровнем численности и биомассы бактерий отличаются почвы Крайнего Севера.

Здесь биологические процессы развиваются с такой скоростью, что в течение одних двух суток содержание бактерий может увеличиться или уменьшиться в 100-1000 раз (метод посева). Последнее может быть связано не столько с изменением общей численности микроорганизмов, а с изменением физиологического состояния, так как известно, что в связи с выходом популяции из стресса полнота учета (методом посева) может повышаться на несколько порядков.

Исследование заповедных почв в различные годы, особенно сильно различающиеся по условиям увлажнения, позволяет ранжировать факторы содержания микробной биомассы в зависимости от года и сезона, а также дифференцированно исследовать влияние этих факторов в различных почвенных горизонтах (Головченко, Полянская, 2000). Ведущим фактором, определяющим численность микроорганизмов в анализируемых почвах, являлся тип субстрата, далее в порядке убывания следовали климатические особенности года исследования, сезон и тип почвы.

Однако динамика численности микроорганизмов является предметом саморегуляции, а не механическим ответом на условия среды. Высокая способность к саморегуляции в сочетании с избыточной биомассой и избыточным видовым разнообразием является основанием той поразительной устойчивости почвы к внешним воздействиям, которая наблюдается повсеместно и которая отодвигает почвоведение на задворки “Большой экологии”: о почве вспоминают, когда она погибает, т.е. в самую последнюю очередь (Полянская и др., 2001).

Жизнедеятельность почвенного микробного сообщества во многом определяется его структурой, задающей закономерности годовой сукцессии в почве. Но было бы большим упрощением считать, что из года в год в одни и те же сроки воспроизводятся одни и те же сукцессионные события. Сукцессию почвенных микроорганизмов можно охарактеризовать как некий событийный ряд (Полянский, 1998), хорошо воспроизводящийся только в климатической камере и не повторяющийся из года в год в естественных условиях. Главным из факторов, могущих внести коррективы в жизнедеятельность почвенной микробиоты, являются погодные условия, которые могут сильно различаться по годам (Павлова и др., 2000). Изучение межгодовой динамики микроорганизмов в заповедных почвах позволили ранжировать данные по содержанию микробной биомассы в различных генетических горизонтах в зависимости от климатических особенностей года и сезона, а также выявить ведущие экологические факторы, влияющие на структуру микробных сообществ этих почв. Общие запасы микробной биомассы в суглинистых бело-подзолистой почве и буроземе Центрального лесного государственного биосферного заповедника варьировали по годам, в целом, они были выше для более влажного года исследования. Исследуемые почвы различались характером годовой сукцессии микробной биомассы в подстилках (Головченко, Полянская, 2000), микробная биомасса нарастала от весны к осени. Противоположная тенденция в изменении запасов биомассы микроорганизмов в одни и те же сезоны для легких песчаных почв Окского заповедника (в течение годовой сукцессии

численность микроорганизмов уменьшается от лета к осени), возможно, объясняется вымыванием грибного мицелия за пределы почвенного профиля (Павлова, 1998).

В ходе сезонной сукцессии меняется не только общая биомасса, но также и соотношение грибов и бактерий. Влияние сезонных колебаний на плотность микроорганизмов более существенна для подстилок и верхних гумусированных горизонтов, чем для минеральных горизонтов. В суммарной микробной биомассе доминирует грибной мицелий, содержание которого, как правило, увеличивается в несколько раз от весны к осени. В ходе разложения подстилки отношение грибов/бактерии уменьшается (Beare et al., 1990; Neely et al., 1991).

Оценка биомассы микроорганизмов имеет большое значение. Еще в 1975 г. В.А. Ковда писал, что “предстоит большая сложная работа по оценке биомассы и ее состава и, особенно для ответа на вопрос: уменьшается или увеличивается биомасса и в каких частях планеты в наше время”. Знание количества, состава, потенциальной и реальной активности почвенной микрофлоры необходимо для понимания механизмов контролирования состава и функций микробного сообщества, его популяционной динамики (Кожевин, 1989; Kunc, 1994), для управления ростом и активностью микроорганизмов, для использования их в разложении вредных веществ в почве. Данные по микробной биомассе необходимы для изучения флуктуаций энергии и вещества в почвенной популяции, соотношении биомассы и почвенной органики, оценки

микробной продуктивности, вклада биомассы в большие круговороты C,N,P,S и других элементов, роли микроорганизмов как резервуаров питательных элементов (Kunc, 1994; Powlson, 1994). Микробные сообщества – чувствительные экологические маркеры стрессовых ситуаций в почвах, вызванных загрязнением. Важным показателем изменения состояния биологических систем является изменение биомассы различных групп организмов. Среди почвенных микроорганизмов использование подходов биологического мониторинга наиболее возможно для группы грибов. Для почвенных грибов наиболее информативно соотношение биомассы спор и мицелия, которое дает возможность оценить не только суммарную биомассу, но и состояние грибов в почве. В этом случае биомасса спор может дать представление о покоем запасе (пуле) грибов. Изменение же биомассы мицелия может отражать в целом активизацию или ингибирование развития грибов в почве. Еще точнее это может быть определено с учетом метаболически активного (живого) и мертвого мицелия. Но пока все рекомендуемые методы такой дифференциации не являются удовлетворительными и имеют те или иные недостатки (Марфенина, 1994). Разработанный в последние годы метод проращивания грибных спор (Полянская и др., 1998) показал, что большая часть грибной биомассы во всех горизонтах изученных почв жизнеспособна. Процент прорастания мицелия грибов может составлять от 50 (в нижних горизонтах) до 85% - в слоях подстилки, для спор этот показатель существенно выше (70-100%). Присутствие живого мицелия грибов на

глубине 90-100 см, по мнению ряда авторов (Hunt, Fogel, 1983) может говорить о том, что снабжение питанием здесь достаточное для роста грибных гиф.

Углерод микробной биомассы составляет весьма значительную часть общих запасов органического углерода в почвах. Проведенные исследования показали, что доля углерода микробной биомассы в общем содержании органического углерода в минеральных горизонтах достигает от 50 до 70%, а в верхних горизонтах этот показатель существенно ниже (5-17%) (Полянская и др., 1995в). Существенно, что большая часть микробной биомассы почв жизнеспособна и, таким образом, почвы содержат огромные запасы "живого вещества". Следует отметить, что вопрос о природе органического вещества почвы до настоящего времени остается дискуссионным. Взгляд на гумус, как на продукт освоения микроорганизмами растительного субстрата, имеет давнюю историю (Орлов, 1992).

Ни сравнение по запасам микробной биомассы различных почв, ни аналогичное сравнение почвенных горизонтов, резко различающихся гумусированностью, не подтверждает зависимости запасов микробной биомассы от содержания органических веществ (Гейдебрехт, 1999). Этому обстоятельству приводятся разные объяснения. Наиболее простое решение сводится к тому, что далеко не вся микробная биомасса пребывает в активном состоянии, значительная ее часть может находиться в анабиозе, дожидаясь благоприятной стадии сукцессии (Polyanskaya, Zvyagintsev, 1995; Полянская, 1996; Полянская и др., 2001), либо какого-то возмущающего

воздействия в форме поступления необычного вещества или гибели определенных популяций, которые необходимо заменить. Таким образом, избыточному видовому разнообразию (Звягинцев, 1998) соответствует избыточное содержание микробной биомассы как важный фактор устойчивости почвенного микробоценоза в целом (Полянская и др., 1995 а,б). Нельзя не учитывать также то обстоятельство, что значительную часть питания микроорганизмов составляет сама микробная биомасса, на чем и базируется в значительной мере механизм почвенной сукцессии (Polyanskaya, Zvyagintsev, 1995).

Принимая во внимание глобальность почвенного покрова и огромные запасы жизнеспособной грибной биомассы в нем, придется, по-видимому, внести существенные коррективы в расчеты общего количества живого вещества биосферы. Полученные результаты дают основание для переосмысления роли царства грибов в биосферных процессах, так как, неизмеримо превосходя по биомассе весь остальной микробоценоз почвы, грибы являются важным средообразующим фактором и, проводя свою деятельность по разложению полимерных соединений, они поддерживают и определяют практически всю биохимическую активность почвенных микроорганизмов в отношении использования органического вещества.

Интересные результаты были получены при изучении микроорганизмов пахотных почв (Полянская и др., 1997). При распашке почв уничтожаются не только прежние фито- и зооценозы (Звягинцев, 2001), но резко меняются и микробоценозы. Биомасса грибов сокращается почти на

порядок и доля биомассы прокариот относительно увеличивается. Уменьшается микробное разнообразие (Марфенина, 1994). Все это заставляет систему функционировать по-новому. Особенно большие изменения происходят тогда, когда в почву вносят различные химические вещества. Существенные сдвиги в составе и численности почвенных микроорганизмов сельскохозяйственных угодий являются важным симптомом нарушений естественных процессов поддержания плодородия почв. Для решения проблем охраны окружающей среды необходимо изучение эталонных образцов ненарушенной природы со стабильными биотическими сообществами, чтобы иметь возможность выявлять степень их разрушения при различного рода антропогенных воздействиях. Микроорганизмы могут быть чуткими индикаторами таких нарушений.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что характер местообитания существенно влияет на параметры микробного комплекса, при этом играет роль и характер растительности, и окультуренность и мезорельеф (Свешникова и др., 2001 а, б). Показано, что ненарушенные почвы характеризуются высоким содержанием микробной биомассы с абсолютным преобладанием эукариот, в первую очередь грибного мицелия. На этом фоне высока и общая численность бактерий. Сезонная динамика содержания микроорганизмов в этих почвах определяется типом почвы (в особенности механическим составом), наземной растительностью и погодными условиями. Эти результаты подтверждают результаты исследований Центрального биосферного государственного и Окского

заповедников (Головченко, Полянская, 1996; 2000; Полянская и др., 1995; Павлова и др., 2000; Никонов и др., 2006).

В окультуренных почвах общее содержание микробной биомассы существенно ниже. Здесь также преобладает мицелий грибов, но доля грибных спор достигает в отдельные сезоны десятков процентов. Относительно высока и доля прокариотных микроорганизмов. Распашка настолько изменяет ситуацию, что тип почвы здесь не определяет сезонную динамику содержания микроорганизмов, большое значение имеют факторы окультуривания (особенно известкование) и севооборот.

Таким образом, в условиях антропогенной нагрузки организация микробных комплексов изученных почв выражается в увеличении значимости прокариотных форм. Микробиоты оказываются наиболее чувствительной к загрязнению группой почвенных микроорганизмов.

Можно полагать, что описанные различия в общем содержании и структуре микробной биомассы на различных угодьях коррелируют с разнонаправленными процессами, определяющими судьбу ненарушенных и эксплуатируемых почв (Звягинцев, 2001). В первом случае предполагается равновесное состояние с тенденцией к постепенному увеличению почвенного массива и накоплению компонентов гумуса в верхних горизонтах. На распаханых площадях в условиях усиления антропогенной нагрузки происходит постепенная деградация (Полянская, Звягинцев, 2005).

ГЛАВА 3. ПОЧВЕННЫЕ МИРООРГАНИЗМЫ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВОДОРОД

Тремя главными компонентами физического состава почв являются вода, твердые частицы и почвенный воздух. В отличие от твердых частиц, газовая фаза почв весьма изменчива, и требует постоянного контроля и анализа своей динамики; вариации и колебания в ней способны происходить за дни и часы. Имея большую поверхность контакта с атмосферой, почва способна влиять на концентрацию газов в атмосферном воздухе. Почвенный воздух, участвуя в процессах регуляции газообмена на Земле, имеет высокую практическую значимость в вопросах сельского хозяйства (снабжение растений и почвенных организмов кислородом, баланс между водой и воздухом и др.), а также в более глобальных экологических проблемах, таких как парниковый эффект, изменение климата, загрязнение окружающей среды (Смагин, 2005). Важной проблемой является разрушение озонового слоя планеты (Сывороткин, 2013).

Наряду с основными газами (азот, кислород, аргон, углекислый газ, пары воды), в почвенном воздухе присутствуют и микрогазы, такие как CO, NO₂, H₂S, CH₄, органические углеводороды и др., доля которых не превышает 10⁻² % (100 ppm) от общего объема воздуха. (Смагин, 2005) Молекулярный водород является важной составляющей комплекса микрогазов. Почвенные микроорганизмы за счет процессов метаболизма

способны как производить, так и потреблять H_2 , тем самым активно участвуя в круговороте молекулярного водорода в природе.

Задача по учету и оценке точного содержания водорода, представляется весьма затруднительной, так как газообмен – процесс непрерывный, а водород, произведенный одними организмами, быстро потребляется другими формами либо трансформируется в иные соединения (Seiler, 1976; Cole, 1976; Заварзин, 1978). Кроме того, природная продукция водорода зависит от условий среды, таких как влажность, температура, наличие и состав микроорганизмов, эндогенные эксгаляции, и в разных зонах и локусах ее величина будет различной. Обнаружить H_2 удастся лишь с помощью высокочувствительных приборов (Роль организмов в газообмене почв, 1986).

Тем не менее, в научной литературе присутствуют такие данные. Образование молекулярного водорода на Земле составляет примерно 33×10^6 т в год. Значительная часть водорода на Земле образуется в результате антропогенной деятельности. При общем содержании в тропосфере в количестве $2,2 \times 10^9$ т, его концентрация весьма мала и составляет 0,55-0,56 ppm, что соответствует 55 мПа. Содержание молекулярного водорода в почвах обычно еще меньше (< 1 мПа) (Кондратьева, 1996). По данным других ученых в автоморфных почвах оно составляет $1-8 \times 10^{-6}$ % (0,1-0,8 ppm) (Каспаров, Паников, 1985).

3.1. Производство H_2 в почве

Доля молекулярного водорода, продуцируемая различными микроорганизмами, составляет 10-18% от общего содержания (Seiler, 1978; Liebl, Seiler 1976; Conrad, Seiler, 1981). По данным (Seiler, 1976) 4×10^6 т водорода образуется микроорганизмами почв и водоемов. Позже ученые установили значение глобальной продукции водорода почвенными микроорганизмами от 16 до 120 Тг/год ($16 - 120 \times 10^6$ т/год) (Бабьева, Зенова, 1989).

Водород в почвенной бактериальной системе производится первичными анаэробами – строгими и факультативными – бродильщиками, осуществляющими первоначальное разложение субстрата (Заварзин, 1984). Основные процессы, ответственные за производство этого газа в почве – маслянокислое, ацетонобутиловое, бутандиоловое брожение (Каспаров, Паников, 1985). Чаще всего в качестве субстратов при сбраживании используются углеводы (сахара, крахмал, пектин, целлюлоза и др.), в результате чего образуются органические кислоты, CO_2 и H_2 , иногда используются азотсодержащие соединения (пептиды, аминокислоты, пурины, пиримидины) (Кондратьева, Гоготов, 1981).

Наибольшее число хемотрофных водородообразующих бактерий относится к строгим анаэробам, но присутствуют и факультативно анаэробные бактерии (напр., сем. Enterobacteriaceae). Одним из наиболее известных продуцентов H_2 являются представители рода Clostridium (Мишустин, Емцев, 1974; Ohwaki, Hungate, 1977).

Кроме того, водород образуется при осуществлении хемотрофами процесса азотфиксации, при помощи фермента нитрогеназы, способной катализировать помимо восстановления N_2 и ряд других соединений, включая протоны. Это и приводит к выделению H_2 азотфиксаторами (Burris, 1977; Пиневич, 2005). К примеру, водород выделяют аэробные бактерии рода *Rhizobium*, которые содержатся в клубеньках некоторых бобовых растений (Schubert, Evans, 1977; Dixon, 1978). Образование небольшого количества H_2 отмечена и у аэробных свободноживущих азотфиксаторов, таких как *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter vinelandii* (Smith et al., 1976).

3.2. Потребление H_2 в почве

Использование H_2 микроорганизмами может достигать 500×10^6 т в год (Заварзин, 1979), при этом потребление водорода в некоторых почвах составляет 120×10^6 т в год (Seiler, 1976).

Среди водородопотребляющих организмов выделяют строгих анаэробов, факультативных анаэробов и аэробов. Для большинства хемотрофов процесс окисления водорода связан с получением энергии (Крндратьева, Гоготов, 1981). Также выделяют еще два типа: бактерии, нуждающиеся в органических веществах для биосинтеза, но способных использовать H_2 как единственный источник энергии и микроорганизмы, использующие H_2 в качестве дополнительного источника энергии и в качестве донора электронов для определенных реакций (Заварзин, 1972).

Группу бактерий, являющихся хемолитоавтотрофами, и использующими водород для получения энергии в аэробных условиях принято называть водородными бактериями (Заварзин, 1972; Гусев, Минеева, 2003). Впервые такие микроорганизмы были описаны и выделены в начале XX века (Kaserer, 1906; Лебедев, 1910). К водородным бактериям относят более двадцати видов, относящихся к разным систематическим группам, разной морфологии, подвижности, способности к спорообразованию. Среди них преобладают грамотрицательные бактерии класса *Proteobacteria*, например, представители таких родов как *Aquaspirillum*, *Paracoccus*, *Hydrogenophaga*, *Xanthobacter* и других. Грамположительные бактерии представлены родами *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Bacillus* и др. (Заварзин, 1978).

Оптимальное значение pH среды для основной части водородных бактерий 6,5 - 7,2, они являются нейтрофилами, однако, отдельные виды способны к жизнедеятельности в условиях pH ниже 5,0 и выше 8,0. Преимущественно они являются мезофилами с оптимальной температурой для роста 27-35°C, однако известны и термофилы (*Flavobacterium autothermophilum*, *Pseudomonas thermophila*) (Кондратьева, 1996).

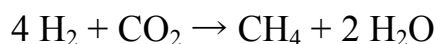
Способность к окислению H_2 связана с наличием фермента гидрогеназы, катализирующей обратимую реакцию $H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$. Активность гидрогеназ, а, соответственно, и способность бактерий к использованию H_2 может ингибироваться различными факторами, например, влияет количество в атмосфере кислорода (Schlegel, Eberhardt, 1972).

Использование водородными бактериями H_2 может зависеть от природы имеющихся субстратов. В некоторых случаях водород оказывает ингибирующее действие на использование гидрогеназ, что приводит к замедлению, а иногда и прекращению роста бактерий (Schlegel, Eberhardt, 1972; Заварзин, 1978; Кондратьева, Гоготов, 1981).

За немногим исключением водородные бактерии являются факультативными хемолитоавтотрофами и помимо H_2 и CO_2 способны использовать органические вещества, а некоторые окислять соединения серы. Также известны и другие микроорганизмы, способные к окислению молекулярного водорода. Поэтому степень участия водородных бактерий в окислении H_2 в природных условиях полностью не установлена (Кондратьева, 1996). Способность к энергетическому использованию H_2 может сочетаться с конструктивным метаболизмом облигатного гетеротрофного типа (например, у представителей родов *Azotobacter* и *Acetobacter*) или происходить в строго анаэробных условиях (сульфатвосстанавливающие бактерии), таким образом, водородные бактерии представляют только часть эубактерий, способных использовать H_2 для получения энергии (Гусев, Минеева, 2003).

Среди анаэробных микроорганизмов, потребляющих H_2 , выделяют метанобразующие бактерии, относящиеся к архебактериям. Из природных территорий их местами обитания являются бескислородные зоны водоемов, иловые отложения, заболоченные почвы и болота (Заварзин, 1972; Розанова, 1978; Беляев, 1979). Подавляющее большинство метаногенов – нейтрофилы,

с оптимальным pH=6,5-7,5. Температурный оптимум для роста у них находится в области 30-40°C (мезофилы). Универсальными источниками углерода и энергии для практически всех метаногенов являются CO₂ и H₂. В результате углекислота восстанавливается до метана (Гусев, Минеева, 2003):



3.3. Эксперименты, проводимые с молекулярным водородом в почве

Модельные опыты по взаимодействию молекулярного водорода с почвой проводились неоднократно.

Поглощение почвой водорода из атмосферы выявило следующую закономерность. В начальный период времени скорость потребления относительно мала, затем увеличивается и с уменьшением вводимой концентрации водорода над почвой постепенно вновь снижается. Масса водорода в H₂-потребляющих центрах в почве экспоненциально снижается с увеличением влажности почв, что указывает на уменьшение числа активных H₂-потребляющих центров в почве (предположительно, ими являются водородопотребляющие микроорганизмы) по мере увеличения ее влажности. (Фармаковский и др., 1989)

Показано, что цианобактериальная пленка на поверхности почвы способна потреблять водород. В опытах водород помещался под стеклянной пористой пластиной, на которую клали цианобактериальную пленку. Способность бактериального фильтра поглощать газ сильно изменчива во

времени: наибольшая величина каталитической активности достигалась в период размножения культуры. Затем она падала и поддерживалась на уровне $1/2 - 1/3$ максимальной (Роль организмов в газообмене почв, 1986).

Проведение других экспериментов обнаружило, что при повышении концентрации H_2 в воздухе, газ поглощается почвой, а при понижении – наоборот, выделяется. Следовательно, H_2 атмосферы находится в состоянии равновесия с почвой, однако этот эффект исчезает в условиях стерилизации почвы. При внесении в почву культур водородных бактерий, поддерживающихся в лаборатории, способность к поглощению H_2 не восстанавливается (Роль организмов в газообмене почв, 1986)

По данным Либля (Liebl, Seiler, 1976) водород при концентрации, близко к естественным фоновым концентрациям, экспоненциально поглощается почвой до достижения концентрации $20-30 \times 10^{-9}$ частей по объему (Заварзин, 1978).

Была также сделана попытка установить нижний предел концентрации водорода, при котором могут развиваться водородные бактерии. Через колбу с суспензией 80×10^6 клеток/мл пропускали газ, содержащий от $2,4 \times 10^{-4}$ до $63 \times 10^{-4} \%$ водорода и определяли прирост числа клеток. У *Bacillus hydrogenas* развитие начиналось только при $57 \times 10^{-4} \%$ водорода в газовой фазе при скорости поглощения 30×10^{-12} мл/час/клетка. А при увеличении содержания водорода до соотношения гремучей смеси скорость потребления водорода возрастала в 1000 раз (Заварзин, 1978).

Существует работа, посвященная изучению образования молекулярного водорода над почвой (гор. А и Апах чернозем южный) в зависимости от ее влажности и наличия углеводной добавки. В отсутствие глюкозы почва производила H_2 в незначительных количествах, а при ее добавлении наблюдалось выделение из почвы в заметных количествах H_2 (до 10×10^{-3} мг/г), начиная с влажности 60% и выше. Процесс выделения H_2 начинался через 1,5-2 суток с момента установки эксперимента, в течение которых происходило поглощение микробами O_2 и формирование в почве анаэробных условий. При этом максимум достигался на 4-5 сутки и практически прекращался на 8-10 сутки. С ростом влажности почвы от 40% до затопления количество образованного почвой молекулярного водорода закономерно возрастает (Минько, 1992).

В лабораторном эксперименте Канивец показано, что молекулярный водород способен снижать окислительно-восстановительный потенциал почвенной среды до крайне низких значений, при этом не оказывая значимое влияние на pH почв. На воздухе окислительно-восстановительный потенциал в насыщенных водородом средах повышается, достигая начальных величин через 1-2 суток (Канивец, 1970).

Очевидно, что почва служит геохимическим барьером между литосферой и атмосферой, и в ней происходит трансформация поступающих газов, продукционные и деструкционные процессы. Значительную роль в этих процессах играют почвенные микроорганизмы, в результате их деятельности газовая фаза почв подвержена быстрым и легким изменениям

(Роль организмов в газообмене почв, 1986). Поведение в почве водорода, являющегося важным газовым метаболитом, анализировалось разными учеными, однако сейчас особого внимания требует изучение эндогенных потоков молекулярного H_2 в связи с данными геологов об усиливающейся водородной дегазации Земли и поступлении больших количеств этого газа (Ларин, 2005).

ГЛАВА 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Почвы

В качестве объектов исследования были взяты:

1. Чернозем выщелоченный (Нижегородская область, Болдино): 25-летняя, 16-летняя, 10-летняя залежь и пашня (Классификация и диагностика почв СССР, 1977). Залежные участки чернозема выщелоченного разнесены в пространстве, поэтому пробы отбирались попарно: на залежном участке и на расположенной рядом пашне.

2. Дерново-карбонатная почва (Пермский край): регулярная пашня и 10-летняя залежь (Классификация и диагностика почв СССР, 1977).

В пробах определено общее содержание органического углерода и легкоразлагаемого органического вещества (детрита). Данные свидетельствуют о том, что по мере нахождения пахотной почвы в залежном состоянии, в верхних горизонтах происходит накопление общего содержания органического углерода и легкоразлагаемого органического вещества (детрита), хотя скорость и интенсивность этого процесса различны (табл. 1).

3. В работе также были использованы серая лесная почва (Липецкая область) (Классификация и диагностика почв СССР, 1977) и почвы черноземного ряда (Волгоградская область) в зоне выхода водорода на поверхность (Классификация и диагностика почв СССР, 1977).

Табл. 1. Прирост общего содержания органического углерода и легкоразлагаемого органического вещества (по сравнению с пашней) в верхних горизонтах чернозема выщелоченного и дерново-карбонатной почвы.

Залежь, лет	С _{общ} , % от почвы	ЛОВ, % от почвы
Чернозем выщелоченный		
25	0.76	0.86
16	0.43	0.40
10	1.62	0.20
Дерново-карбонатная почва		
10	0.76	1.07

Западина в Липецкой области расположена на бывшей пашне, оставленной под залежь не менее десяти лет назад. Почва серая лесная, легкосуглинистая, развита на песках. Размеры западины: диаметр – 250 м, глубина – 1 м, было заложено 5 почвенных разрезов по трансекте, пересекающей западину с выходом водорода. Разрезы 1-3 расположены по склону на месте выхода водорода в области белесого кольца, разрез 4 заложен непосредственно в центре западины, где наблюдается периодическое избыточное переувлажнение, а разрез 5 – на плато вне западины на расстоянии 20 метров от нее. Исследовано 5 образцов серой лесной почвы (схема расположения разрезов исследуемых почв – рис. 4, 5): серая лесная оподзоленная (рис. 6, разрез 1), серая лесная гумусово-псевдофибровая (рис. 7, разрез 2), серая лесная (рис. 8, разрез 3) серая лесная глеевая (рис. 9, разрез 4) и серая лесная почва (рис. 10, разрез 5).

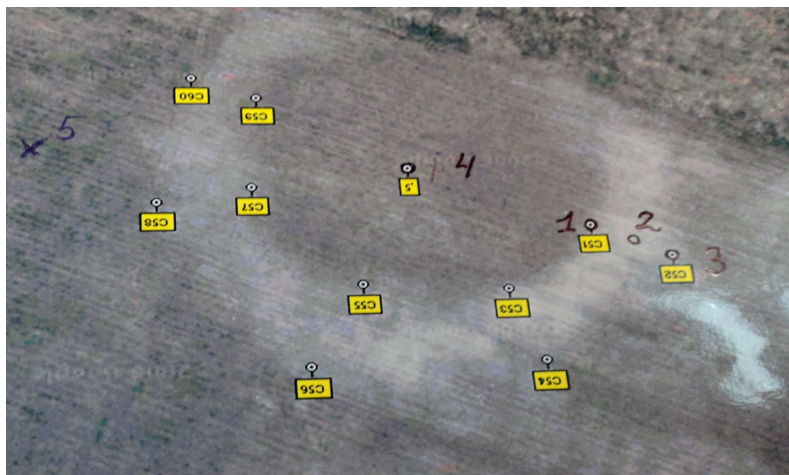


Рис. 4. Расположение разрезов в Липецкой области.

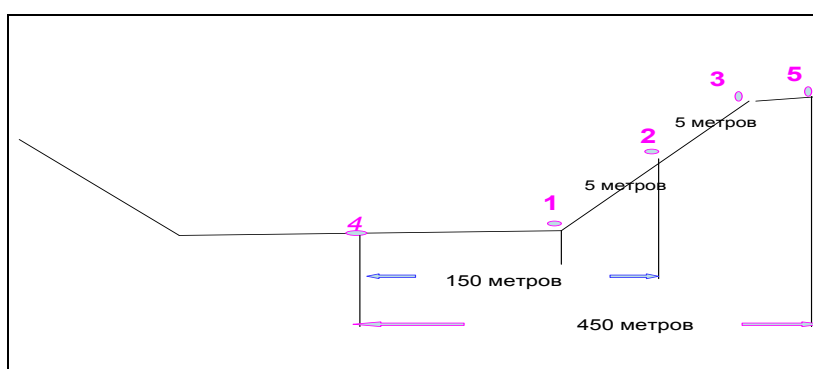


Рис. 5. Схема расположения разрезов по рельефу (Липецкая обл.).



Рис. 6. Серая лесная
оподзоленная почва (разрез 1).



Рис. 7. Серая лесная
гумусово-псевдофибровая
почва (разрез 2).



Рис. 8. Серая лесная почва
(разрез 3).



Рис. 9. Серая лесная глеевая
почва (разрез 4).



Рис. 10. Серая лесная почва
(разрез 5).

В серых лесных почвах имелись данные по содержанию органического углерода и значения рН (табл. 2). Видно, что в разрезах, где шло выделение водорода (разрезы 1, 2 и 3), содержание углерода в верхних горизонтах в 2,5 раза ниже, чем в фоновых почвах, рН почв при этом меняется незначительно. Предположительно, это связано с деструктивным воздействием водорода на органическое вещество почв (Суханова и др., 2013).

4. В Волгоградской области для исследования были отобраны образцы двух катен. Первая катена пересекает западину диаметром 100 м и глубиной

– 40–60 см, расположенной на залежи. Разрез 1 с выделением водорода был заложен в центре западины (лугово-черноземная почва), разрезы 2 и 3 (чернозем обыкновенный) расположены на удалении. Вторая катена пересекает западину диаметром около 20 м и глубиной 40 см, расположенной на пашне. Разрез 4 (с выделением водорода) представлен лугово-черноземной почвой в центре западины, разрез 5 (на удалении) – черноземом обыкновенным.

5. Для модельного опыта по созданию избыточного переувлажнения объектом послужил чернозем типичный (целина) (Классификация и диагностика почв СССР, 1977). Образцы чернозема типичного были отобраны из Центрально-Черноземного Государственного природного биосферного заповедника имени Алехина, Курская область. Эксперимент проводили на образцах почвы взятой из горизонтов А (0-5 см), А' (20-30 см), В (100-105 см), В (195 см).

6. Для модельного опыта по продуванию почвы водородом был использован чернозем обыкновенный среднемощный среднегумусный среднесуглинистый на лессовидных карбонатных суглинках из ФГБНУ «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Центрально-Черноземной полосы имени В.В.Докучаева» (Каменная Степь), Воронежская область. Образцы были взяты из-под лесной полосы с глубины 0-50 см (горизонт А) (Зборищук, 2007; Классификация и диагностика почв СССР, 1977).

Табл. 2. Содержание органического углерода и значения pH серых лесных почв (Суханова и др., 2013).

№ разреза, почва	Горизонт	Глубина, см	C, %	pH
Разрез 1 (H ₂) Серая лесная оподзоленная	A _{пах}	0-24	0,42	7.17
	A _{п/п}	24-44	0,41	6.90
	A	44-61	0,34	7.24
	AE	62-105	0,20	6.99
	B1	105-150	0,16	6.10
	B2	150-200	0,23	5.99
Разрез 2 (H ₂) Серая лесная гумусо- псевдофибровая	A _{пах}	0-23	0,45	7.48
	A _{п/п}	23-41	0,35	7.66
	A	41-68	0,20	7.40
	E	68-135	0,10	7.50
	B	135-170	следы	7.15
Разрез 3 (H ₂) Серая лесная	A _{пах}	0-22	0,57	7.52
	A _{п/п}	22-32	0,24	7.52
	AE	33-84	0,27	7.38
	B	85-117	0,08	7.13
Разрез 4 Серая лесная глеевая	A _{пах}	0-22	1,37	6.78
	A _{п/п}	22-44	0,62	6.84
	E	44-75	0,26	6.47
	B	75-104	0,28	6.51
Разрез 5 Серая лесная	A _{пах}	0-22	1,15	6.24
	A _{п/п}	22-42	0,93	6.45
	AB1	42-65(79)	0,47	6.86
	B1	65(79)-104	0,26	7.08
	BC	104-150	0,05	5.61

4.2. Методика определения численности и биомассы микроорганизмов методом люминесцентной микроскопии

В качестве основного приема предварительной обработки образцов (просеянных через 0,25 мм) для микробиологического анализа использовали ультразвуковое диспергирование на низкочастотном диспергаторе типа УЗДН-1 (22 кГц, 0,44 А, 2 мин) (Звягинцев, 1968). Общее количество микроорганизмов определяли с помощью метода люминесцентной микроскопии.

Препараты готовили обычным способом (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991). Суспензии образцов почвы (1:100) наносили микропипеткой на тщательно обезжиренные предметные стекла (0,02 мл на препарат для бактерий и 0,04 мл на препарат для грибов) и равномерно распределяли петлей на площади 4см². Фиксирование препаратов на пламени горелки проводили после полного их высыхания. Для одного образца готовили 12 препаратов. Для каждого стекла просматривали по 150 полей зрения (рис. 11). Препараты для подсчета бактерий и мицелия актиномицетов окрашивали раствором акридина оранжевого (1:10000, в течение 2–3 минут), для учета спор и мицелия грибов — калькофлуором белым (Fluorescent Brightener 28) в течение 15 минут (Lundgren, 1981; Elorsa et al., 1983; Chrzanowski et al., 1984; Полянская, 1988).

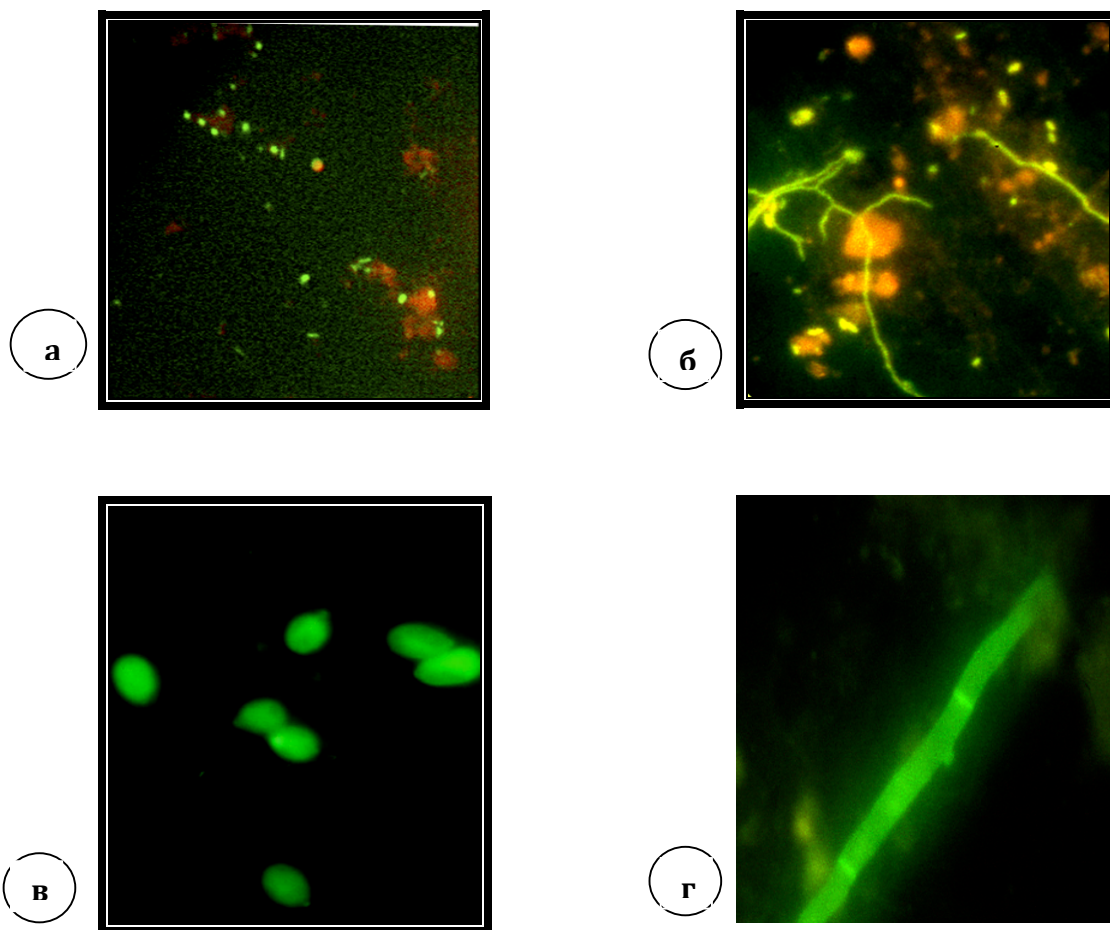


Рис. 11. Клетки бактерий (а), мицелий актиномицетов (б), окрашенные красителем акридином оранжевым, споры (в) и мицелий грибов (г), окрашенные красителем калькофлуором белым, при просмотре препаратов в люминесцентном микроскопе. Увеличение $\times 1000$.

Расчет количества клеток (мицелия) на 1 г почвы производили по формуле:

$$N = S_1 \cdot a \cdot n / v \cdot S_2 \cdot c,$$

где: N — число клеток (длина мицелия, мкм) на 1 г почвы; S_1 — площадь препарата (мкм^2); a — количество клеток (длина мицелия, мкм) в одном поле зрения (усреднение производится по всем препаратам); n — показатель разведения почвенной суспензии (мл); v — объем капли,

наносимой на стекло (мл); S_2 — площадь поля зрения микроскопа (мкм^2); c — навеска почвы (г).

Расчеты биомассы проводили, учитывая, что биомасса сухого вещества для одной бактериальной клетки объемом $0,1 \text{ мкм}^3$ составляет 2×10^{-14} г, 1 м актиномицетного мицелия диаметром $0,5 \text{ мкм}$ $3,9 \times 10^{-8}$ г (Кожевин и др., 1979). С учетом замеренного диаметра спор и мицелия грибов реальную биомассу вычисляли по формуле: для споры — $0,0836 \text{ г}^3 \times 10^{-11}$ г, для 1 м грибного мицелия — $0,628 \text{ г}^2 \times 10^{-6}$ г (Полянская, 1996).

4.3. Методика определения численности и биомассы микроорганизмов методом «каскадной фильтрации»

При определении численности и размеров бактерий использовался метод «каскадной» фильтрации, фильтровали почвенную суспензию через фильтры с диаметром пор $1.85, 1.45, 0.43, 0.38, 0.23$ и 0.2 мкм и мембранные «Синпор» с диаметром пор 0.17 мкм с помощью колбы Бунзена и водоструйного насоса. Собственную люминесценцию фильтров гасили окрашиванием насыщенным спиртовым раствором Судана черного (Feinchemie K. - H. Kallies KG, Germany) помещая в этот раствор на несколько суток, затем их промывали в стерильной воде, подсушивали и использовали для дальнейшей фильтрации (Полянская и др., 2013).

На поверхность сеточки металлического фильтра колбы Бунзена помещали четыре слоя фильтровальной бумаги, сверху фильтр (ядерный или мембранный), который прижимали к поверхности прибора с помощью

металлического кольца, и добавляли фильтруемую суспензию. Фильтрацию суспензии проводили последовательно от фильтра с большим размером пор к меньшему, фильтр с размером пор 1.85 мкм использовали исключительно для удаления крупных частиц почвы из суспензии.

Пропускали окрашенную акридином оранжевым (1: 10000, в течение 2 - 3 мин) суспензию, учитывали клетки бактерий в 30-и полях зрения (рис. 12), условно принимая размеры клеток, равными диаметру пор фильтра, на котором они осаждались. В расчетах принимали, что клетки имеют шаровидную форму (Полянская и др. 2012).

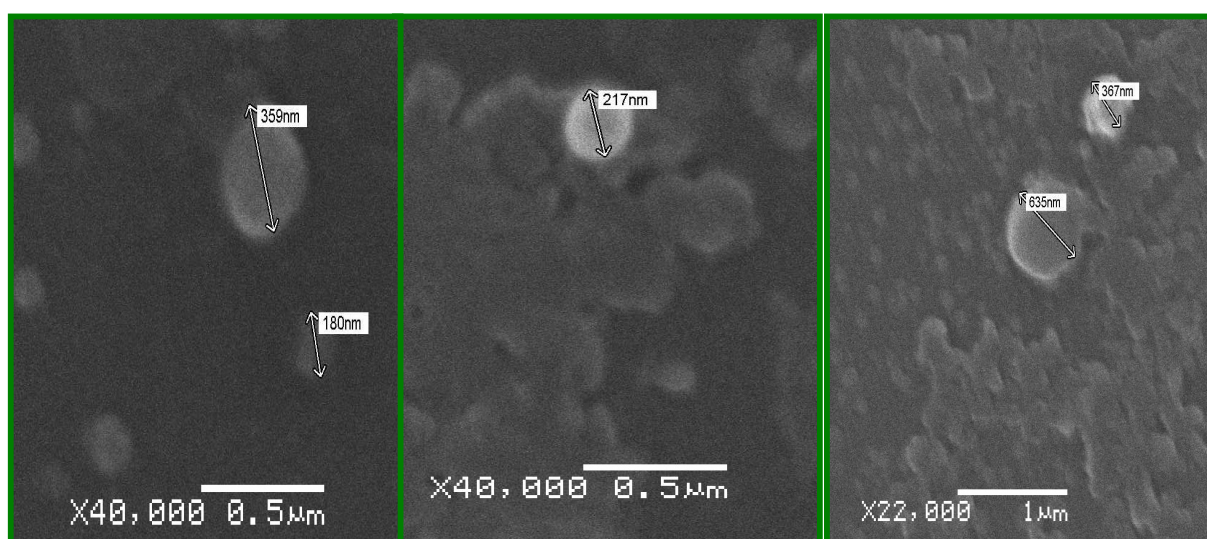


Рис. 12. Клетки из фильтратов типичного чернозема (пашня), выявляемые методом сканирующей электронной микроскопии.

Расчет числа клеток на 1 г почвы проводили по формуле:

$$N = \frac{S_1 \times a \times n}{V \times S_2 \times c},$$

где: N – число клеток на 1 г почвы; S_1 – площадь фильтра, мкм²;

a – количество клеток в одном поле зрения (усреднение производится по

всем полям); n – показатель разведения почвенной суспензии (мл); V – объем профильтрованной суспензии, мл; S_2 – площадь поля зрения микроскопа (мкм^2); s – навеска почвы (г). Зная площадь фильтра и площадь поля зрения микроскопа, в итоге формула для расчета численности приобретала следующий вид:

$$Nb = a \times 1,13 \times 10^7$$

При расчетах веса бактерий по обычной методике сухой вес бактериальной клетки объема 0.1 мкм^3 принимается равным $2 \times 10^{-14} \text{ г}$ (Кожевин и др., 1979). В настоящей работе сухую биомассу рассчитывали, учитывая размеры клеток бактерий. Исходя из размеров пор каждого фильтра, находили биомассу одной клетки бактерии на каждом фильтре, а с учетом их численности, находили биомассу всех клеток по формуле:

$$B_b = \frac{3}{4} \pi r^3 \times 2 \times 10^{-14} \div 0.1 \times N_b$$

где b – размер каждой фракции, r – радиус, N – численность, B – биомасса.

Средний объем одной клетки рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{B_{\text{общ}}}{N_{\text{общ}} \times a}$$

где $B_{\text{общ}}$ и $N_{\text{общ}}$ – биомасса и численность всех фракций, a – плотность одной клетки, $a = 1 \times 10^{-12} \text{ г/см}^3$, V – средний объем одной клетки.

Статистическую обработку результатов учета численности бактерий и длины мицелия актиномицетов и грибов, а также их спор проводили с использованием программ STATISTICA 6.0 и Excel 2010 общепринятыми

методиками (определение среднего, дисперсии, доверительных интервалов). Для численности бактерий доля среднего квадратического отклонения δ ($n-1$) не превышала 10%, для мицелия и спор грибов, а также актиномицетного мицелия — 15%.

4.4. Модельный опыт по продуванию почвы водородом

Для получения водорода в лабораторных условиях использовался генератор водорода типа сгс-2 (рис. 13).

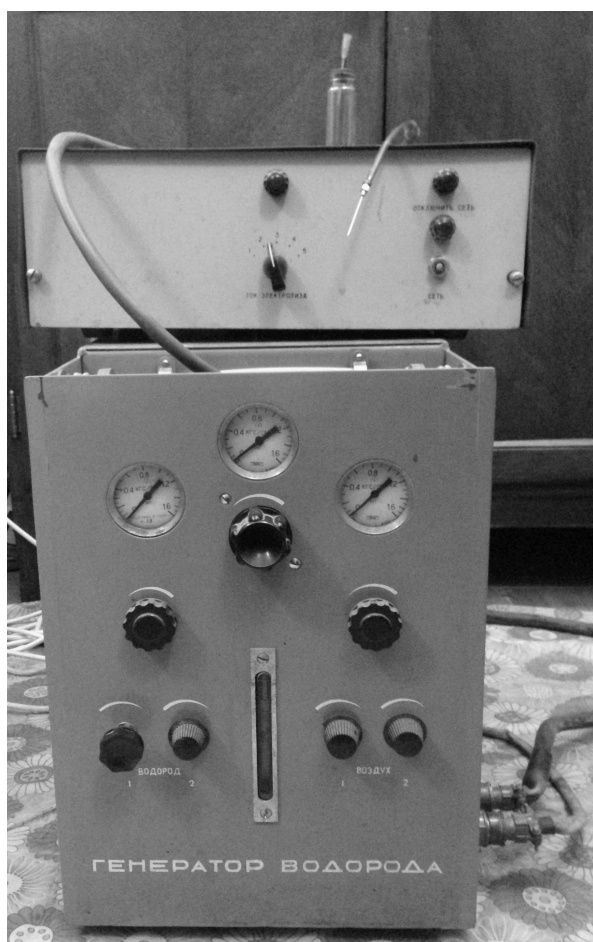


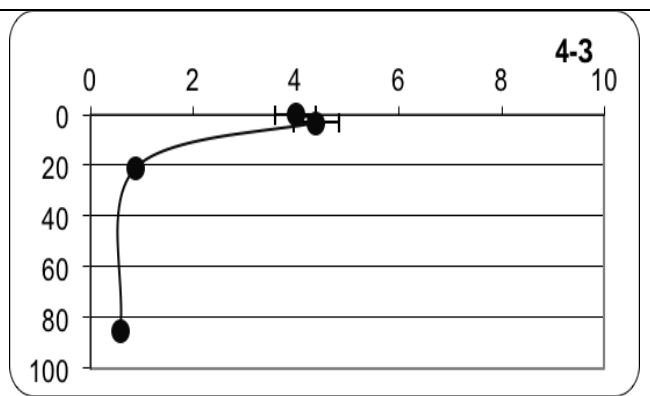
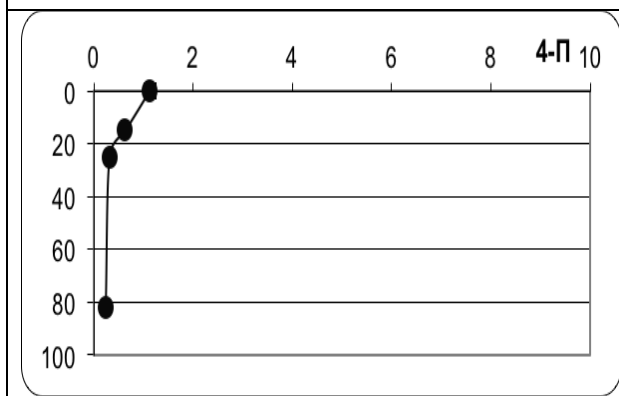
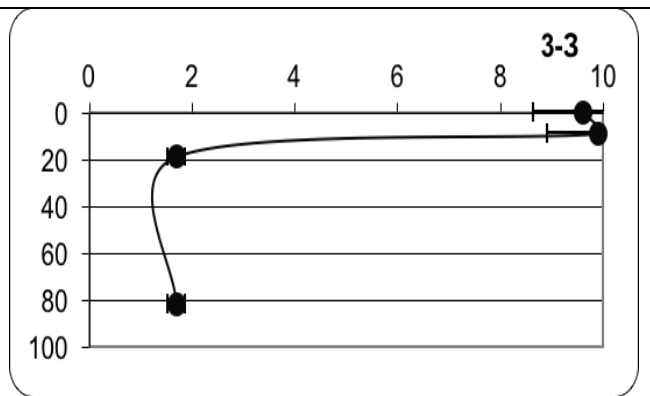
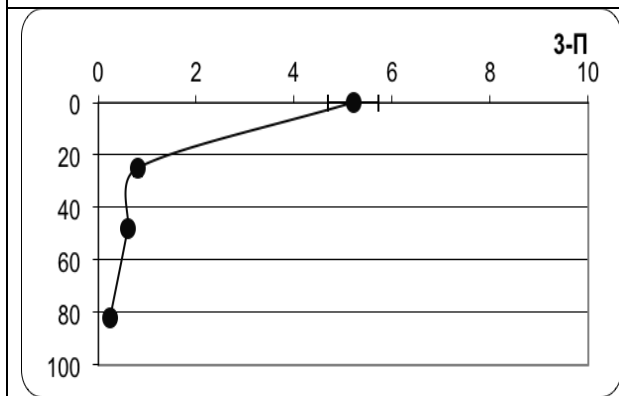
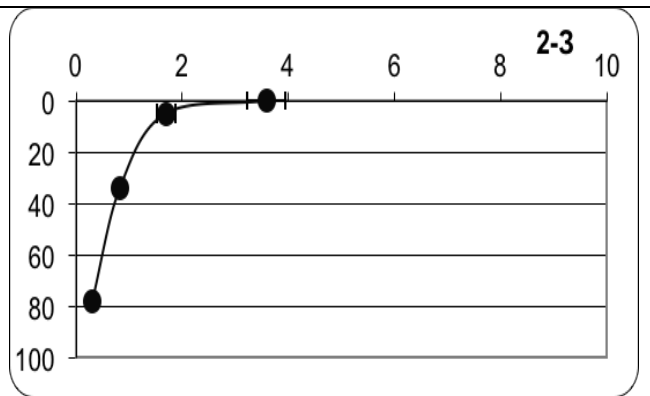
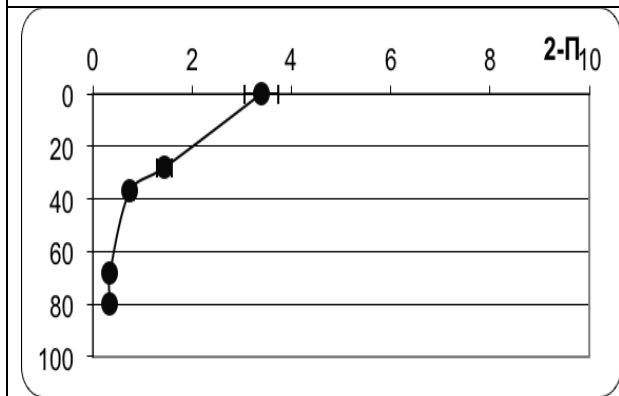
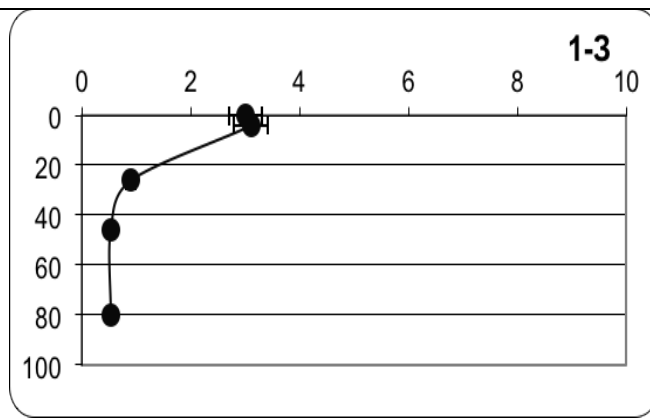
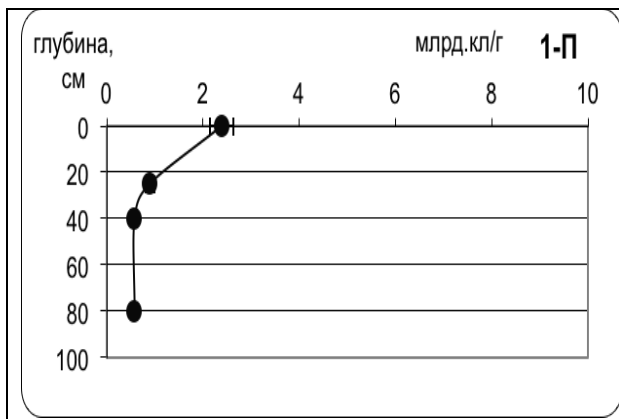
Рис. 13. Генератор водорода типа сгс-2.

В пенициллиновые флаконы объёмом 15 мл помещалась навеска почвы массой 5г, увлажненная до полевой влагоемкости, флаконы герметично закрывались резиновой пробкой, и газовая фаза над почвой замещалась молекулярным водородом. Образцы продували водородом в течение 5 минут через каждые 48 часов, скорость потока составляла 100 мл/мин. Образцы инкубировали в термостате при $t=28^{\circ}\text{C}$ в течение 30 суток, пробы для анализа отбирались на 0, 3, 7, 14, 21 и 30 сутки. Для достоверности данных пробы были взяты в 3-х повторностях.

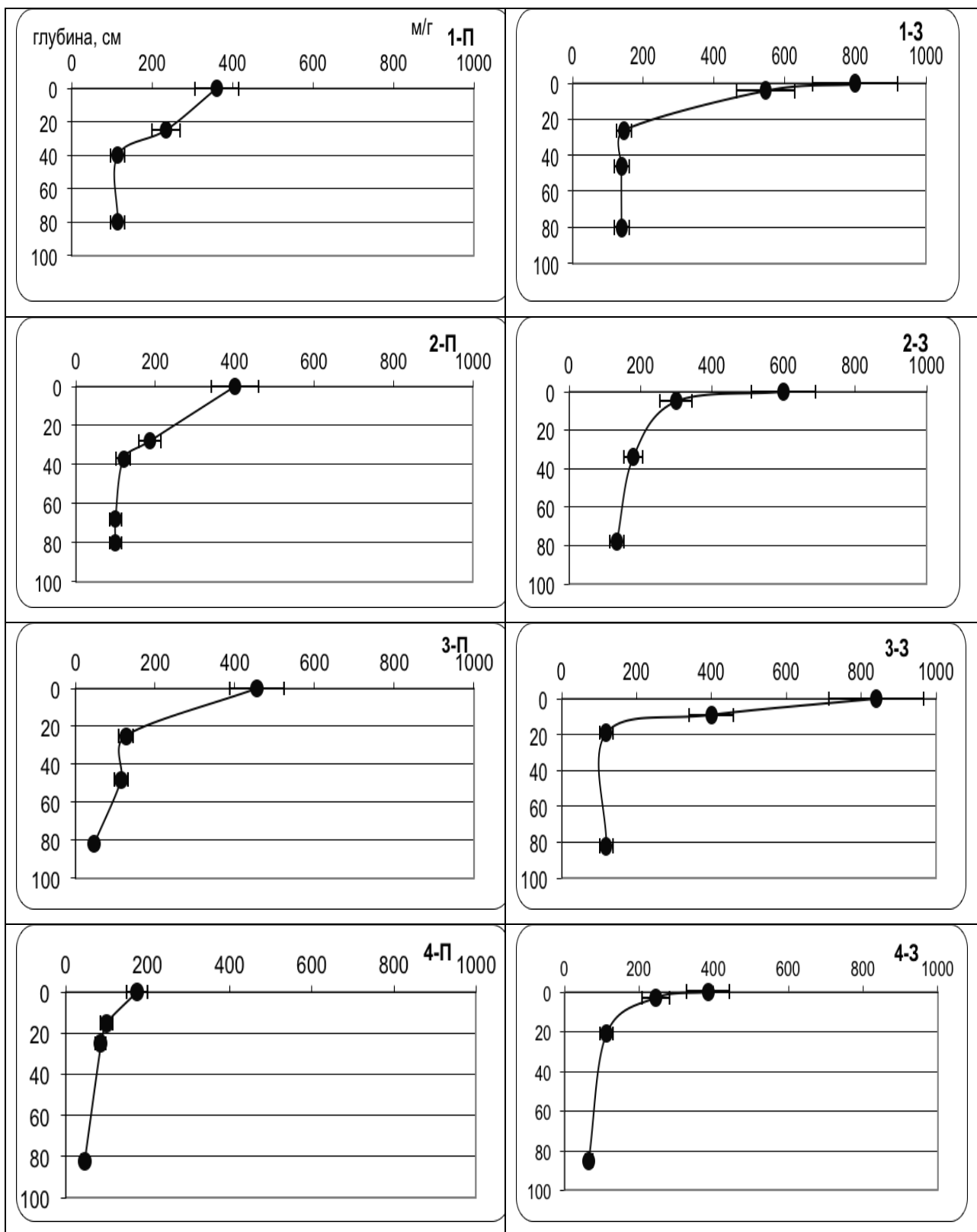
ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ В УСЛОВИЯХ ЗАЛЕЖИ

На рис. 14А представлены данные по распределению численности бактерий в профиле изученных почв. Как следует из рисунка, наибольшей численностью во всех изученных вариантах почв характеризуется верхний слой гор. А. Численность бактерий резко снижается на глубине 40 см, и далее она стабилизируется на определенном уровне практически во всех изученных почвах, что отмечалось ранее для различных типов зональных почв (Полянская и др., 1995; Полянская, 1996; Павлова, 1998). При сравнении пашни и залежи отмечается, что численность бактерий в верхнем слое гор. А всех почв залежи в 1,5-4 раза выше, чем в аналогичных слоях пашни. Численность бактерий в нижних слоях изученных вариантов почв также выше в залежи, чем в таковых пашни (McCaig et al., 2001). Следует отметить, что численность бактерий максимальна в варианте выщелоченного чернозема, который находился в условиях залежи в течение 25 лет.

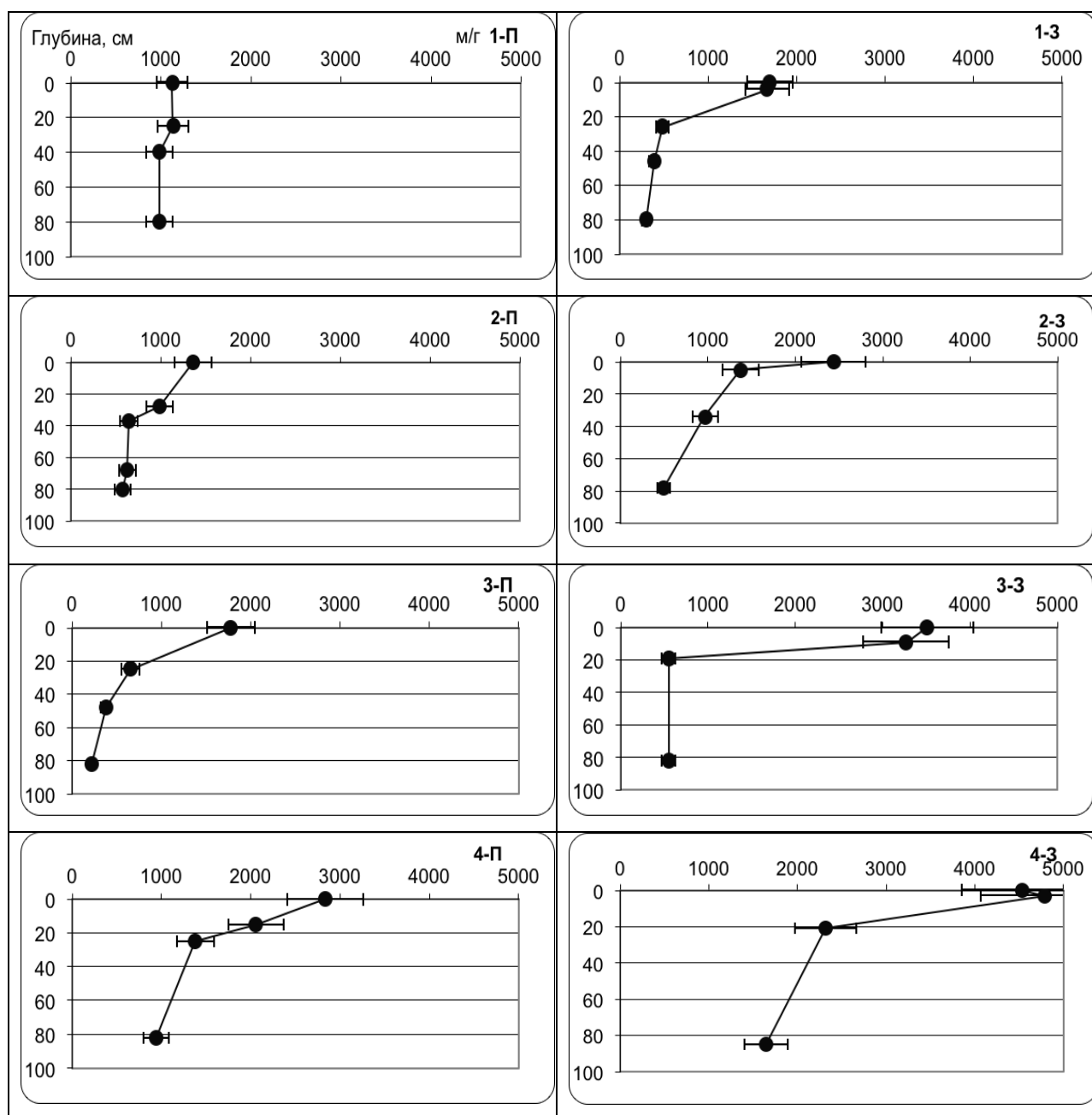
Длина актиномицетного мицелия (рис. 14Б) в верхнем слое пашен выщелоченного чернозема примерно одинакова во всех вариантах. Но в дерново-карбонатной почве она составляла около 200 м/г почвы, что более чем в 2 раза ниже таковых для разных вариантов выщелоченного чернозема. В верхнем слое гор. А всех изученных вариантов почв она в 1,5-2 раза выше в залежных почвах по сравнению с таковыми пашен (Kjoller, Struwe, 1982).



A



Б



В

Рис. 14. А – распределение численности клеток бактерий, Б – длины мицелия актиномицетов, В – длины мицелия грибов по профилю изученных почв.

Обозначение: П-пашня, З-залежь.

1-П, 1-З – выщелоченный чернозем, находящиеся в условиях пашни и залежи в течение 10 лет; 2-П, 2-З – выщелоченный чернозем, находящийся в условии пашни и залежи в течение 16 лет; 3-П, 3-З – выщелоченный чернозем, находящийся в условии пашни и залежи в течение 25 лет;

4-П, 4-З – дерново-карбонатная почва, находящаяся в условиях пашни и залежи в течение 10 лет.

В нижних слоях длина мицелия актиномицетов практически одинакова во всех вариантах, как почв пашен, так и почв залежи.

Длина грибного мицелия в 1,5-2,5 раза была выше в верхнем слое всех почв залежей по сравнению с таковыми пашен (рис. 14В). Наибольшая длина, равная 3500-5000 метров, наблюдалась в дерново-карбонатной почве и выщелоченном черноземе, находящихся в условиях залежи 10 и 25 лет соответственно. В почвах выщелоченного чернозема залежей 10 и 16 лет длина мицелия грибов также выше, чем в аналогичных вариантах почв пашен.

Показатель, который характеризует почвы, находящиеся в сельскохозяйственном использовании, – процент спор в общей биомассе микроорганизмов. Он, как было показано ранее в литературе (Полянская и др., 1997; Полянская и др., 2001; Широких и др., 2001; Полянская, Звягинцев, 2005), увеличивается в ходе распашки. Численность спор грибов во всех вариантах выше в верхнем слое гор. А. При этом в почвах залежей она в 1,5-2,5 раза превышает таковую пашен. С глубиной численность спор снижается, наиболее резко в пахотных почвах. Исключением является выщелоченный чернозем, находящаяся в условиях пашни в течение десяти лет. Здесь численность спор в нижних горизонтах пашни выше аналогичных горизонтов 10-летней залежи (табл. 3).

Табл. 3. Структура микробной биомассы пахотных почв и почв залежи.

Глубина, см	Биомасса спор грибов	Биомасса прокариот	Биомасса мицелия грибов
	в (%) от общей биомассы микроорганизмов		
Чернозем выщелоченный, пашня 10 лет			
0-25	6,7	2,2	91,1
25-40	5,4	1	93,6
40-80	4	0,7	95,3
80-100	4	0,7	95,3
Чернозем выщелоченный, залежь 10 лет			
0-4	4,3	2,7	93
4-26	4,2	2,8	93
26-46	4,1	2,6	93,3
46-80	4,1	2,6	93,3
80-100	4,1	3,1	92,8
Чернозем выщелоченный, пашня 16 лет			
0-28	8,2	2,8	89
28-37	7,2	1,5	91,3
37-68	4,6	1,2	94,2
68-80	4,5	0,9	94,6
80-110	4,3	1,1	94,6
Чернозем выщелоченный, залежь 16 лет			
0-5	6,3	2,1	91,6
5-34	6,2	2	91,8
34-78	4,8	1,7	93,5
78-110	4,8	1,7	93,5
Чернозем выщелоченный, пашня 25 лет			
0-25	8,7	2,4	88,9
25-48	7,6	1,2	91,2
48-82	7,1	1,8	91,1
82-100	5,8	1	93,2
Чернозем выщелоченный, залежь 25 лет			
0-9	3,5	3	93,5
9-19	3	2,9	94,1
19-82	3	2,8	94,2
82-100	3	2,8	94,2
Дерново-карбонатная, пашня 10 лет			
0-15	5	0,7	94,3
15-25	2,8	0,48	96,7
25-82	2,2	0,4	97,4
82-110	1,8	0,5	97,7
Дерново-карбонатная, залежь 10 лет			
0-3	3,9	0,8	95,3
3-21	2,3	0,86	96,8
21-85	2,3	0,5	97,2
85-120	2,1	0,4	97,5

Как следует из табл. 3 и рис. 15, процент спор в общей биомассе микроорганизмов в 1,5-2 раза выше в верхнем слое распаханых почв по сравнению с аналогичными почвами залежи. Далее вниз по профилю во всех вариантах почв залежи он практически не меняется, а для некоторых почв пашен наблюдается тенденция к уменьшению этого показателя.

Общая биомасса, представленная на рис. 16, показывает тенденцию распределения общего мицелия по профилю всех изученных почв. В верхнем слое залежных почв она в 2-3 раза выше аналогичных почв пашен. В почвах залежи наблюдается более резкое снижение общей биомассы микроорганизмов с глубиной по сравнению с почвами пашни. Эти данные подтверждают результаты, полученные при исследовании почв Центрального Биосферного Государственного и Окского заповедников (Павлова, 1998; Гейдебрехт, 1999; Головченко, Полянская, 2000; Добровольская и др., 2005;).

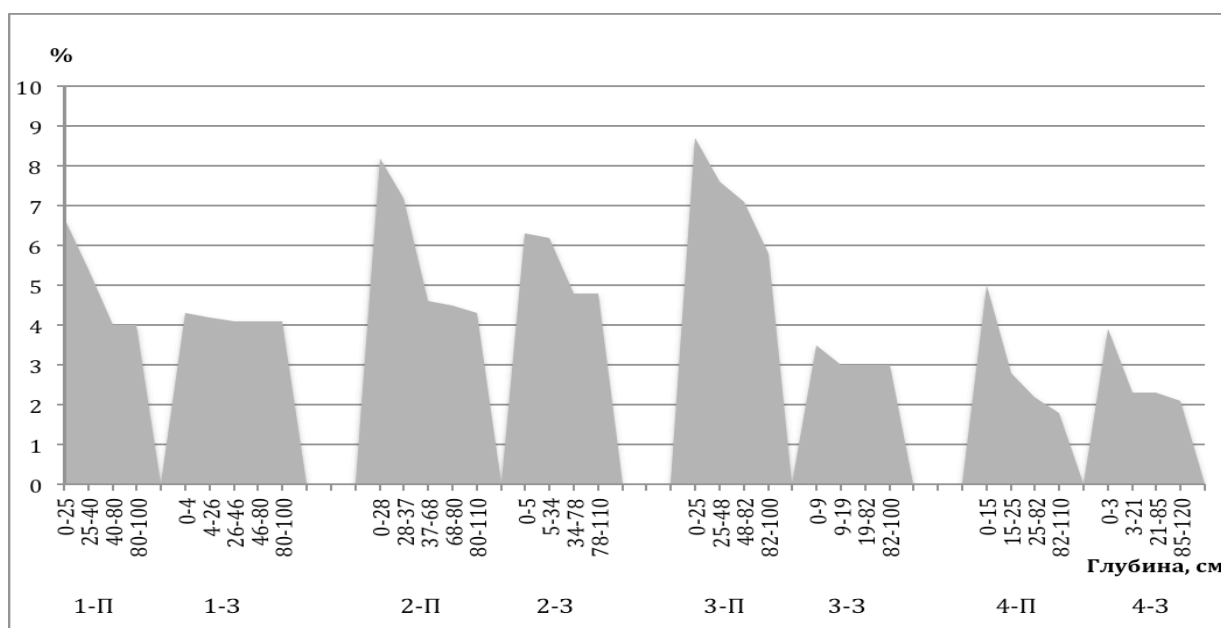


Рис. 15. Распределение по профилю изученных почв биомассы спор грибов. Обозначения см. рис. 14.

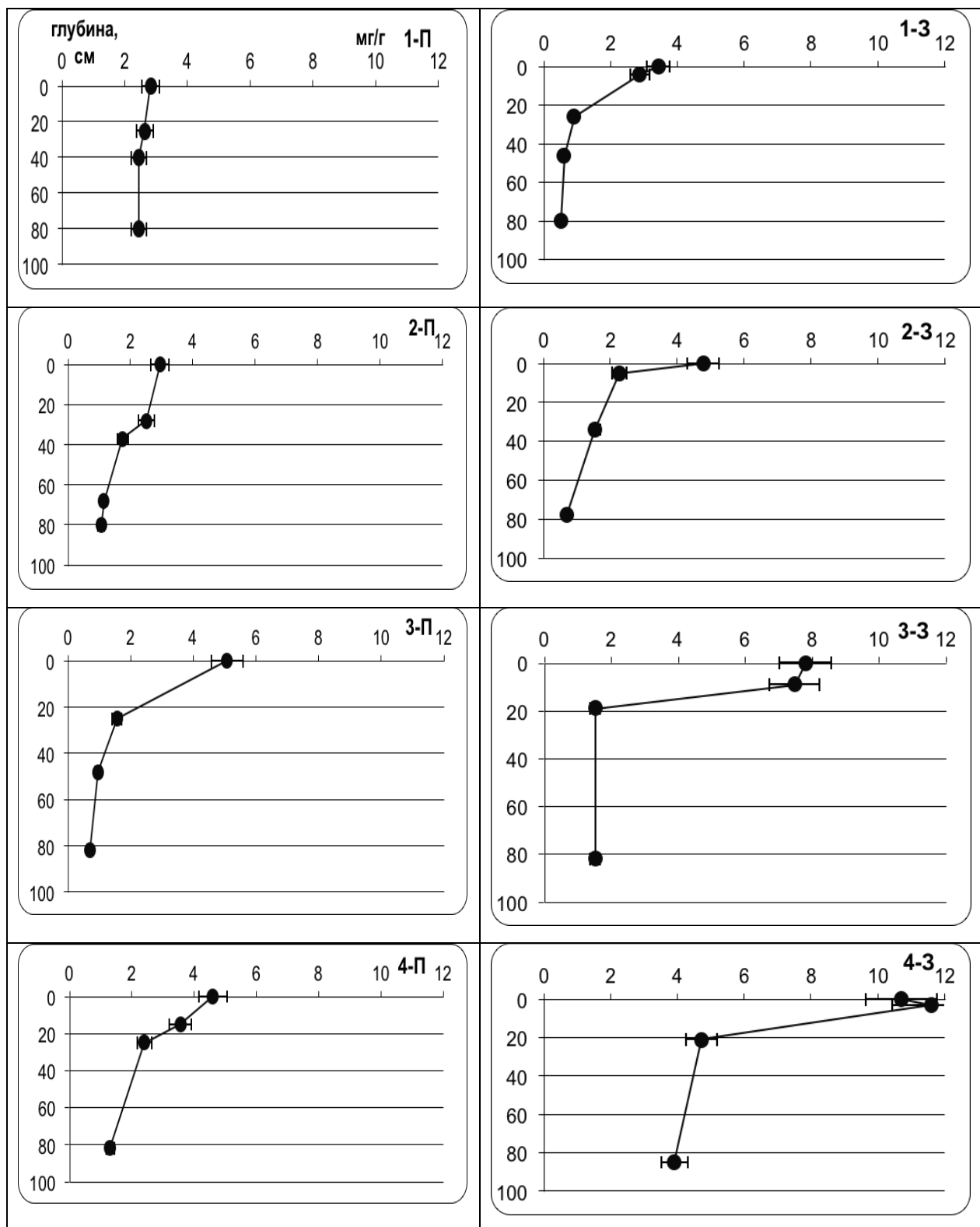


Рис. 16. Распределение общей биомассы разных групп микроорганизмов (мг/г почвы) по профилю изученных почв. Обозначения см. рис. 14.

Так как профиль всех изученных почв примерно одинаков (и по глубине, и по горизонтам), была сделана попытка сложить биомассу микроорганизмов в грамме почвы всех горизонтов в профиле. На рис. 17 представлена вычисленная таким образом суммарная биомасса. В дерново-карбонатной почве биомасса в залежи более чем в два раза превышала биомассу в пахотной почве. В выщелоченном черноземе в 10-летней и 25-летней залежи она была выше биомассы пашни. В 16-летней летней залежи она была чуть ниже таковой пашни. Это связано с резким падением длины грибного мицелия в нижних горизонтах залежи (рис. 14В).

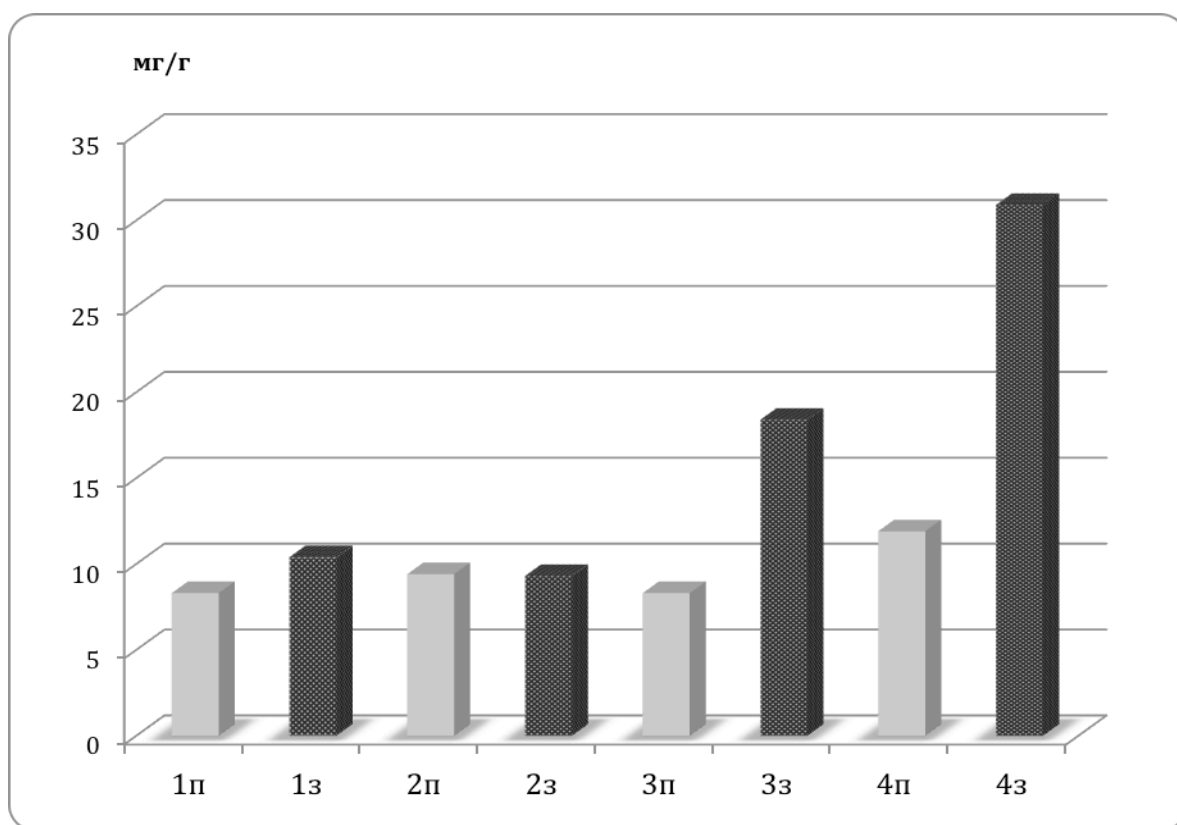
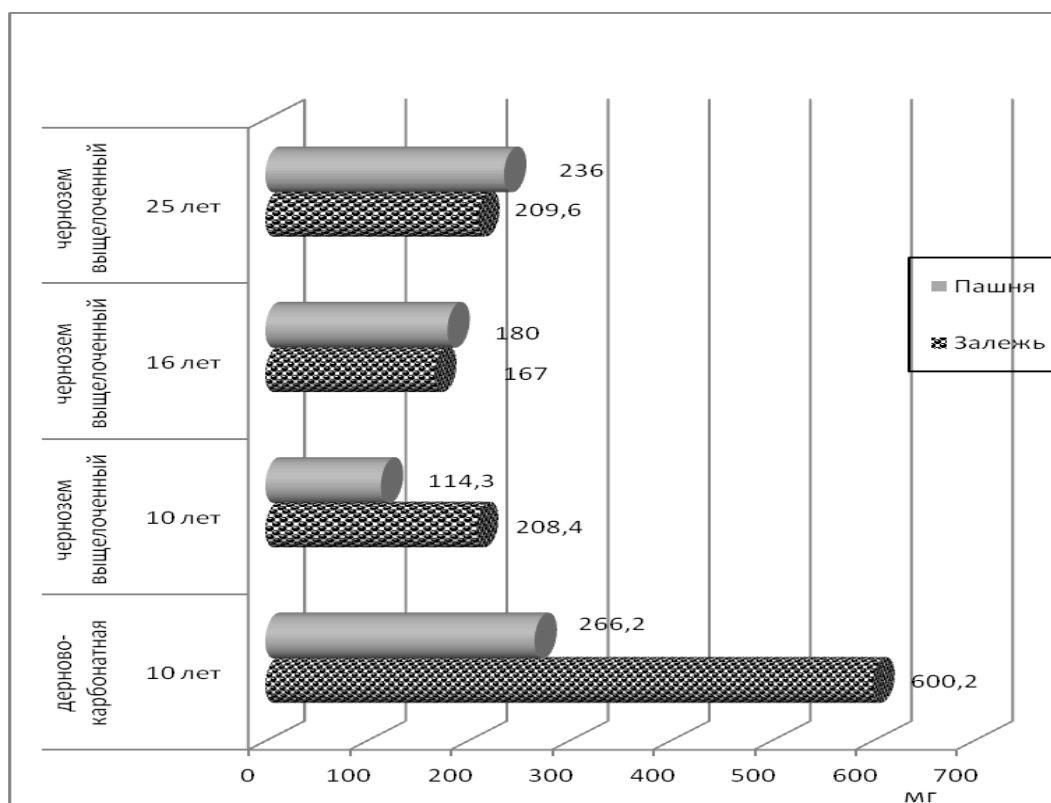
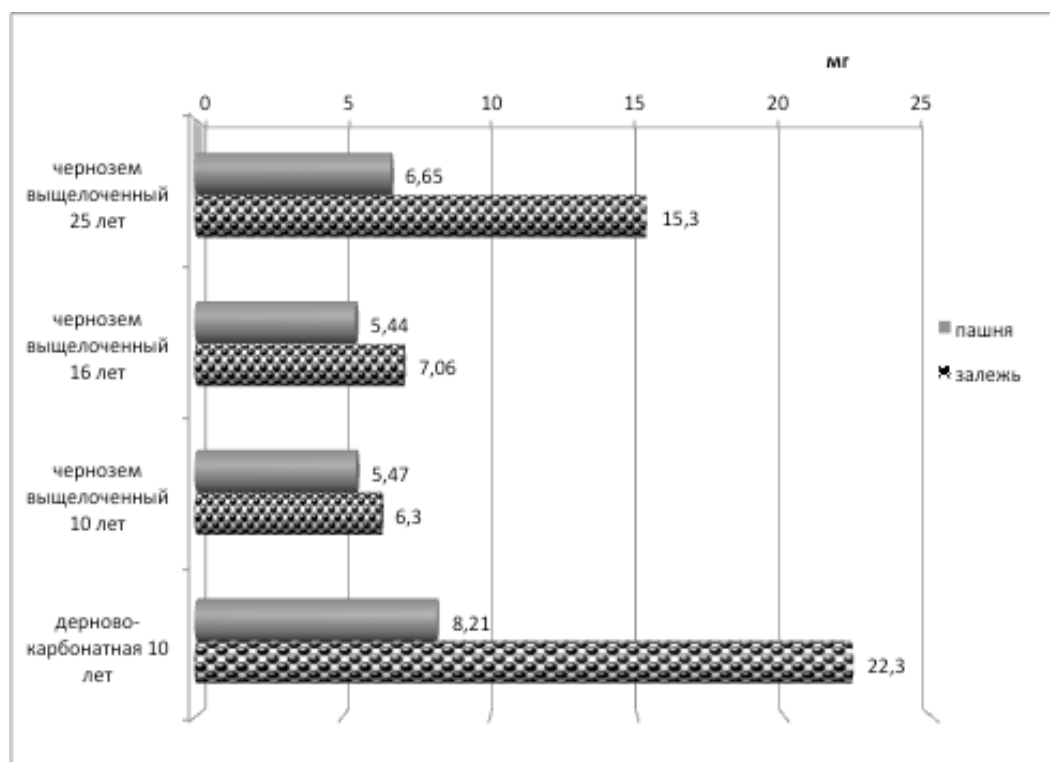


Рис. 17. Запасы микробной биомассы в 1 г почвы, взятой на разных глубинах профиля изученных почв. Обозначения см. рис.14.



А



Б

Рис. 18. Запасы общей биомассы микроорганизмов по профилю всех изученных почв (А) и в двух верхних гумусированных горизонтах (Б) на пашне и в залежи.

Общая биомасса, представленная на рис. 18А, отражает тенденцию распределения биомассы микроорганизмов в изученных почвах. В залежи дерново-карбонатной почвы она в 3 раза выше аналогичной почвы пашни. Полученные результаты подтверждают результаты исследований почв Центрального биосферного государственного и Окского заповедников (Головченко, Полянская, 1996; Павлова, 1998; Гейдебрехт, 1999, Головченко, Полянская, 2000).

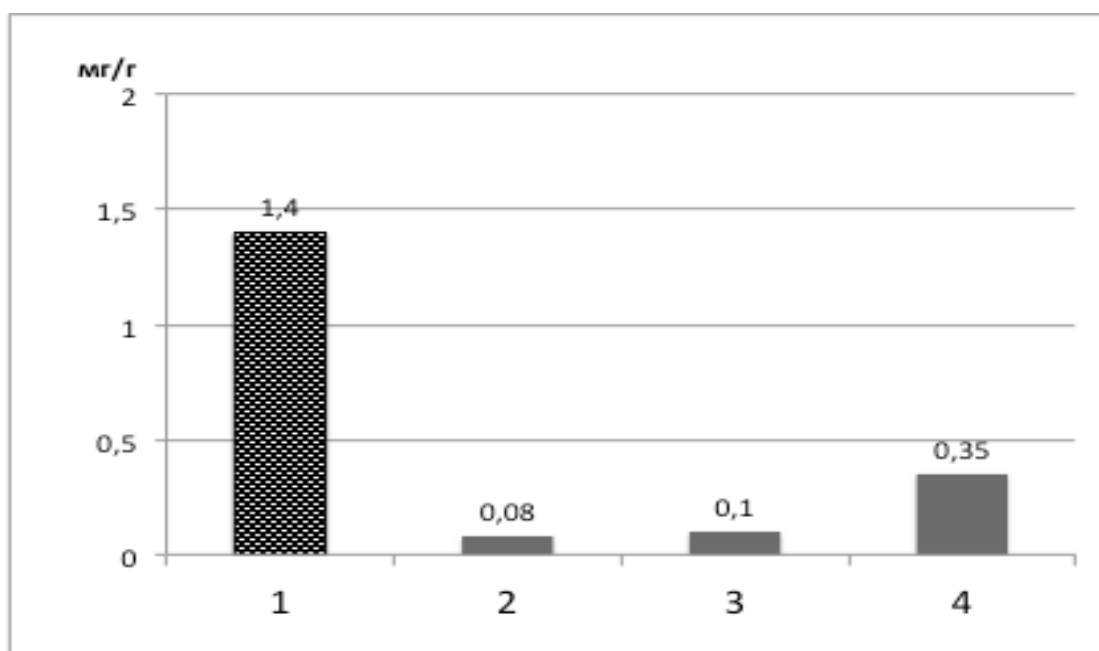


Рис. 19. Прирост микробной биомассы в год в гумусированных горизонтах залежей разных лет.

- Обозначения: 1 – дерново-карбонатная 10-летняя залежь;
2 – выщелоченный чернозем 10-летняя залежь,
3 – выщелоченный чернозем 16-летняя залежь,
4 – выщелоченный чернозем 25-летняя залежь.

В отличие от биомассы по всему профилю почв (рис. 18А), микробная биомасса во всех вариантах залежи гумусированных горизонтов (рис.18 Б) была существенно выше биомассы этих горизонтов пашен. На основании этих данных была сделана попытка рассчитать скорость прироста микробной биомассы в залежах этих почв.

На рис. 19 приведены данные по приросту микробной биомассы в год (в мг/г). Как видно, наибольший прирост микробной биомассы отмечался для дерново-карбонатной почвы и составлял 1,4 мг прироста в год. За 10 и 16 лет в выщелоченном черноземе он был незначительным, составляя при этом около 0,1 мг. В залежи 25-летней залежи он заметно вырос и уже составил 0,35 мг прироста в год.

Таким образом, показано, что во всех изученных почвах доминировала биомасса грибного мицелия, составляя от 90% общей биомассы микроорганизмов в верхнем слое почв, возрастая вниз по профилю до 97%. В почвах залежи процент грибного мицелия был выше по сравнению с почвами пашни. В почвах пашен был выше процент биомассы спор грибов (табл. 3). Доля прокариот была невысока и не превышала 1-3%, причем в почвах залежи этот процент был несколько выше, чем в пашне.

Дерново-карбонатная почва в отличие от чернозема, формирующаяся в более жестких условиях, характеризуется более высокой скоростью прироста микробной биомассы.

ГЛАВА 6. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ ЗАПАДИН ЛИПЕЦКОЙ И ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

В почвах западин, характеризующихся высоким содержанием молекулярного водорода, было измерено содержание этого газа (Суханова и др., 2013). Объем эмиссии водорода учитывался с помощью газового анализатора. Результаты показали, что эксгаляция довольно интенсивная, а максимальная концентрация газа составляет 2600-3200 ppm (рис. 20).

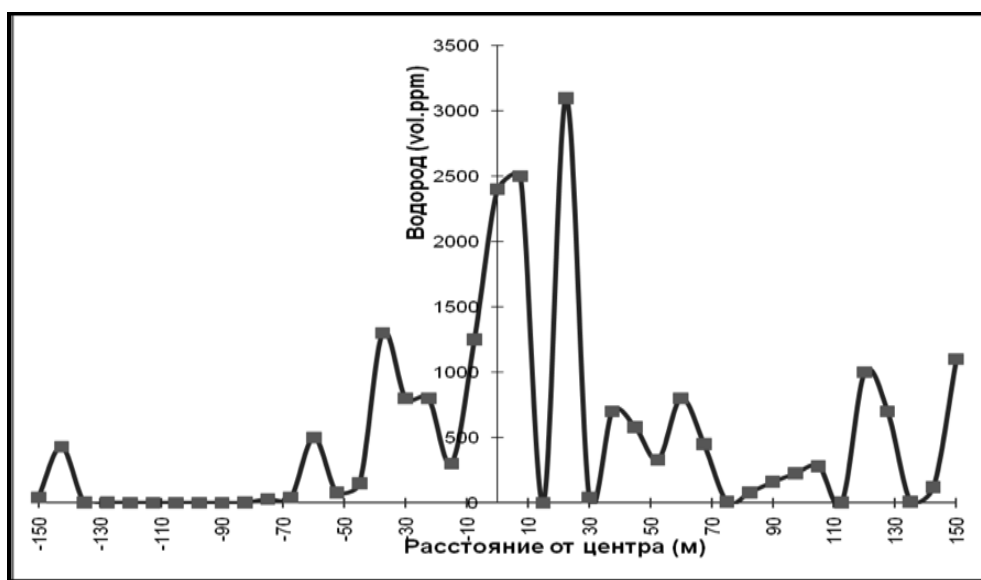


Рис. 20. Концентрация выделяющегося водорода (ppm), измеренная от центра западины.

6.1. Западина в Липецкой области (серая лесная почва)

Распределение численности бактерий по профилю (рис. 21) показало, что во всех случаях наибольшая численность бактерий наблюдается в верхних горизонтах (Апах) и затем убывает с глубиной. При этом в разрезах 1-3, где шел поток водорода, численность бактерий была невелика

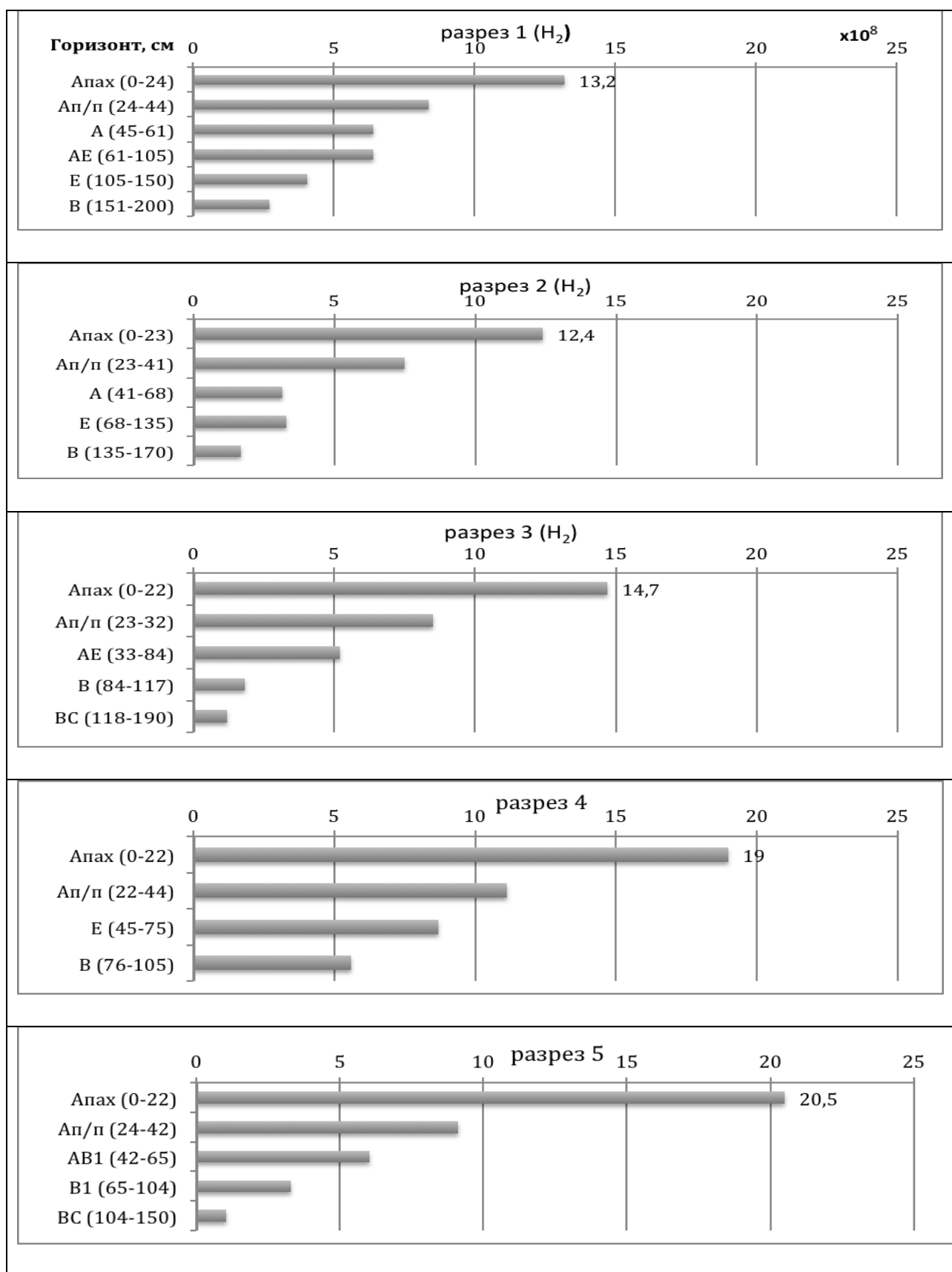


Рис. 21. Распределение численности бактерий в серой лесной почве по профилю разрезам, расположенным непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1-3) и на удалении (разрезы 4, 5).

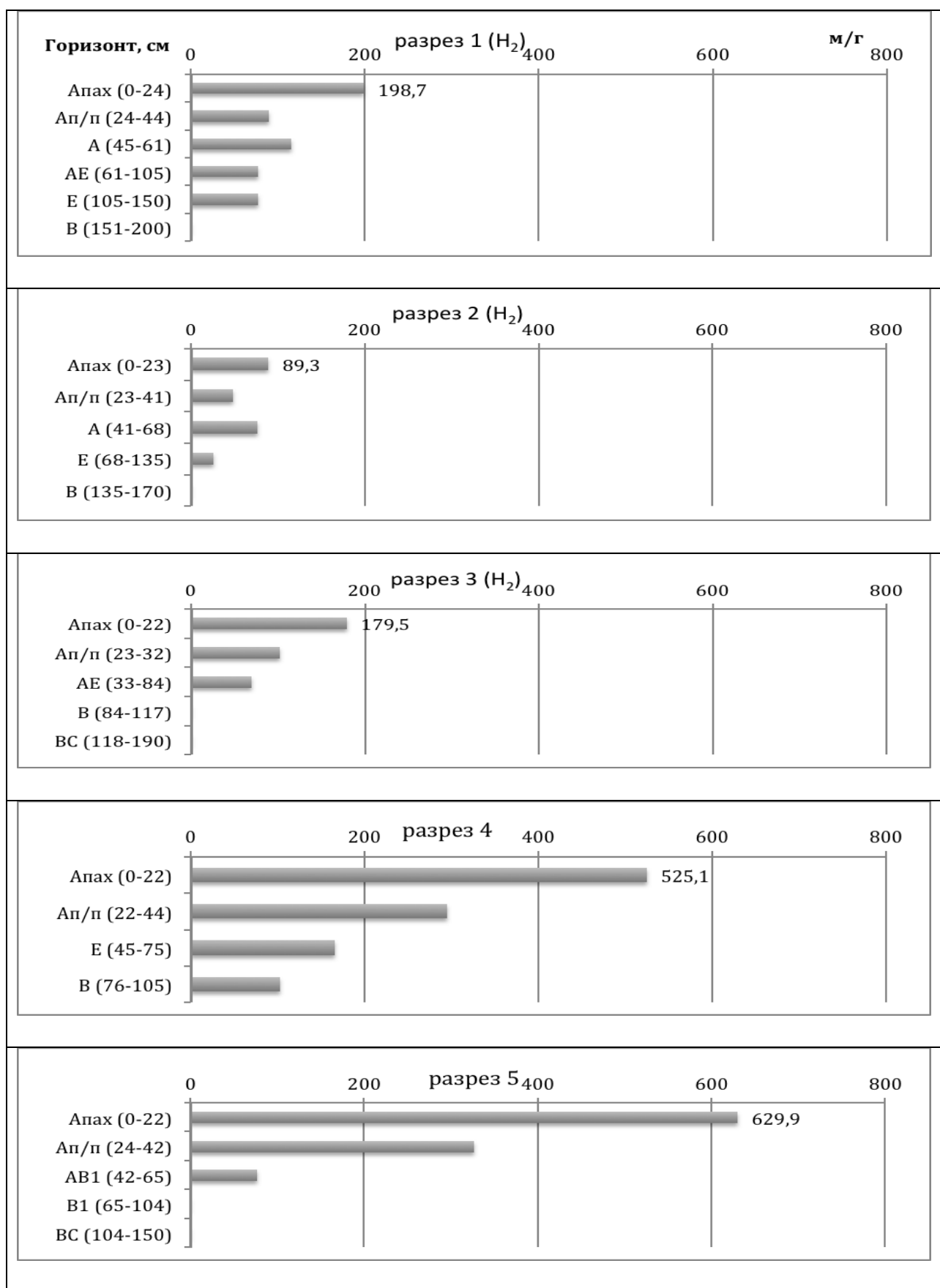


Рис. 22. Распределение длины грибного мицелия в серой лесной почве по профилю разрезов, расположенных непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1-3) и на удалении (разрезы 4,5).

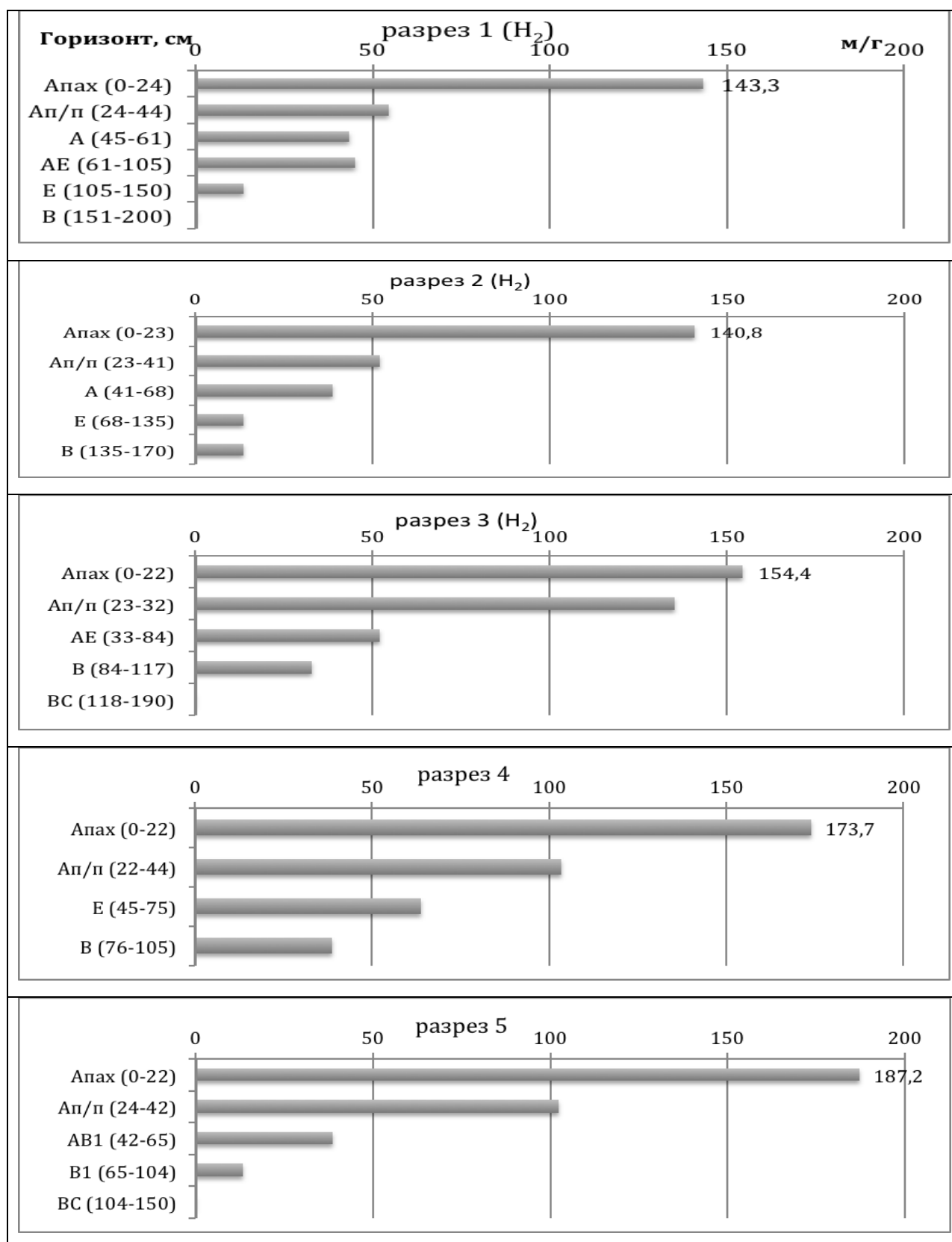


Рис. 23. Распределение длины актиномицетного мицелия в серой лесной почве по профилю разрезов, расположенных непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1-3) и на удалении (разрезы 4,5).

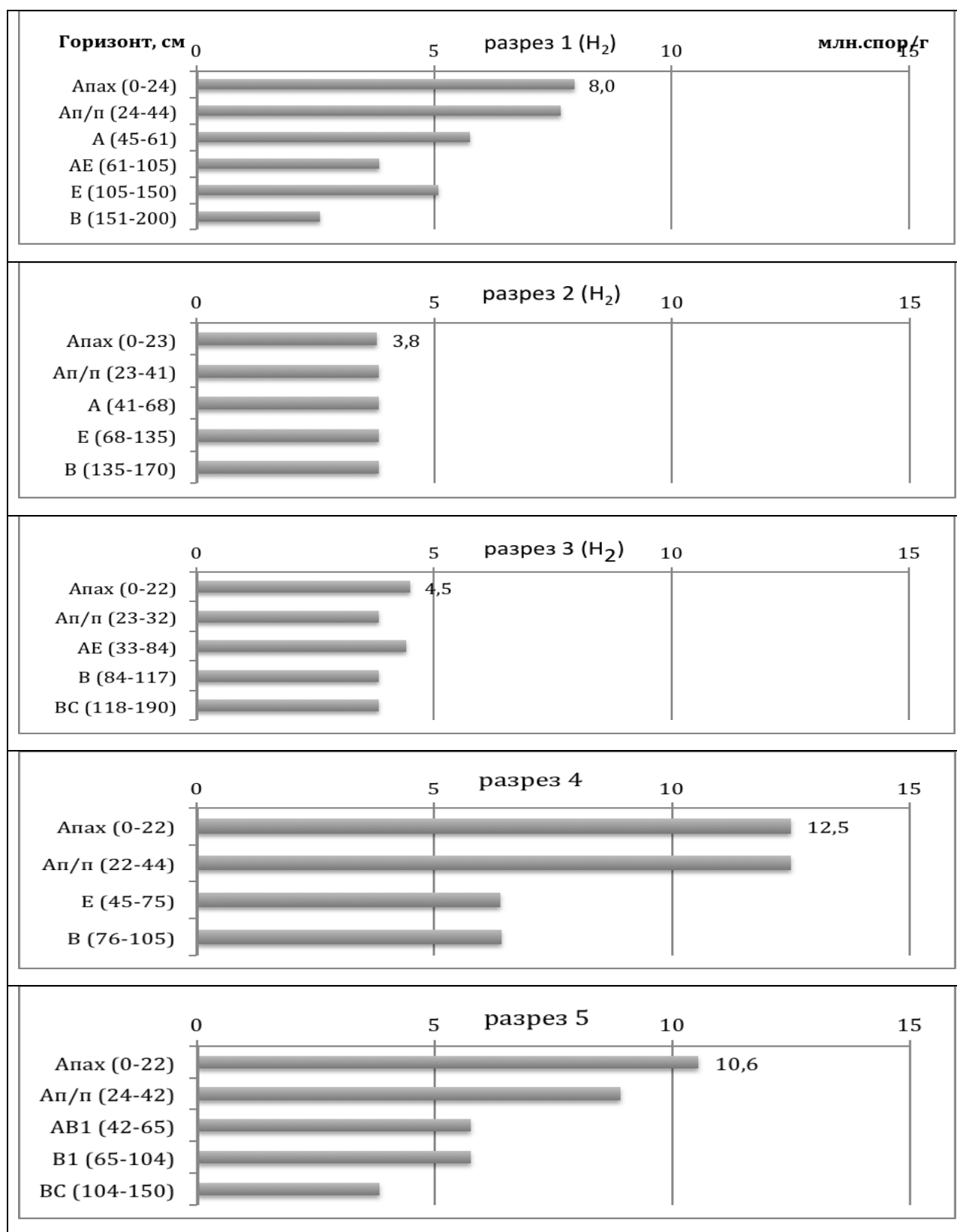


Рис. 24. Распределение численности спор грибов в серой лесной почве по профилю разрезов, расположенных непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1-3) и на удалении (разрезы 4,5).

и не превышала количества клеток 12×10^8 - 13×10^8 в верхних 20-ти см. В нижних же она падала на порядок (в 10 раз). В разрезах 4 и 5 численность в верхних горизонтах превышает таковую в разрезах 1-3 примерно в 1,5-2 раза.

Как следует из рис. 22, наибольшая длина мицелия грибов отмечалась в верхних пахотных горизонтах фоновых почв (разрез 4 и 5), составляя 500-600 м/г. С глубиной длина мицелия снижалась в 2 раза, составляя около 300 м/г. В нижних горизонтах разреза 5 мицелий обнаружен не был, хотя в разрезе 4 его длина колебалась на уровне 100 метров. В разрезах с выделением водорода и избыточным переувлажнением (1-3) длина грибного мицелия была невысока и колебалась в верхних горизонтах в пределах 100-200 метров, а на глубине она падала до нескольких десятков метров или даже до полного отсутствия таковой.

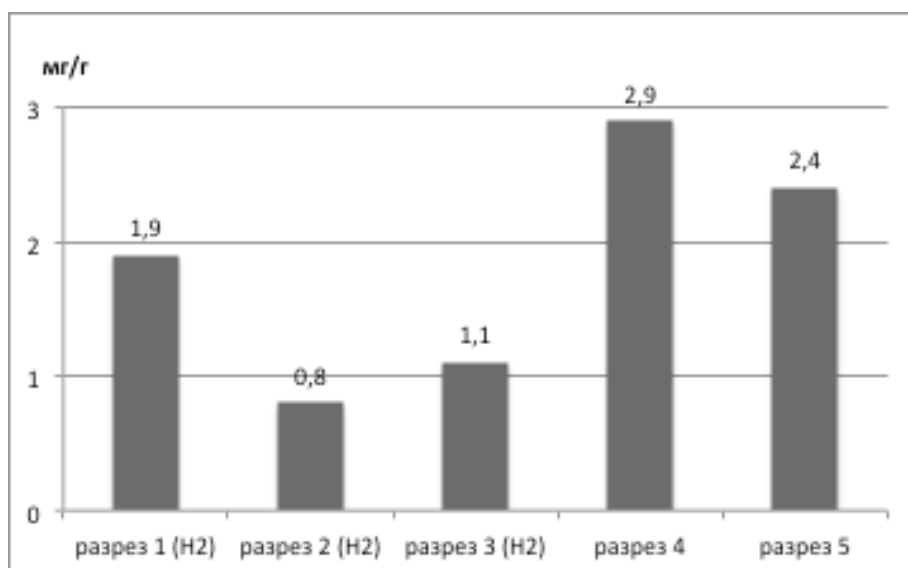


Рис. 25. Биомасса микроорганизмов в профиле разрезов серой лесной почвы.

Так как профиль всех изученных почв примерно одинаков, была сделана попытка сложить биомассу всех микроорганизмов в грамме почв всех слоев в профиле. На рис. 25 представлена биомасса микроорганизмов в таком 4-5-ти граммовом слое. Как видно, общая биомасса микроорганизмов в разрезах 1-3 (с водородом) колеблется от 1-2 мг/г, а в разрезах 4 и 5 она в 2-3 раза выше.

6.2. Западина в Волгоградской области (чернозем обыкновенный и лугово-черноземная почвы)

Для изучения численности и структуры биомассы микроорганизмов в сходных условиях были исследованы образцы почв черноземного ряда. На рис. 26 представлена численность бактерий в разрезах, расположенных на месте выхода водорода (разрезы 1 и 4) и на удалении (разрезы 2, 3 и 5). Максимальная численность бактерий наблюдается в верхних горизонтах (Апах) и далее убывает с глубиной. При этом численность бактерий во 2 и 3 разрезах заметно превышает таковую в 1 и 4 разрезах, где шло активное выделение водорода.

Распределение длины грибного мицелия (рис. 27) показало, что наименьшая длина наблюдалась в разрезах 1 и 4, на месте выхода водорода, составляя 163 м/г и 128 м/г соответственно в верхнем горизонте. Максимальная же длина грибного мицелия была в верхнем горизонте во 2 разрезе, и достигала более 800 м/г. С глубиной она уменьшалась почти в 3 раза, составляя около 300 м/г. В 3 разрезе длина мицелия грибов была

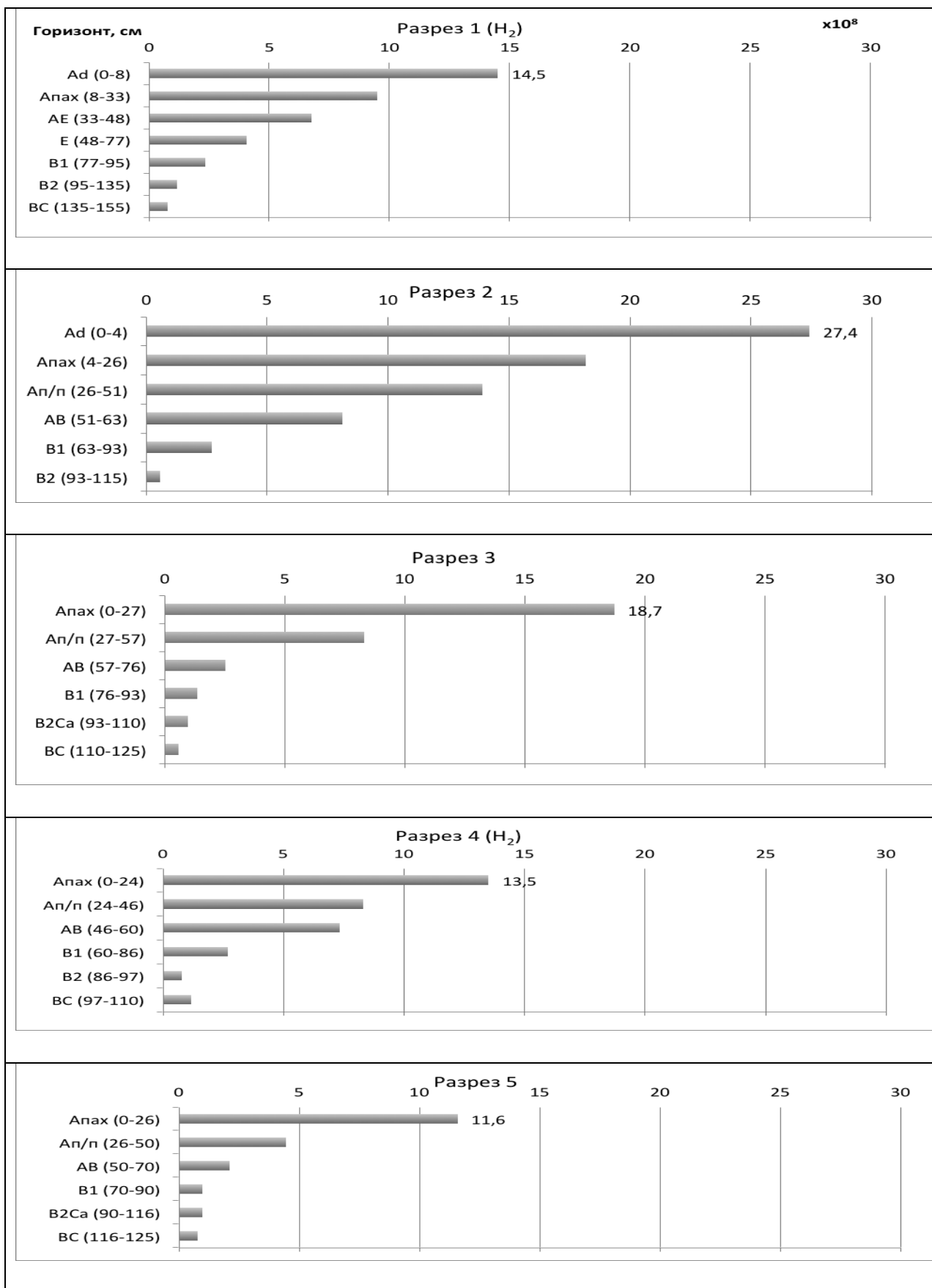


Рис. 26. Распределение численности бактерий в почвах черноземного ряда по профилю разрезов, расположенных непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1, 4) и на удалении (разрезы 2, 3 и 5).

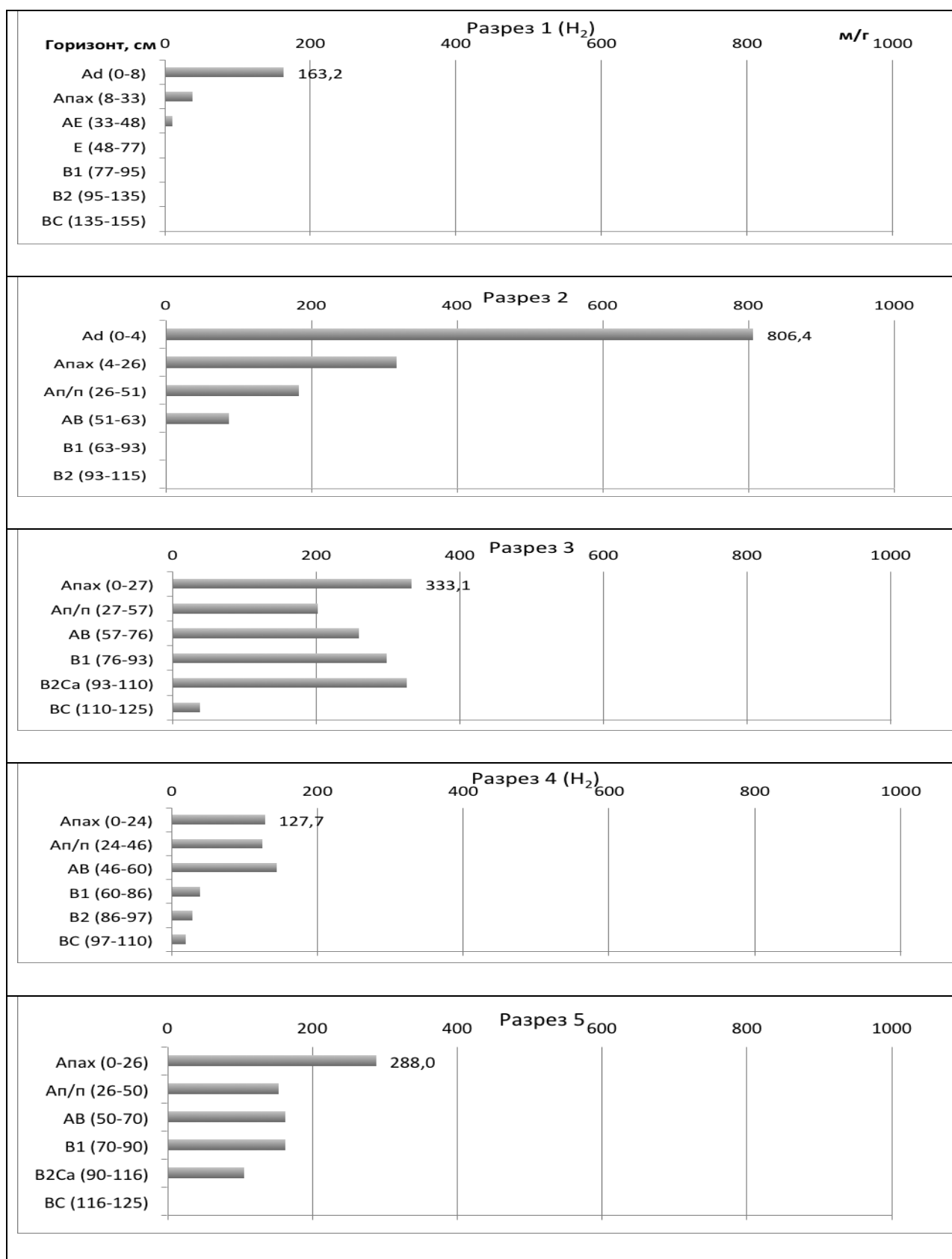


Рис. 27. Распределение длины мицелия грибов в почвах черноземного ряда по профилю разрезов, расположенных непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1, 4) и на удалении (разрезы 2, 3 и 5).

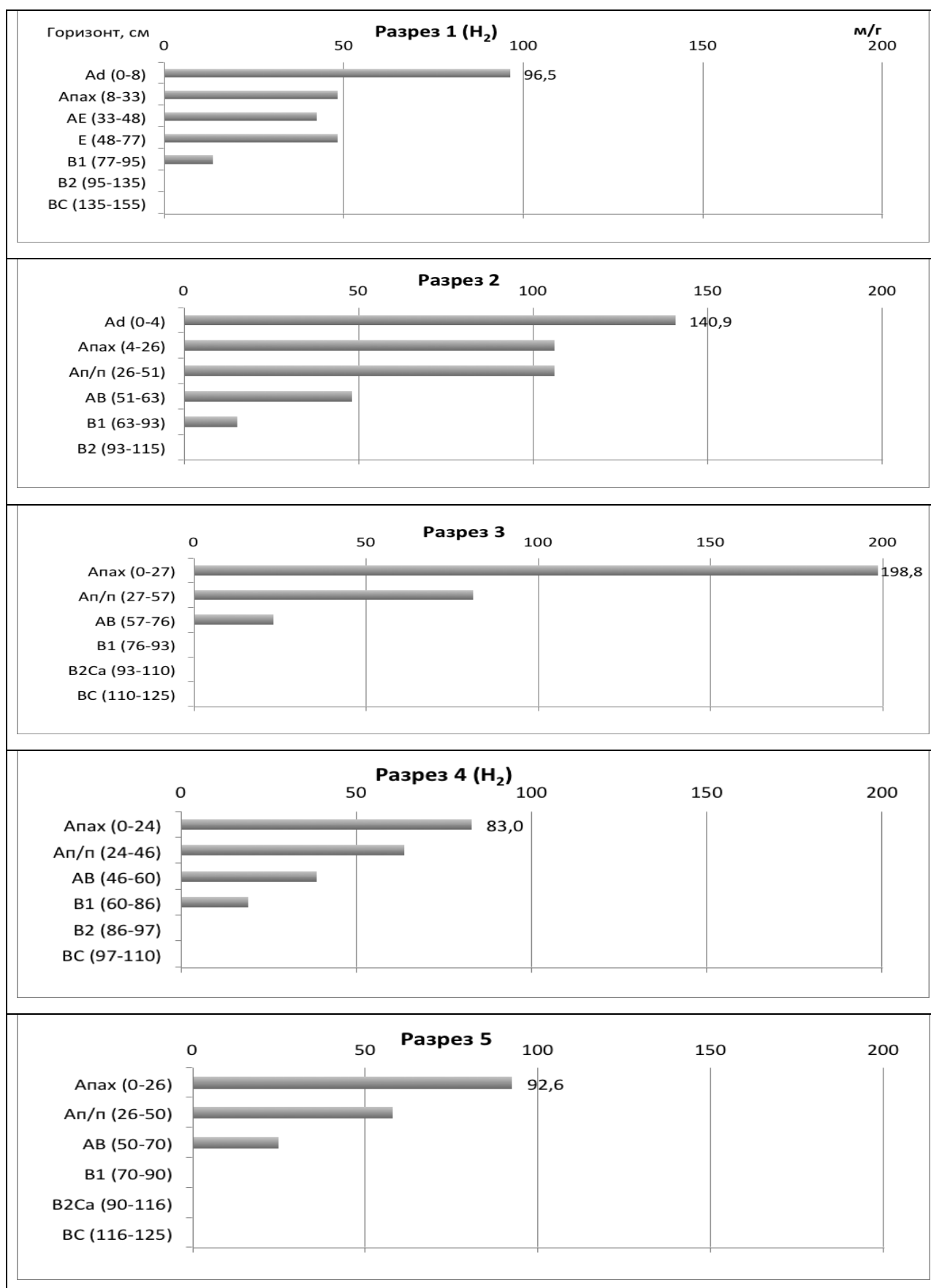


Рис. 28. Распределение длины актиномицетного мицелия в почвах черноземного ряда по профилю разрезов, расположенных непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1, 4) и на удалении (разрезы 2, 3 и 5).

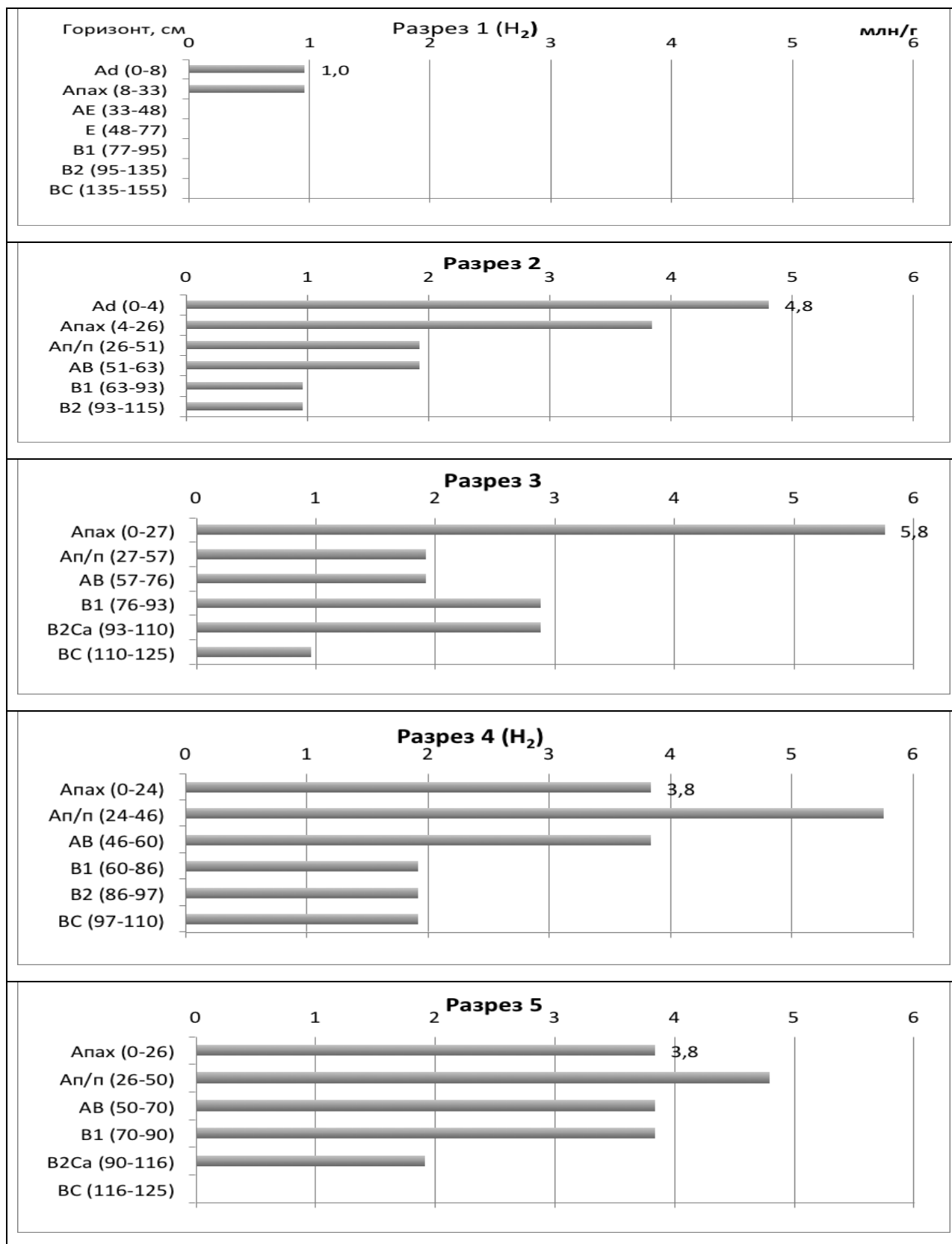


Рис. 29. Распределение численности спор грибов в почвах черноземного ряда по профилю разрезов, расположенных непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1, 4) и на удалении (разрезы 2, 3 и 5).

примерно одинаковой по всему профилю и колебалась в пределах 200-300 м/г. В нижних горизонтах разрезов 1, 2 и 5 мицелий вообще не обнаруживался, а в разрезах 3 и 4 его длина была минимальной и составляла 20-30 м/г.

Общая биомасса микроорганизмов в разрезах, представленная на рис. 30, наглядно демонстрирует зависимость их численности от наличия водорода. В разрезах 1 и 4 биомасса составляет 0,41 мг/г и 1,48 мг/г соответственно, что в 2-10 раз ниже, чем во 2, 3 и 5 разрезах, расположенных вне зоны выделения водорода.

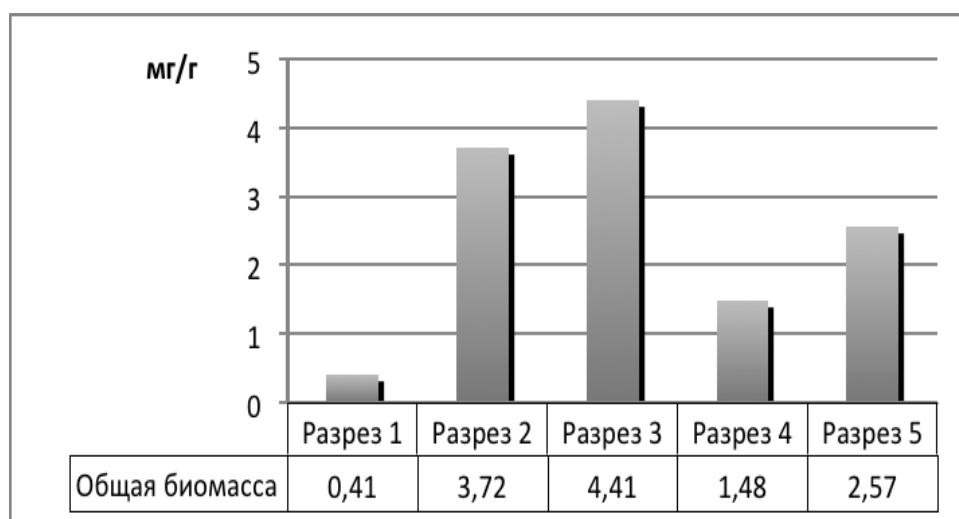


Рис. 30. Общая биомасса микроорганизмов по разрезам: разрезы 1 и 4, в которых шло выделение водорода, разрезы 2, 3, 5 – на удалении.

Распределение клеток бактерий по размерам (рис. 31) в 4 и 5 разрезах, полученное с помощью метода каскадной фильтрации, показывает, что во всех случаях преобладали мелкие фракции бактерий (размеры клеток $\geq 0,38$ мкм и $\geq 0,23$ мкм) (Полянская и др., 2012). Наиболее значимые различия в полученных данных между разрезами с выделением водорода и без него

наблюдались в верхних пахотном и подпахотном горизонтах, а также в горизонте ВС. При этом суммарная численность в 5 разрезе (126×10^7 клеток) – без водородной дегазации – в подпахотном горизонте превышала таковую в 4 разрезе (50×10^7 клеток) в 2,5 раза, а в горизонте ВС – в 1,5 раза.

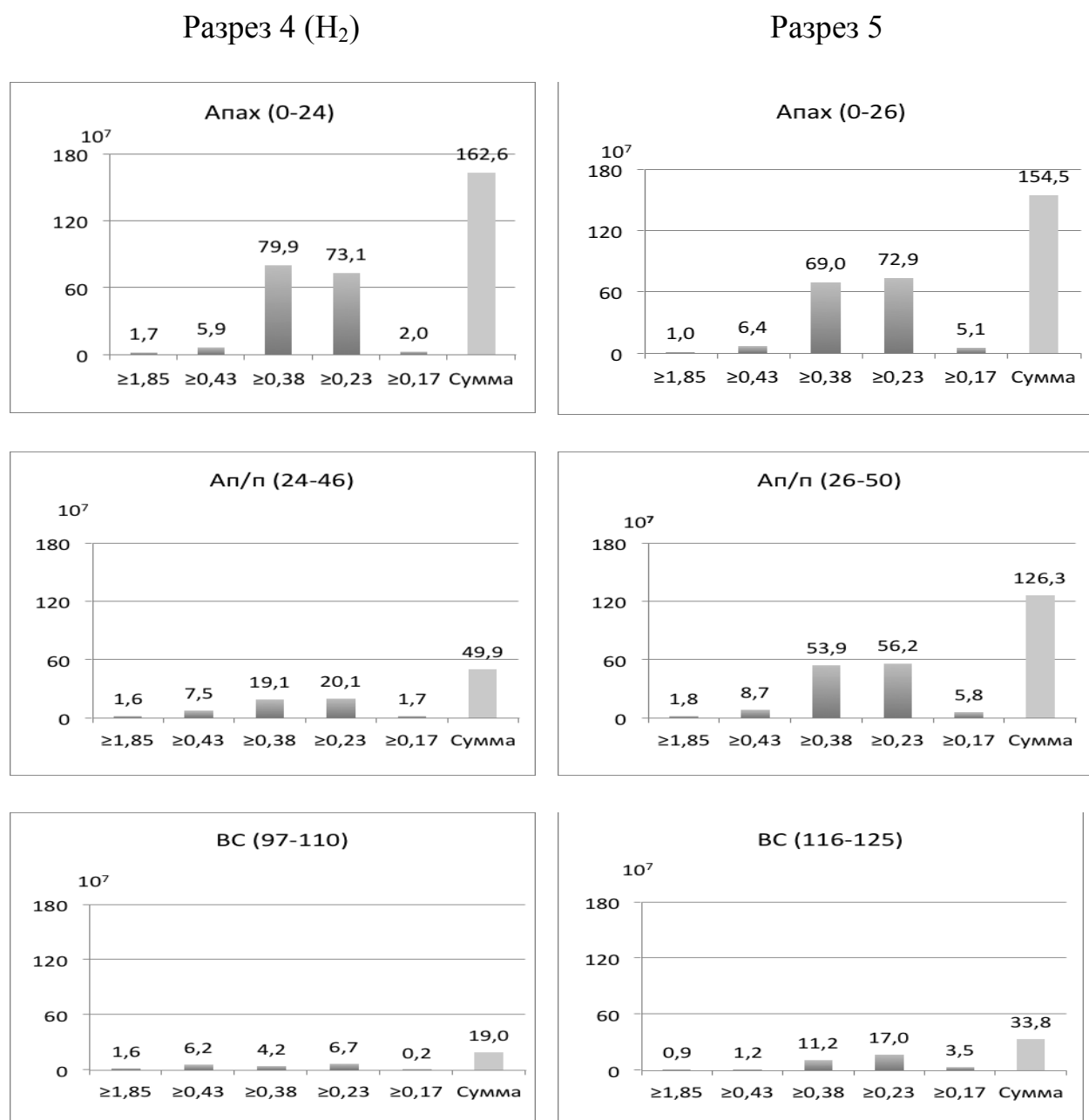
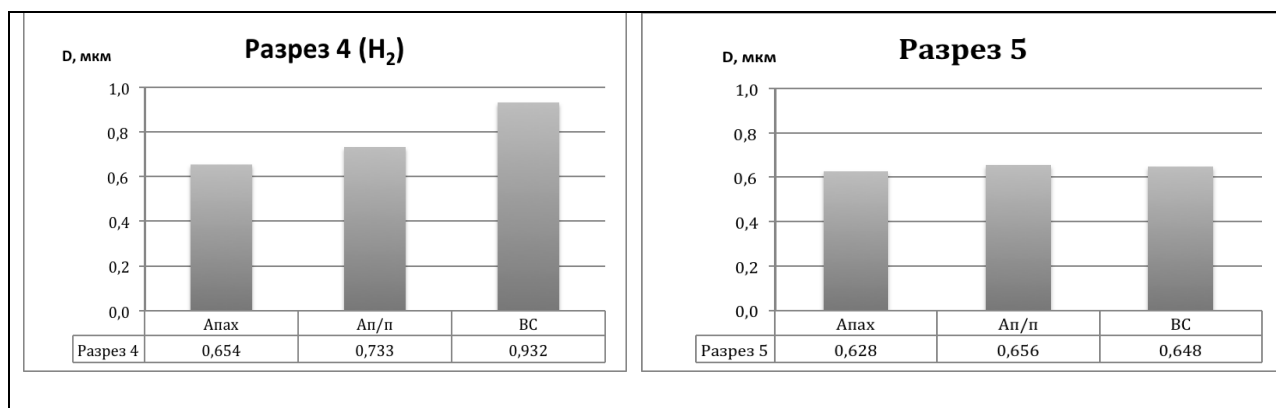
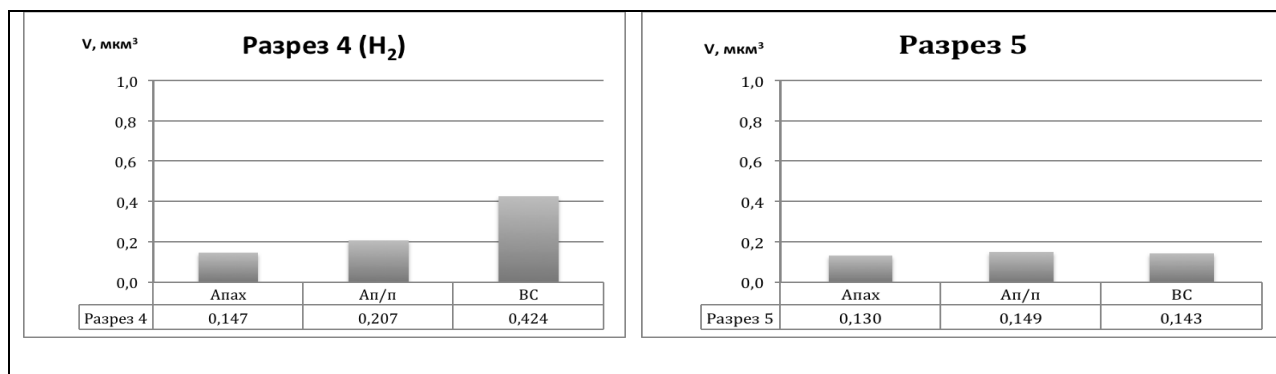


Рис. 31. Распределение численности клеток бактерий по размерам в 4 разрезе (с водородом) и в 5 разрезе (на удалении).

Как диаметр, так и объем клеток бактерий (рис. 32) были примерно равны в 4 разрезе и в 5 (фоновый). Наиболее значимое различие наблюдалось только в горизонте ВС: здесь средний объем клеток в 4 разрезе был выше ($0,424 \text{ мкм}^3$).



А



Б

Рис. 32. Диаметр клеток бактерий (А) и их объем (Б) в 4 и 5 разрезе.

Таким образом, было показано изменение численности и биомассы бактерий, спор грибов (рис. 23, рис. 28), актиномицетного мицелия (рис. 24, рис. 29) и грибного мицелия, в серых лесных почвах и в почвах черноземного ряда, вероятно, за счёт совместного влияния на них потоков эндогенного водорода и временного избыточного переувлажнения. Разделить влияние этих факторов не представлялось возможным. Показано, что в серых лесных почвах наиболее заметное воздействие было оказано на численность

бактерий, грибного мицелия и спор грибов: в тех разрезах, где наблюдалась водородная дегазация, их численность была ниже, чем в разрезах, не подвергшихся влиянию водорода. В почвах черноземного ряда изменения проявились на всех группах микроорганизмов: их численность была на порядок ниже в тех разрезах, где почва была переувлажнена, и шло активное выделение водорода.

Метод «каскадной» фильтрации показал, что максимальное различие между разрезами в черноземе наблюдалось в подпахатном горизонте, и была заметна разница в горизонте ВС. Во всех случаях доминировали бактерии диаметром $\geq 0,23$ и $\geq 0,38$ мкм, но в разрезе, под воздействием этих двух факторов их общая численность была в 2-3 раза ниже. При подсчете среднего диаметра и среднего объема клеток бактерий, было выявлено, что диаметр, и объем клеток в разрезе с выделением водорода и без него были примерно равны. Разница наблюдалась лишь в горизонте ВС: в образце с воздействием H_2 средний объем клеток был чуть выше. Это может быть связано с наличием в нем специфических форм бактерий, способных к использованию молекулярного водорода (Заварзин, 1972; Заварзин, 1978; Кондратьева, Гоготов, 1981; Гусев, Минеева, 2003).

6.3. Численность бактерий в условиях избыточного переувлажнения

Для того, чтобы разделить влияние избыточного переувлажнения от влияния водорода на микроорганизмы, был поставлен модельный опыт по созданию избыточного переувлажнения для гор. А и гор. В чернозема типичного.

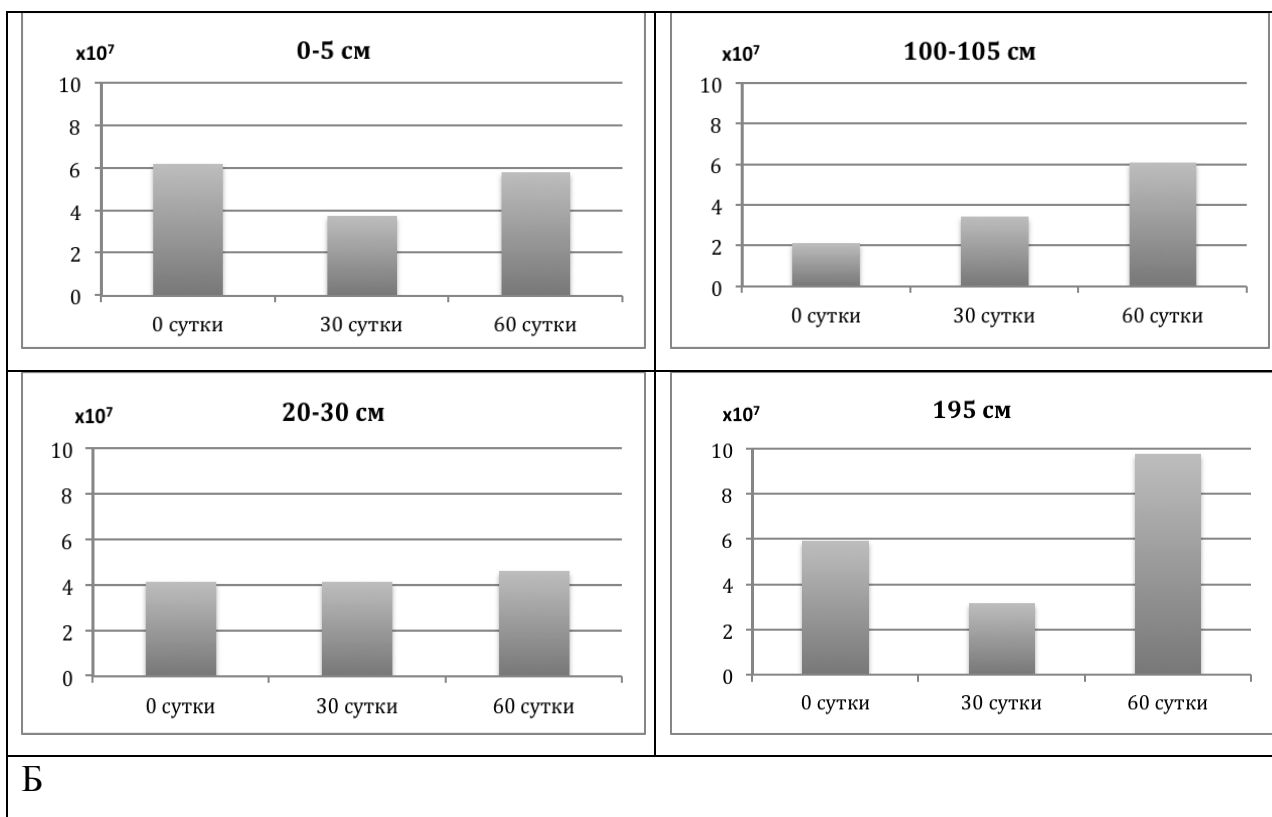
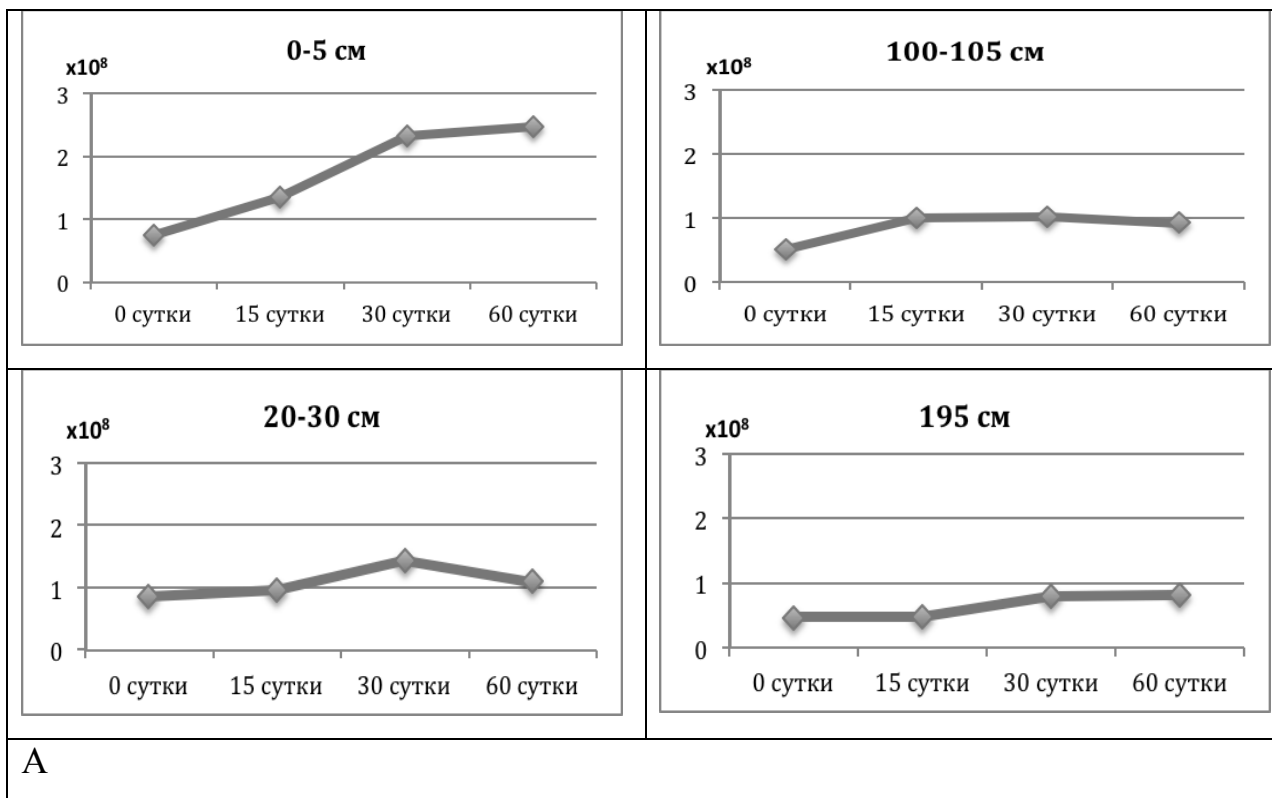


Рис. 33. А – распределение численности бактерий при подсчете на стеклах, Б – распределение численности бактерий при подсчете на фильтрах.

Распределение численности бактерий при подсчете на стеклах (рис. 33А) показало, что на 30 и 60 сутки проведения опыта бактерий становится больше по сравнению с контролем. Сходные закономерности наблюдались и при учете бактерий на фильтрах (рис. 33Б).

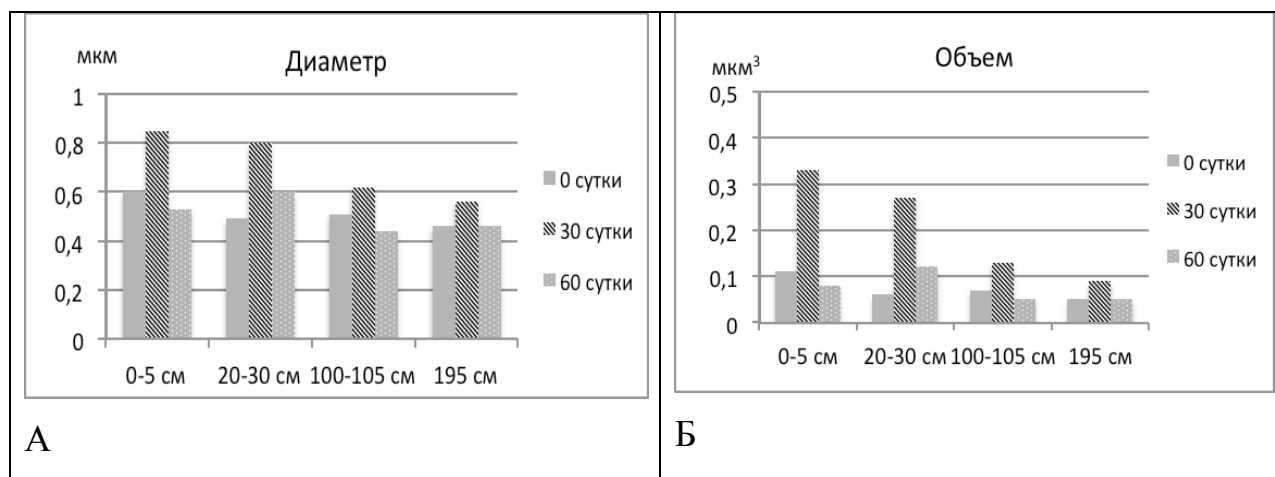


Рис. 34. А – диаметр клеток бактерий, Б – объем клеток бактерий.

Диаметр (рис. 34А) и объем (рис. 34Б) клеток бактерий в черноземе типичном под влиянием избыточного увлажнения убывают с глубиной и во всех случаях достигают своего максимума на 30 сутки.

Исходя из полученных данных, можно утверждать, что водород оказывает значительное влияние на микробное сообщество почв западин, находящихся в зоне эмиссии глубинного водорода, хотя нельзя отрицать и роль избыточного переувлажнения.

ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА НА СТРУКТУРУ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ

Полученные не так давно данные об аномально высоких концентрациях водорода в подпочвенном воздухе, образующие «кольцевые структуры проседания» позволяют говорить о его воздействии на свойства почв (Ларин, 2010).

Для того, чтобы убедиться во влиянии водорода на численность и структуру микроорганизмов, был проведен модельный эксперимент по продуванию почвы водородом.

Результаты, полученные как методом люминесцентной микроскопии, так и методом каскадной фильтрации, показывают снижение численности бактерий в почвах с водородом по сравнению с фоновой почвой (рис. 35). Максимальная разница наблюдалась на 21 сутки на стеклах: численность клеток бактерий в фоновой почве превышала таковую в почве с содержанием водорода практически в 8 раз. Наибольшее значение в фоновой почве составляло $6,9 \times 10^8$ клеток на 7-е сутки. Затем численность, определенная по методу подсчета на стеклах, значительно снижалась на 14-е, 21-е и 30-е сутки, составляя при этом не более 1×10^8 клеток в почве с водородом и около 3×10^8 клеток в фоновом образце.

Тот факт, что биомасса бактерий, полученная методом каскадной фильтрации, больше, чем биомасса бактерий по методу люминесцентной микроскопии (рис. 36), объясняется тем, что при подсчете по методу

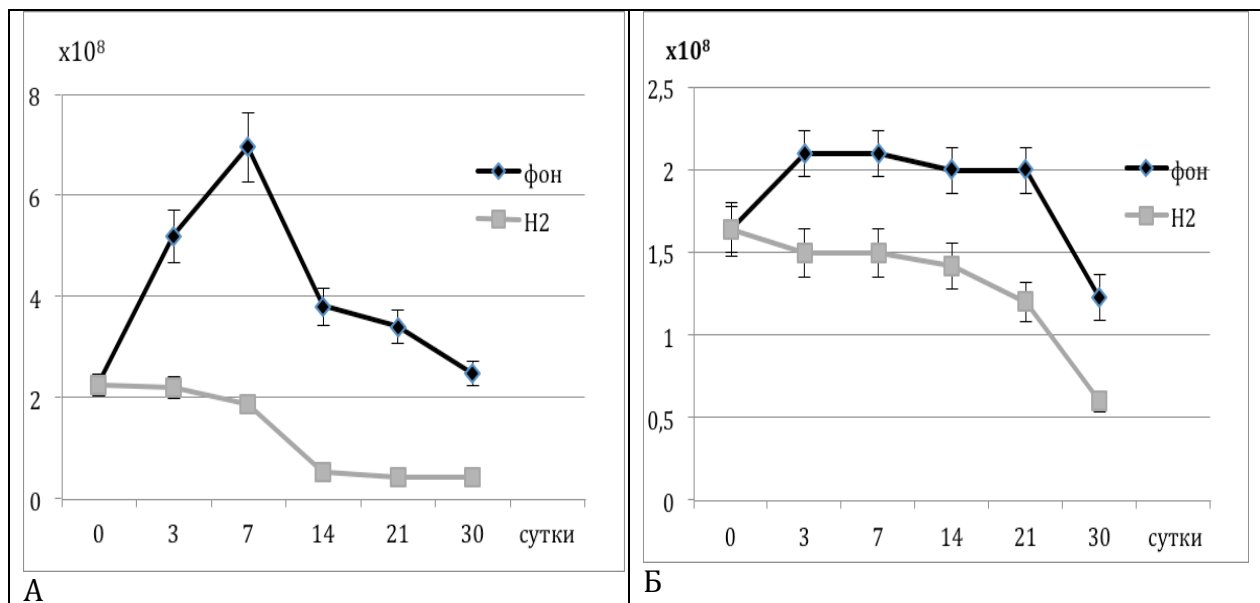


Рис. 35. Численность бактерий в фоновом образце и в образце, подвергнутом влиянию водорода, учтенная методом люминесцентной микроскопии (на стеклах) (А) и методом каскадной фильтрации (на фильтрах) (Б).

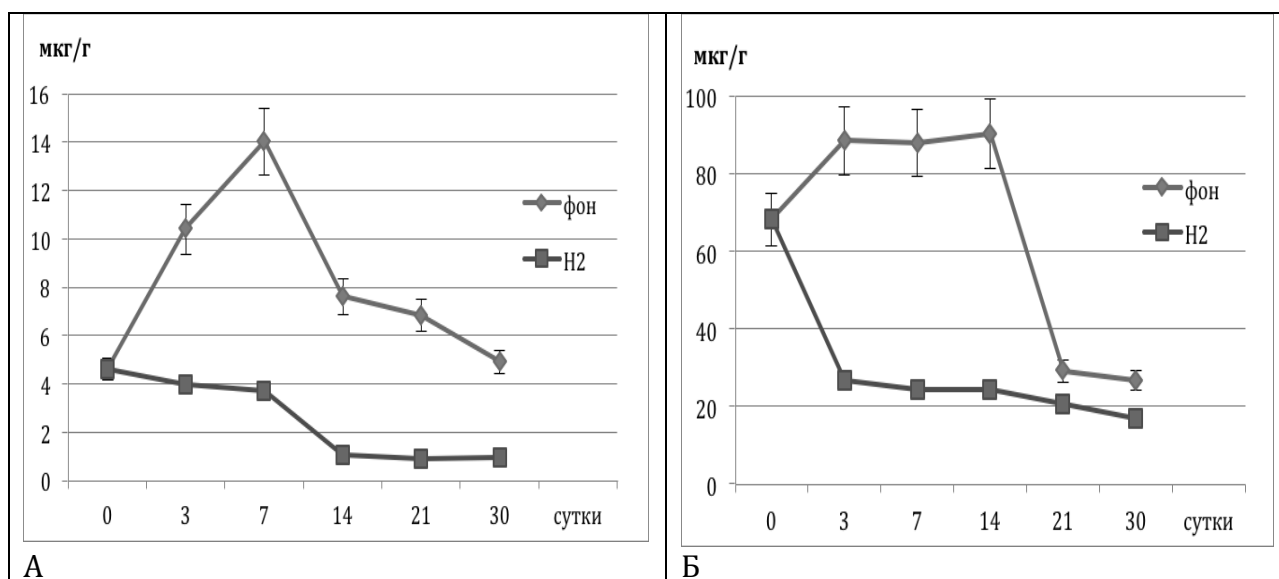


Рис. 36. Биомасса бактерий в фоновом образце и в образце, подвергнутом влиянию водорода, учтенная методом люминесцентной микроскопии (на стеклах) (А) и методом каскадной фильтрации (на фильтрах) (Б).

микроскопии мы традиционно принимаем объем одной бактериальной клетки равной $0,1 \text{ мкм}^3$, а при фильтровании мы учитываем бактерии с разными объемами, и здесь биомасса определяется в том числе бактериями с крупными клетками диаметром 1.85 и 1.43 мкм.

Табл. 4. Средний объем клеток бактерий в фоновой почве и почве, в которой пропускали водород (мкм^3).

	0 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
Фоновая почва	0,044	0,052	0,032	0,041	0,026	0,028
Почва с H_2	0,044	0,027	0,025	0,034	0,025	0,023

Небольшой средний объем клеток (табл. 4) можно объяснить следующими факторами: во-первых, температура культивирования 28°C действует как стрессовый фактор, подавляя как развитие, так и рост клеток; во-вторых, сказывается влияние анаэробных условий среды (Полянская и др., 2012; Горбачева, 2013). Как следует из литературы, на уменьшение объема клеток влияет также и недостаток питательных веществ (Вайнштейн и др., 2007; Лысак и др., 2010). Таким образом, биомасса на 14 сутки в фоновой почве по принятому в литературе методу с учетом, что бактериальная клетка имеет объем $0,1 \text{ мкм}^3$, с численностью 7×10^8 равна $5,4 \text{ мкг/г}$. С рассчитанным средним объемом $0,041 \text{ мкм}^3$ (см. табл. 4) биомасса равна $2,25 \text{ мкг/г}$, а по методу каскадной фильтрации она равна $90,1 \text{ мкг/г}$ (см. рис. 36).

Из данных (рис. 37) видно, что на 3-и сутки в фоновой почве значительно увеличивается как длина (825 м/г), так и биомасса грибного мицелия, которая возросла до $3,1 \text{ мкг/г}$. Затем они резко снижаются, доходя

в почве с содержанием водорода до 0 м/г и 0 мкг/г уже на 14-е сутки. В фоновой почве длина остается на уровне 200 м/г, а биомасса мицелия уменьшается по сравнению с началом опыта примерно в 7 раз.

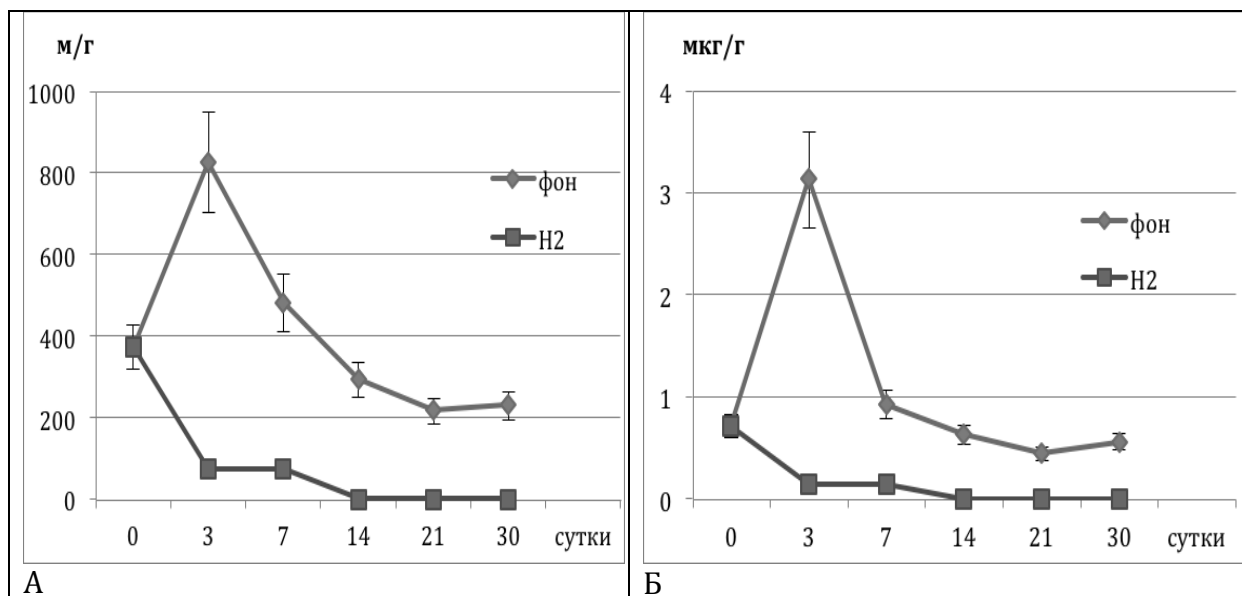


Рис. 37. Длина грибного мицелия (А) и его биомасса (Б) в фоновой почве и в почве, подвергнутой влиянию водорода.

Численность и биомасса спор грибов (рис. 38) в образцах достигают нуля уже на 7-е сутки. В целом численность и биомасса спор грибов, длина и биомасса мицелия в черноземе, содержащем водород, ниже, чем в фоновой почве в течение 3-7 суток, а далее они не учитываются. Причиной того, что грибы по сравнению с бактериями более угнетены под воздействием водорода, может быть способность прокариот (прежде всего бактерий) – гораздо более разнообразных по своим физиологическим характеристикам, нежели грибы, развивать специфические группы, устойчивые к такому воздействию. Грибы же представляют собой чрезвычайно компактную физиологическую группировку, и возможности их адаптации к внешней

среде значительно меньше, чем у бактерий. Это обстоятельство сказывается и при других видах воздействия на почву (Полянская и др., 1997; Свешникова и др., 2001а, 2001б; Полянская, Звягинцев, 2005).

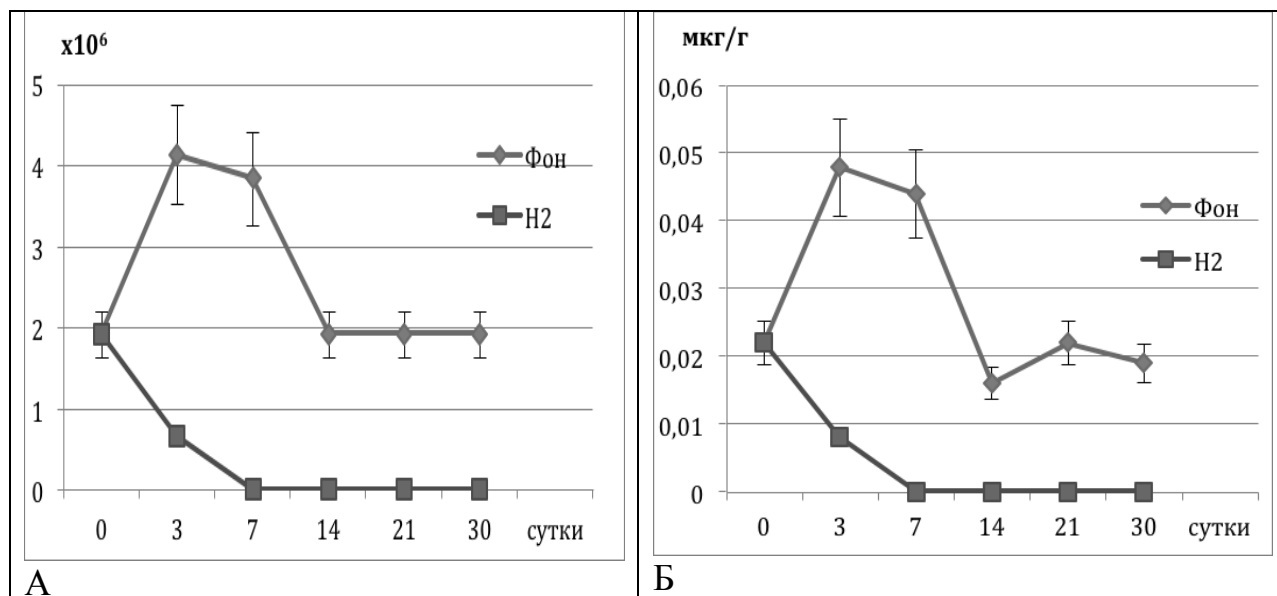


Рис. 38. Численность (А) и биомасса (Б) спор грибов (учет на стеклах) в фоновой почве и в почве, подвергнутой влиянию водорода.

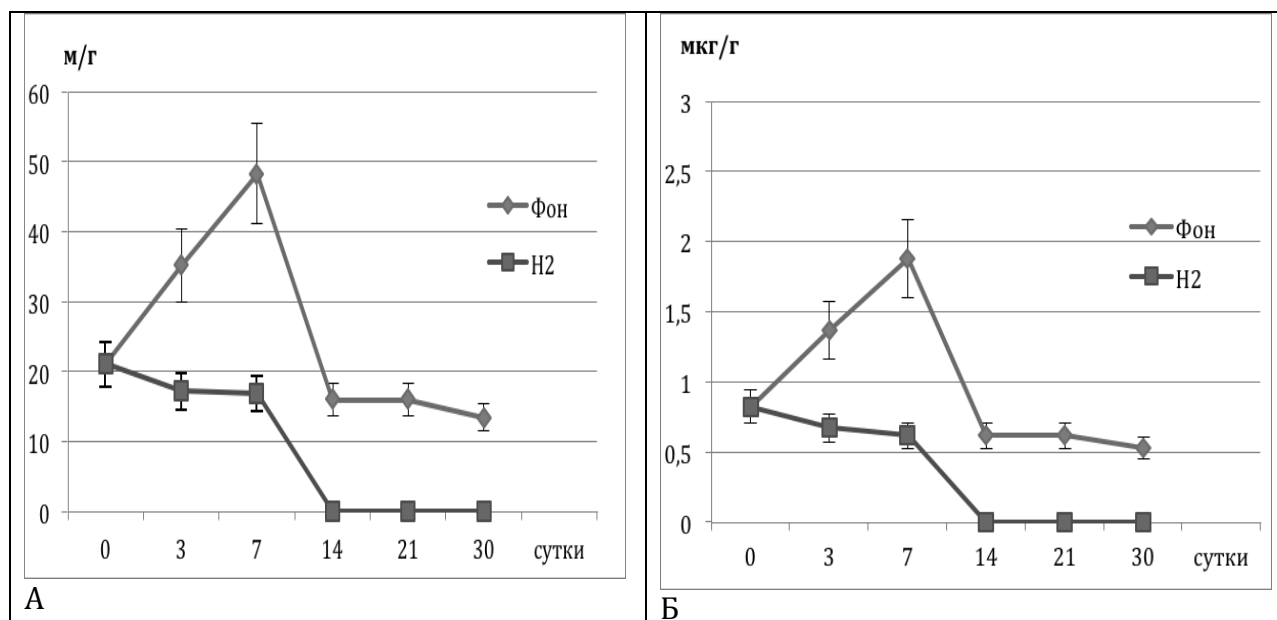


Рис. 39. Длина (А) и биомасса (Б) актиномицетного мицелия в фоновой почве и в почве, подвергнутой влиянию водорода.

Присутствие актиномицетного мицелия (рис. 39) в рассматриваемых образцах незначительно и достигает лишь 50 м/г на 7-е сутки в фоновых почвах, уже на 14-е сутки он полностью исчезает из почвы, в которой наблюдалось воздействие водорода. Биомасса также крайне мала, но, как и в других группах (грибы, бактерии), очевидно угнетающее действие водорода на численность и биомассу актиномицетов.

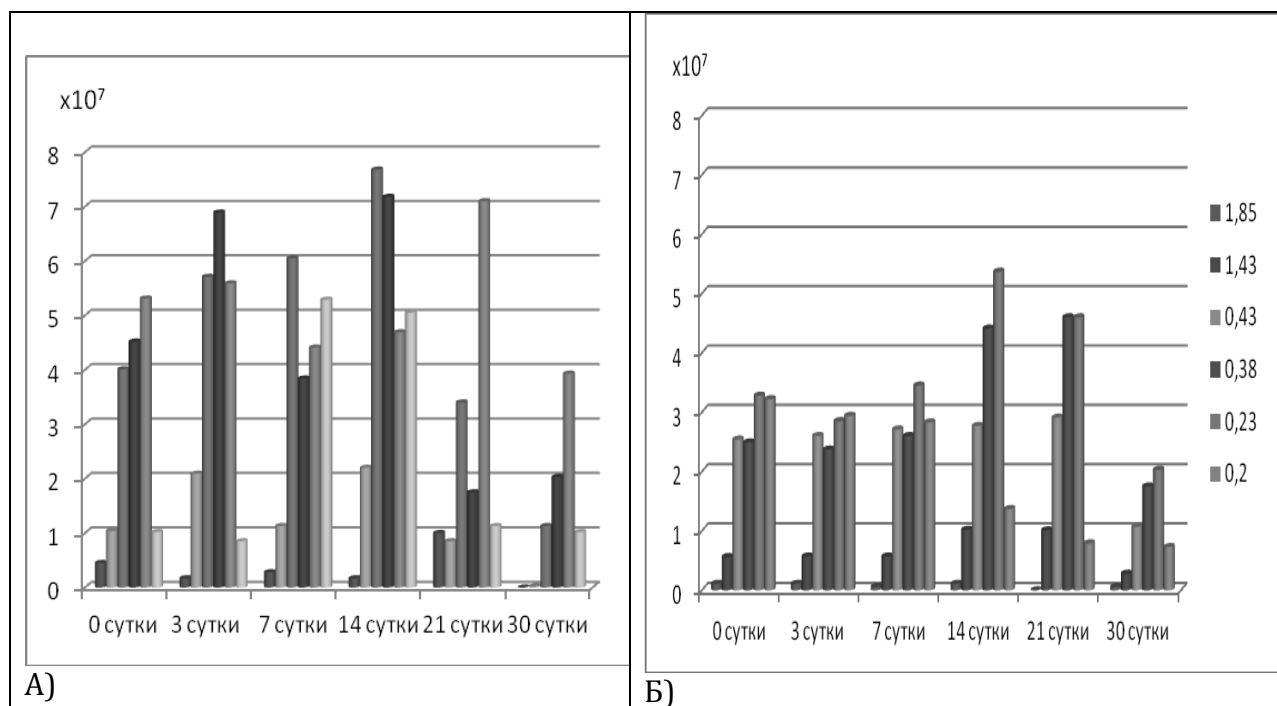


Рис. 40. Распределение клеток бактерий по размерам в фоновой почве (А) и в почве, подвергнутой влиянию водорода (Б).

Распределение клеток по размерам методом «каскадной фильтрации» (рис. 40) показало, что после 14-х суток в почве с содержанием водорода в основном преобладает группа мелких бактерий (с размерами 0,2 и 0,23 мкм), а в фоновой почве доминируют более крупные бактерии с размерами 0,38 и 0,43 мкм. Наибольшая численность клеток в обоих случаях наблюдается на

14-е сутки, причем в фоновой почве она превышала таковую в почве с содержанием водорода практически в 1,5-3 раза.

Из проделанной работы, можно сделать вывод, что водород подавляет развитие почвенных микроорганизмов в черноземе обыкновенном: уменьшается численность и биомасса бактерий, спор и мицелия грибов, а также длина актиномицетного мицелия по сравнению с фоновыми образцами. Исходя из полученных данных, можно утверждать, что именно водород влияет на микробное сообщество почв западин, находящихся в зоне эмиссии глубинного водорода и временного избыточного переувлажнения, хотя нельзя отрицать и негативную роль избыточного увлажнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что в изученных почвах с антропогенной нагрузкой (дерново-карбонатная и выщелоченный чернозем) доминировала биомасса грибного мицелия, составляя от 90% общей биомассы микроорганизмов в верхнем слое почв, возрастая вниз по профилю до 97%. В почвах залежи процент грибного мицелия был выше по сравнению с почвами пашни. В последних почвах был выше процент биомассы спор грибов (табл. 3). Доля прокариот была невысока и не превышала 1-3%, причем в почвах залежи этот процент был несколько выше, чем в пашне.

Дерново-карбонатная почва в отличие от чернозема, формирующаяся в более жестких условиях, характеризуется более высокой скоростью прироста микробной биомассы. Это можно объяснить, во-первых, большим ростом детрита (т.е. легкодоступного для микроорганизмов органического вещества) при оставлении почвы в залежь. Второй причиной может быть высококачественная технология использования пашни в хозяйстве «Болдино». По данным хозяйства на поля вносится большое количество органических удобрений, пашня характеризуется малой степенью выпашанности и высоким плодородием, а, следовательно, и слабой нарушенностью микробного сообщества.

Установлено, что в качестве показателей агроэкологического состояния почв нужно учитывать следующие показатели: размеры общей микробной биомассы; соотношение прокариот и эукариот в общей микробной биомассе,

а также соотношение доли спор и грибного мицелия в структуре грибной биомассы.

Выявлено значительное влияние совместного действия потоков водорода и временного избыточного переувлажнения на численность и биомассу бактерий, актиномицетного мицелия, грибного мицелия и спор грибов в серых лесных почвах и в почвах черноземного ряда. Было показано, что в серых лесных почвах эмиссия водорода оказала наиболее заметное воздействие на численность бактерий, грибного мицелия и спор грибов: в тех разрезах, где наблюдалась водородная дегазация, их численность была меньше, чем в разрезах, не подвергшихся влиянию водорода. В почвах черноземного ряда влияние проявилось на всех группах микроорганизмов: численность и бактерий, и актиномицетного мицелия, и мицелия грибов, и спор грибов была на порядок ниже в тех разрезах, где шло активное выделение водорода и наблюдалось временное избыточное переувлажнение.

С помощью метода «каскадной фильтрации» было исследовано распределение клеток бактерий по размерам. Результаты показали, что в черноземе максимальное различие между разрезами с выделением водорода и без него наблюдалось в подпахатном горизонте, а также разница была заметна в горизонте ВС. Во всех случаях доминировали бактерии диаметром 0,23 мкм и 0,38 мкм, но в разрезе, подвергшемся воздействию глубинного водорода, их общая численность была заметно ниже.

Было выявлено, что как диаметр, так и объем клеток в разрезе с выделением водорода и без него были примерно равны. Разница наблюдалась лишь в горизонте ВС: в образце с воздействием H_2 средний объем клеток был чуть выше. Это может быть связано с наличием в нем специфических форм бактерий, обладающих способностью использовать молекулярный водород (Заварзин, 1972; Заварзин, 1978; Кондратьева, Гоготов, 1981; Гусев, Минеева, 2003).

Небольшой средний объем клеток бактерий в модельном опыте по продуванию почвы водородом (табл. 4) объясняется следующими факторами: температурой культивирования, которая действует как стрессовый фактор, подавляя и развитие, и рост клеток; а также влиянием анаэробных условий среды (Полянская и др., 2012). Как известно из литературных данных, на уменьшение объема клеток влияет недостаток питательных веществ (Вайнштейн и др., 2007; Лысак и др., 2010). Биомасса бактерий в фоновой почве по принятому в литературе методу с учетом того, что бактериальная клетка имеет объем $0,1 \text{ мкм}^3$ с численностью клеток примерно 10^8 , равна несколько мкг/г. С рассчитанным средним объемом (см. табл. 4) биомасса бактерий также не превышала эти размеры, а по методу каскадной фильтрации она превышала их на порядок (см. рис. 36).

Определенные нами размеры бактерий примерно равны размерам, полученными в литературе ранее и соизмеримы с размерами клеток чистых бактериальных культур (Полянская и др., 2013), однако, и для почвенных бактерий в литературе приводятся такие данные (Гузов, Звягинцев, 2003;

Звягинцев, 1973). Разница в биомассе, выявленной двумя методами, обусловлена тем, что по методу люминесцентной микроскопии объем всех клеток принимается равным 0.1 мкм^3 (Кожевин и др., 1979), а метод каскадной фильтрации позволяет учитывать численность клеток бактерий разного размера.

Приведенные данные наглядно подтверждают тот факт, что биомасса, рассчитанная с учетом бактерий всех размерных групп, выше, чем биомасса, рассчитанная на стеклах с учетом их объема в $0,1 \text{ мкм}^3$. Таким образом, следует сделать вывод, что биомасса бактерий, вычисленная по методу каскадной фильтрации, наиболее точно отражает ее содержание в почвах. Численность бактерий по методу каскадной фильтрации лишена тех недостатков, которые демонстрирует метод люминесцентной микроскопии, где учет бактерий проводится в почвенной суспензии объемом $0,02 \text{ мл}$, и уже априори в расчетах численности учитывается коэффициент 50, а как показано, для учета численности микроорганизмов, эффект разведения играет огромную роль (Полянская и др., 2000). Реальное количество объектов на препаратах существенно отличается от такового, предсказанного теоретически. В методе каскадной фильтрации берется 1 мл почвенной суспензии и далее эта суспензия уже не разводится.

С учетом имеющихся данных, полученных в результате проделанных экспериментов с полевыми образцами и посредством модельных опытов, можно сделать заключение, что влияние избыточного переувлажнения на численность и структуру микробного сообщества изученных почв не столь

значимо, следовательно, главным фактором подавления развития микроорганизмов в почвах западин является водород.

ВЫВОДЫ

1. В изученных почвах залежей и пашен доминировала биомасса грибного мицелия, составляя от 90% общей биомассы микроорганизмов в верхнем слое почв, возрастая вниз по профилю до 97%. Дерново-карбонатная почва, по сравнению с черноземом, характеризуется более высокой скоростью прироста микробной биомассы.
2. Показано уменьшение численности и биомассы бактерий, спор грибов, актиномицетного и грибного мицелия в серых лесных и лугово-черноземных почвах западин, которое происходит за счет совместного влияния потоков водорода и временного избыточного переувлажнения.
3. Метод «каскадной фильтрации» показал, что максимальное различие между лугово-черноземной почвой (западина) и черноземом обыкновенным (фон) наблюдалось в подпахотном горизонте А, где численность бактерий в присутствии водорода и переувлажнения была в 2 раза ниже той, где не наблюдалось влияния этих 2-х факторов. В этих почвах доминировали мелкие бактерии диаметром 0,23 мкм и 0,38 мкм.
4. При проведении модельного опыта по пропусканию молекулярного водорода через почву установлено, что водород подавляет численность всех групп микроорганизмов (бактерий и спор грибов, а также длину актиномицетного и грибного мицелия) по сравнению с фоновыми образцами.

5. Как установлено методом «каскадной фильтрации» в модельном опыте, после 14-х суток в почве с содержанием водорода в основном преобладает группа мелких бактерий (с размерами 0,2 мкм и 0,23 мкм), а в фоновой почве доминируют более крупные бактерии с размерами 0,38 мкм и 0,43 мкм.

6. Влияние избыточного переувлажнения на численность бактерий по результатам модельного опыта оказалось не столь значимо, следовательно, водород — главный фактор, который и влияет на численность микроорганизмов в западинах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьева Н.Д., Полянская Л.М., Сусьян Е.А., Васенкина И.В., Вирт С., Звягинцев Д.Г. Сравнительная оценка микробной биомассы почвы, определяемой методами прямого микроскопирования и субстрат-индуцированного дыхания // Микробиология, 2008, т.77, №3, с. 404-412.
2. Антонов В.Е., Белаш И.Т., Дегтярева В.Ф., Понятовский Е.Г., Ширяев В.И. Получение гидрида железа при высоком давлении водорода // Докл. АН СССР, 1980, т. 252, №6, с.1384-1387.
3. Аристовская Т.В. Микробиология процессов почвообразования. Л.: Наука, 1980. 186с.
4. Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв – М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1989, 336 с.
5. Беляев С.С. Микробиологическое образование метана. – В кн.: Роль микроорганизмов в круговороте газов в природе – М.: Наука, 1979, 287 с.
6. Бетелев Н.П. О наличии водорода в составе природного газа на юго-восточном Устюрте // Докл. АН СССР, 1965, т. 161, № 6, с. 1422–1426.
7. Богоев В.М., Гильманов Т.Г. Численность и биомасса микроорганизмов в почвах некоторых зональных экосистем // Биологические науки, 1982, № 7, с. 80-83.
8. Богоев В.М. Количественная оценка численности, биомассы и

- биологической активности почвенных микроорганизмов: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. М.: Изд-во МГУ, 1981. 25 с.
9. Вайнштейн М.Б., Сузина Н.Е., Абашина Т.Н. Нанобактерии // Наука в России, 2007, № 3 (159), с. 10-14.
 10. Ваксман С.А. Гумус: Происхождение, химический состав и значение его в природе – М.: Сельхозгиз, 1937, 471 с.
 11. Виноградов А.П. Химическая эволюция Земли, М.: Изд-во АН СССР, 1959, 44 с.
 12. Войтов Г.И. Химизм и масштабы современного потока природных газов в различных геоструктурных зонах Земли // Журнал Всесоюзн. хим. Общества, 1986, т. 31, №5, с. 533-539.
 13. Гейдебрехт В.В. Определение микроорганизмов по профилю разных типов почв: Дисс. канд. биол. наук М.: МГУ. 1999. 136 с.
 14. Голлербах М.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. Л.: Наука, 1969, 228 с.
 15. Головченко А.В., Полянская Л.М., Добровольская Т.Г., Васильева Л.В., Чернов И.Ю., Звягинцев Д.Г. Особенности пространственного распределения и структуры микробных комплексов болотно-лесных экосистем // Почвоведение, 1993, № 10, с.78-89.
 16. Головченко А.В., Полянская Л.М. Сезонная динамика численности и биомассы микроорганизмов по профилю почвы // Почвоведение, 1996,

№ 10, с. 1227-1233.

17. Головченко А.В., Полянская Л.М.. Особенности годовых сукцессий микроорганизмов в почвах Южной тайги // Почвоведение, 2000, № 3, с. 320-328.
18. Горбачева М.А. Развитие бактерий и грибов в черноземе при разных уровнях аэрации // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ., 2013, 26 с.
19. Гузев В.С., Звягинцев Д.Г. Биометрический анализ клеток бактерий в почве // Микробиология, 2003, т. 72, №2, с. 221-227.
20. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология – М.: Academia, 2003. 462 с.
21. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. М.: ИКЦ – Академкнига, 2002, 282 с.
22. Добровольская Т.Г., Павлова О.С., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Бактериальные комплексы лесных биогеоценозов Окского заповедника: пространственная структура и таксономическое разнообразие // Микробиология, 1995, т. 64, № 6, с. 829-833.
23. Добровольский В.В. География почв с основами почвоведения – М.: Высшая школа, 1989, 320 с.
24. Заварзин Г.А. Бактерии и состав атмосферы – М.: Наука, 1984. 268 с.
25. Заварзин Г.А. Водородные бактерии и карбоксидобактерии – М.: Наука, 1978, 205 с.
26. Заварзин Г.А. Литотрофные микроорганизмы. – М.: Наука, 1972. 322

- с.
27. Заварзин Г.А. Микроорганизмы и состав атмосферы. – В кн.: Роль микроорганизмов в круговороте газов в природе – М.: Наука, 1979. 287 с.
28. Зайдельман Ф.Р. Теория образования светлых кислых элювиальных горизонтов почв и ее прикладные аспекты – М.: Красанд, 2009, 248 с.
29. Зингер А.С. Молекулярный водород в составе газа, растворенного в водах месторождений Нижнего Поволжья // Геохимия, 1962, № 10, с. 890–898.
30. Зборищук Ю.Н., Рымарь В.Т., Чевердин Ю.И. Состояние черноземов обыкновенных каменной степи — М.: МГУ, 2007. 160 с.
31. Звягинцев Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями – М.: МГУ, 1973, 175 с.
32. Звягинцев Д.Г. Микробное разнообразие в наземных экосистемах / Тез. Всероссийской конференции «микробиология почв и земледелие», СПб., 1998, С. 52.
33. Звягинцев Д.Г. Перспективы развития биологии почв / Труды Всероссийской конференции «Перспективы развития почвенной биологии», 2001. С. 10-21.
34. Звягинцев Д.Г. Подготовка почв с помощью ультразвука к количественному учету микроорганизмов // Вестник московского Университета. Серия 16: Биология, 1968, № 3, с. 127-129.

35. История плодородия почв. Ч. 1. Учение о перегное почв в XIX веке.
Под ред. В.Р. Вильямса и М.И. Бурского – М.; Л.: Изд-во АН СССР,
1940, 415 с.
36. Канивец В.И. Взаимодействие водорода, метана и сероводорода с
минеральной частью почвы, Почвоведение №5, 1970, с. 52-59
37. Касаткин В.Г. О формах органического вещества гумуса подзолистых
и заболоченных подзолистых почв. Науч. тр. Ивановского СХИ, 1948,
вып.9.
38. Каспаров С.В., Паников Н.С. Методические аспекты исследования
газообмена в системе почва-атмосфера. В Кн.: Взаимодействие
почвенного и атмосферного воздуха – М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1985.
39. Классификация и диагностика почв СССР. М.: Колос, 1977. 220 с.
40. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена,
2004. 342 с.
41. Князева И.Н., Полянская Л.М., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Учет
почвенных микроорганизмов с помощью микроскопии при низкой
численности объектов // Вестн. МГУ, сер. почвоведение. 1985. Т. 2. С.
62-70.
42. Кожевин П. А. Микробные популяции в природе. М.: МГУ, 1989. 175
с.
43. Кожевин П.А., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Динамика развития
различных микроорганизмов в почве // Микробиология. 1979. Т.48, №

4. С.490-494.
44. Кондратьева Е.Н. Автотрофные прокариоты – М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1996. 302 с.
45. Кондратьева Е.Н., Гоготов И.Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов – М.: Наука, 1981, 340 с.
46. Кононова М.М. Проблемы почвенного гумуса и современные задачи его изучения – М.: Изд-во АН СССР, 1951, 390 с.
47. Кривцов А.И., Войтов Г.И., Фридман А.И. и др. О содержании водорода в свободных струях в Хибинах // Докл. АН СССР, 1967, т. 178, № 5, с. 1190–1192.
48. Ларин В.Н. Земля состав, строение и развитие (альтернативная глобальная концепция). Автореф. дис. ... д-ра геол.-минер. наук. - М., 1991. - 46 с.
49. Ларин В.Н. Наша Земля – М.: Агар, 2005.
50. Ларин, Н. В., Ларин, В. Н., Горбатилов, А. В. Кольцевые структуры, обусловленные глубинными потоками водорода. // В сборнике А. Н. Дмитриевский, Б. М. Валяев (Ред.), Дегазация Земли: Геотектоника, Геодинамика, Геофлюиды; Нефть и Газ; Углеводороды и Жизнь. М.: Институт проблем нефти и газа РАН, 2010, с. 282–286.
51. Лебедев А.Ф. Исследование хемосинтеза у *Bacillus hydrogenes*. – Одесса.: Типолитография штаба округа, 1910.
52. Лысак Л.В., Лопыгина Е.В., Кононова И.А., Звягинцев Д.Г.

- Численность и таксономический состав ультрамикробактерий в почвах
// Микробиология, 2010, т. 79, № 3, с. 429-431.
53. Марфенина О. Е. Микологический мониторинг почв: возможности и перспективы // Почвоведение. 1994. № 1. С. 75-80.
54. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
55. Мехтиев С.Я., Чернобровина Р.М., Пресман Л.М. Сезонные изменения численности микроорганизмов в почвах Молдавии // Динамика микробиологических процессов в почве. Таллин, 1974. С. 92-98.
56. Минько О.И. Фармаковский Л.А. Интенсивность образования водорода и метана в почве в зависимости от ее влажности // Почвоведение, 1992, №3, с. 139-145.
57. Мирчинк Т.Г., Паников Н.С. Современные подходы к оценке биомассы и продуктивности грибов и бактерий в почве // Успехи микробиологии. М.: Наука, 1985. Т. 20. С. 198-226.
58. Мишустин Е.Н. Численность и динамика микробного населения почвы // Динамика микробиологических процессов в почве. Таллин, 1974. С. 6-8.
59. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium* – М.: Наука, 1974
60. Наумова Н.Б. Биомасса микроорганизмов в ненарушенных почвах Сибири // Сибирский экологический журнал. 1994. № 3. С. 275-281.

61. Никитина З.И., Антоненко А.М. Бактериальная и мицелиальная биомасса в почвах таежных экосистем Прииртышья // Биологические науки. 1982. № 7. С. 70-76.
62. Никонов В.В., Лукина Н.В., Полянская Л.М., Фомичева О.А., Исаева Л.Г., Звягинцев Д.Г. Численность и биомасса почвенных микроорганизмов коренных старовозрастных северо-таежных сосновых лесов при пирогенной сукцессии // Почвоведение. 2006. № 4. С. 432-444.
63. Орлов Д.С. Химия почв. М.: МГУ, 1992. 401 с.
64. Павлова О.С. Структура микробных сообществ почв Окского заповедника: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ., 1998. 22 с.
65. Павлова О.С., Полянская Л.М., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Звягинцев Д.Г. Особенности микробной сукцессии в почвах Окского заповедника // Почвоведение. 2000. № 3. С. 320-328.
66. Паников Н.С., Палеева М.В. Относительный вклад грибов в суммарную биомассу и активность сообщества почвенных микроорганизмов // Микология и фитопатология. 1986. № 6. С. 466-473.
67. Пиневиц А.В. Микробиология железа и марганца – С-Пб.: Изд-во СПбГУ, 2005, 373 с.
68. Полянская Л.М. Микробная сукцессия в почве: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: МГУ, 1996. 96с.

69. Полянская Л.М. Прямой микроскопический подсчёт спор и мицелия грибов в почве // Тез. конф. Изучение грибов в биогеоценозах. Свердловск. 1988. С.30.
70. Полянская Л.М., Гейдебрект В.В., Звягинцев Д.Г. Биомасса грибов в различных типах почв // Почвоведение. 1995а. № 5. С. 566-572.
71. Полянская Л.М., Гейдебрект В.В., Степанов А.Л., Звягинцев Д.Г. Распределение численности и биомассы микроорганизмов по профилям зональных типов почв // Почвоведение. 1995б. № 3. С. 322-328.
72. Полянская Л.М., Головченко А.В., Звягинцев Д.Г. Микробная биомасса в почвах // Доклады Академии наук. 1995в. Т. 344, № 6. С. 846-848.
73. Полянская Л.М., Головченко А.В., Звягинцев Д.Г. Определение жизнеспособности спор и мицелия грибов в почве // Микробиология. 1998. Т. 67, С. 832-836.
74. Полянская Л.М., Горбачева М.А., Звягинцев Д.Г. Размеры бактерий в черноземе в ходе микробной сукцессии при инкубировании почвы в аэробных и анаэробных условиях // Почвоведение, 2012, № 11, с. 1181-1187.
75. Полянская Л.М., Городничев Р.Б., Звягинцев Д.Г. Размеры бактерий в почвах, определяемые методом «каскадной фильтрации» // Известия РАН, 2013, № 2, с. 144-151.

76. Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Содержание и структура микробной биомассы как показатель экологического состояния почв // Почвоведение. 2005. № 6. С. 706-714.
77. Полянская Л.М., Оразова М.Х., Бурканова О.А., Звягинцев Д.Г. Микронавески ризосферной почвы и лабораторные артефакты // Микробиология, 2000, т. 69, № 4, с. 586-589.
78. Полянская Л.М., Полянский М.Р., Гейдебрект В.В. Современные представления о функционировании микробных сообществ в почвах // Труды Всероссийской конференции “Перспективы развития почвенной биологии”. 2001. С. 171-177.
79. Полянский М.Р. Воспроизводственные циклы в почве в свете традиционной концепции циклического времени. Социокультурная динамика в период становления постиндустриального общества: закономерности, противоречия, приоритеты // Материалы к III Междунар. Кондратьевской конференции. М., 1998. С. 447-450.
80. Розанова Е.П. Новые данные о сульфатвосстанавливающих и метанообразующих бактериях // Успехи микробиологии, 1978, №13, с. 64
81. Роль организмов в газообмене почв, под ред. Розанова Б.Г. – М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1986, 68 с.
82. Рудаков В.П. Эманиационный мониторинг геосред и процессов – М.: Научный мир, 2009, 175 с.

83. Свешникова А.А., Полянская Л.М., Лукин С.М. Влияние окультуривания и мезорельефа на структуру микробной биомассы дерново-подзолистой и серой лесной почв // Микробиология. 2001а. Т. 70, № 4., С. 558-566.
84. Свешникова А.А., Полянская Л.М., Лукин С.М. Особенности почвенных микробоценозов различных угодий Владимирского ополья // Почвоведение. 2001б. № 4. С. 461
85. Смагин А.В. Газовая фаза почв – М.: Изд-во Моск. Ун-та, 2005. 301 с.
86. Суханова Н.И., Трофимов С.Я., Полянская Л.М., Ларин Н.В., Ларин В.Н. Изменение гумусного состояния и структуры микробной биомассы в местах водородной эксгаляции // Почвоведение, 2013, №2, с. 152-162.
87. Сывороткин В.Л. Глубинная дегазация Земли и геоэкологический проблемы приграничных территорий России // Электронное научное издание Альманах Пространство и Время, 2013, Т. 3, Вып. 1.
88. Сывороткин В.Л. Глубинная дегазация Земли и глобальные катастрофы. - М.: ООО «Геинформцентр» - 2002.
89. Титлянова А.А., Наумова Н.Б., Косых Н.П. Круговорот углерода в луговых экосистемах // Почвоведение. 1993. № 3. С. 32-39.
90. Титлянова А.А., Тесаржова М.Р. Режимы биологического круговорота. Н.: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 150 с.
91. Урусевская И.С., Щипихина Л.С. Содержание и состав гумуса почв

различной степени оглеенности в условиях дерново-подзолистой зоны.

Науч. докл. высш. шк. Биол.науки, 1978, №10.

92. Фармаковский Д.А., Каспаров С.В., Минько О.И. Кинетические закономерности поглощения H_2 почвой (лабораторный эксперимент) // Почвоведение, 1989, №12, с. 141-145.
93. Широких А.А., Широких И.Г., Полянская Л.М. Профильное распределение численности и биомассы микроорганизмов в кислых почвах Кировской области // Почвоведение. 2001. № 7. С. 845-851.
94. Шмидт О.Ю. Четыре лекции о теории происхождения Земли, М.: Изд-во АН СССР, 1957, 141 с.
95. Щербаков А.В., Козлова Н.Д. Водородные аномалии в подземных флюидах глубинных разломов земной коры // Геотектоника, 1988, № 2, с. 56–66.
96. Anderson T.H., Domsch K. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils // Soil Biol. Biochem. 1989. № 21. P.471-479.
97. Anderson J.P., Westmoreland D. Direct counts of soil organisms using a fluorescent brightener and a europium chelate // Soil Biol. Biochem. 1971. V. 3. P. 85-87.
98. Angino E.E., Zeller E.J., Dreschhoff G.A.M., Goebel E.D., Coveney R.M.Jr. Spatial distribution of hydrogen in soil gas in central Kansas, USA // Geochemistry of gaseous elements and compounds, Theophrastus Publishers, Athens, Greece, 1990, p. 485-493.

99. Baath E., Soderstrom B. Seasonal and spatial variation in fungal biomass in forest soil // Soil. Biol. Biochem. 1982. N 14. P. 353-358.
100. Babiuk L.A., Paul E.A. The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial biomass of grassland soil // Can. J. Microbiol. 1970. Vol. 16. P. 57-62.
101. Beare M.H., Neely C.L., Coleman D.C., Hargrove W.L. A substrate - induced respiration (SIR) method for measurement of fungal and bacterial biomass on plant residues // Soil Biol. Biochem. 1990. V. 22. P. 585-594.
102. Burris R.H. Energetic of biological N₂ fixation. – In: Biological Solar Energy Conversion / Ed. A Mitsui, S. Miyachi, A. San Pietro, S. Tamura. N.Y.: Acad. Press, 1977, p. 275.
103. Charlou J.H.L., Donval J.P., Konn C., Birot D., Sudarikov S., Jean P., Ondré as H. High flux of hydrogen, abiogenic methane and heavier hydrocarbons from the slow-spreading Mid-Atlantic // Geophysical Research Abstracts, 2008, v. 10.
104. Chrzanowski T.H., Crotty R.D., Hubbard J.G., Welch R.P. Applicability of the fluoresceindiacetate method of detecting active bacteria in freshwater // Microb. Ecol. 1984, vol.10, p.179-185.
105. Cole J.A. Microbial gase metabolism – In: Advances in Microbial Physiology, N.Y., 1976, Vol. 14, p. 1.
106. Conrad R., Seiler W. The role of hydrogen bacteria during decomposition of hydrogen by soil – FEMS Microbiol. Lett., 1979, vol. 6, p.

- 143.
107. Dixon R.O.D. Nitrogenase-hydrogenase interrelationships in Rhizobia.- Biochimie, 1978, vol. 262, p. 173.
108. Elorsa M.V., Rico H., Sentandrey R. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. // J.Gen.Microbiol., 1983, vol.129, p. 217-223.
109. Hunt G.A., Fogel R. Fungal hyphal dynamics in a western Oregon Douglas-fir stand // Soil Biol. Biochem. 1983, vol. 15, p. 641-649.
110. Jones V.T., Pirkle R.J. Helium and hydrogen soil gas anomalies associated with deep or active faults // 181st ACS National Meeting, Atlanta, GA, 1981.
111. Kaserer H. Uber die Oxidation des Wasserstoffs und des Methans durch Mikroorganismen. – Zbl. Bakteriolog. II Abt., 1906, vol. 15, p. 573.
112. Kjoller A., Struwe S. Analysis of fungal communities on decomposing beech litter / in: Ritz K., Dighton J., Giller K. E. (eds.) Beyond the biomass. UK: John Wiley & Sons, 1994, p. 191-198.
113. Kjoller A., Struwe S. Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil // Oikos, 1982, vol. 39, p. 389—422.
114. Kronig R., de Boer J., Korrington J. On the internal constitution of the Earth // Physica, 1946, vol. 12, issue 5, p. 245–256.
115. Kunc F. Methods for the analysis of soil microbial communities / in: Ritz K., Dighton J., Giller K. E. (eds.) Beyond the biomass. UK: John Wiley

- & Sons, 1994, p. 23-29.
116. Liebl K.H., Seiler W. CO and H₂ destruction at the soil surface. – In: Microbial. Production and utilization of gases. H.G. Schlegel, G. Gottschalk, N. Pfenning (Eds.). Gottingen, E. Goltze K. G., 1976, p. 215-230.
117. Lundgren B. Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil // *Oikos*, 1981, vol.36, p.17-22.
118. Mao D.M., Min Y.W., Yu L.L., Martens R., Insam H. Effect of a forestation on microbial biomass and activity in soils of tropical China // *Soil Biol. Biochem.* 1992, vol. 24, p. 865-872.
119. McCarthy H., McGuire E. Soil gas studies along the Carlin trend, Eureka and Elko counties, Nevada. In: Tosdal RM, editor // *Contributions to the gold metallogeny of Northern Nevada. Open-File Report 98–338.* US Dept. of the Interior, US Geological Survey, Menlo Park, 1998, p. 243–250.
120. Neal C., Stanger G. Hydrogen generation from mantle source rocks in Oman // *Earth and Planetary Science Letters*, 1983, vol. 66, p. 315–320.
121. Neely C.L., Beare M.H., Hargrove W.L., Coleman D.C. Relationships between fungal and bacterial substrate - induced respiration, biomass and plant residue decomposition // *Soil Biol. Biochem.* 1991, vol. 23, p. 947-954.
122. Newel K.D., Doveton J.H., Merriam D.F., Lollar B.Sh., Waggoner W.M., Magunson L.M. H₂-rich and hydrocarbon gas recovered in a deep Precambrian Well in Northeastern Kansas // *Natural Resources Research*,

- 2007, vol.16, issue 3, p. 277-292.
123. Ohwaki K., Hungate R.E., Hydrogen utilization by *Clostridium* in sewage sludge. – *Appl. And Environ. Microbiol.*, 1977, vol. 33, p. 1270.
124. Polyanskaya L. M., Zvyagintsev D. G. Microbial succession in soil // *Soviet scientist reviews*. Harwood Academic Publ. GmbH, 1995, № 1. P. 1-65.
125. Powlson D.S. The soil microbial biomass: before, beyond and back // in: Ritz K., Dighton J., Giller K. E. (eds.). *Beyond the biomass*. UK: John Wiley & Sons, 1994, p. 3-21.
126. Sano Y., Urabe A., Wakita H. Origin of hydrogen-nitrogen gas seeps, Oman // *Applied Geochemistry*, 1993, vol. 8(1).
127. Sato M., Sutton A.J., McGee K.A., Russell-Robinson S. Monitoring of hydrogen along the San Andreas and Calaveras Faults in central California in 1980–1984 // *Journal of Geophysical Research*, 1986, vol. 91, Issue B12, p. 12315-12326.
128. Schlegel H.G., Eberhardt U. Regulatory phenomena in the metabolism of Knallgasbacteria. – In: *Advances in microbial physiology*. L.; N.Y.: Acad. Press, 1972, vol. 7, p. 205.
129. Schubert K.R., Evans H.J. The relation of Hydrogen reaction to nitrogen fixation in nodulated symbionts. – In: *Recent Developments in Nitrogen Fixation* / Ed. W. E. Newton, J. R. Postgate. L. etc.: Acad. Press, 1977, p. 469.

130. Seiler W. Conceivable perturbations of the CH₄ and H₂ production by “Microbial energy conversion” on the cycle of atmospheric trace gases. – In: Microbial Energy Conversion, Gottingen: Goltze E., 1976, p. 483.
131. Seiler W. The influence of the biosphere on the atmospheric CO and H₂ cycles – Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology. Ann. Arbor Sci. Publ., 1978, vol. 3, p.773.
132. Smith L.A., Hill S., Yates M.G., Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen fixing bacteria. – Nature, 1976, vol. 262, p. 209.
133. Stevenson D. J. Hydrogen in the Earth’s core // Nature, 1977, vol. 268, p. 130–131.
134. Wakita H., Nakamura Y., Kita I., Fujii N., Notsu K. Hydrogen release: new indicator of fault activity // Science, 1980, vol. 210, p. 188–190.
135. Ware R.H., Roecken C., Wyss M. The detection and interpretation of hydrogen in fault gases // Pure Appl Geophys PAGEOPH, 1985, vol. 122, p. 392–402.
136. Williams Q., Hemley R.J. Hydrogen in the deep Earth // Annu. Rev. Earth Planet. Sci, 2001, № 29, p. 365–418.
137. Zgonnik V., Beaumont V., Deville E., Larin N., Pillot D., Farrell K.M. Evidence for natural molecular hydrogen seepage associated with Carolina bays (surficial, ovoid depressions on the Atlantic Coastal Plain, Province of the USA) // Progress in Earth and Planetary Science, 2015, vol. 2.