

На правах рукописи



Чакмазян Карина Вачиковна

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

Специальность 03.02.03 — микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Диссертационная работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель: **Полянская Любовь Максимовна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», профессор

Официальные оппоненты: **Домрачева Людмила Ивановна**, доктор биологических наук, профессор кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии агрономического факультета ФГБОУ ВО "Вятская государственная сельскохозяйственная академия", профессор

Семенова Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения экологических функций почв ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Защита диссертации состоится «31» мая 2016 года в 17 час 00 мин в аудитории М-2 на заседании Диссертационного совета Д 501.002.13 при ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, корпус 1, стр.12, факультет почвоведения.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайтах <https://istina.msu.ru/dissertations/19019962/> и <http://soil.msu.ru/nauka/uchenyj-sovet>

Автореферат разослан «_____» марта 2016 г.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью организации, просьба направлять по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, д. 1, стр.12, факультет почвоведения, Учёный совет.
Тел/Факс: (495)9392947

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.002.13,
кандидат биологических наук



Костина Наталья Викторовна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Ваксман, 1937; История

плодородия, 1940; 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 имени М.В. Ломоносова. Положения работы были представлены на российских и международных конференциях: 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.); Международная научная конференция XVI Докучаевские молодежные чтения «Законы почвоведения: новые вызовы» (Санкт-Петербург, 2013 г.); XI Международная конференция «Государственное управление: Российская Федерация в современном мире» (Москва, 2013 г.); 18-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 2014 г.); Международная научная конференция «Экология и биология почв» (Ростов-на-Дону, 2014 г.); Международная научная конференция XVII Докучаевские молодежные чтения (Санкт-Петербург, 2015 г.).

Публикации. По теме исследований опубликовано 2 статьи и 1 принята в печать 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., А.Л. Степанова, проф., д.б.н. Д.Г. Звягинцева, сотрудников кафедры химии почв: к.б.н. Н.И. Суханову и к.б.н. А.В. Кирюшина за консультацию, помощь в исследовании и за предоставленные образцы почв.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования были взяты следующие почвы (названия почв приводятся по книге «Классификация и диагностика почв СССР, 1977»):

1. Чернозем выщелоченный (Нижегородская область, Болдино): 25-летняя, 16-летняя, 10-летняя залежь и пашня. 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.

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.

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

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: серая лесная оподзоленная (разрез 1), серая лесная гумусово-псевдофибровая (разрез 2), серая лесная (разрез 3) серая лесная глеевая (разрез 4) и серая лесная почва (разрез 5).

В серых лесных почвах имелись данные по содержанию органического углерода и значения pH. 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, pH 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). 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).

2. МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В РАБОТЕ

Методика определения численности и биомассы микроорганизмов методом люминесцентной микроскопии. В качестве основного приема предварительной обработки образцов (просеянных через сито с диаметром 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 4 см². 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. 1). 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 (Полянская, 1988).

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

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

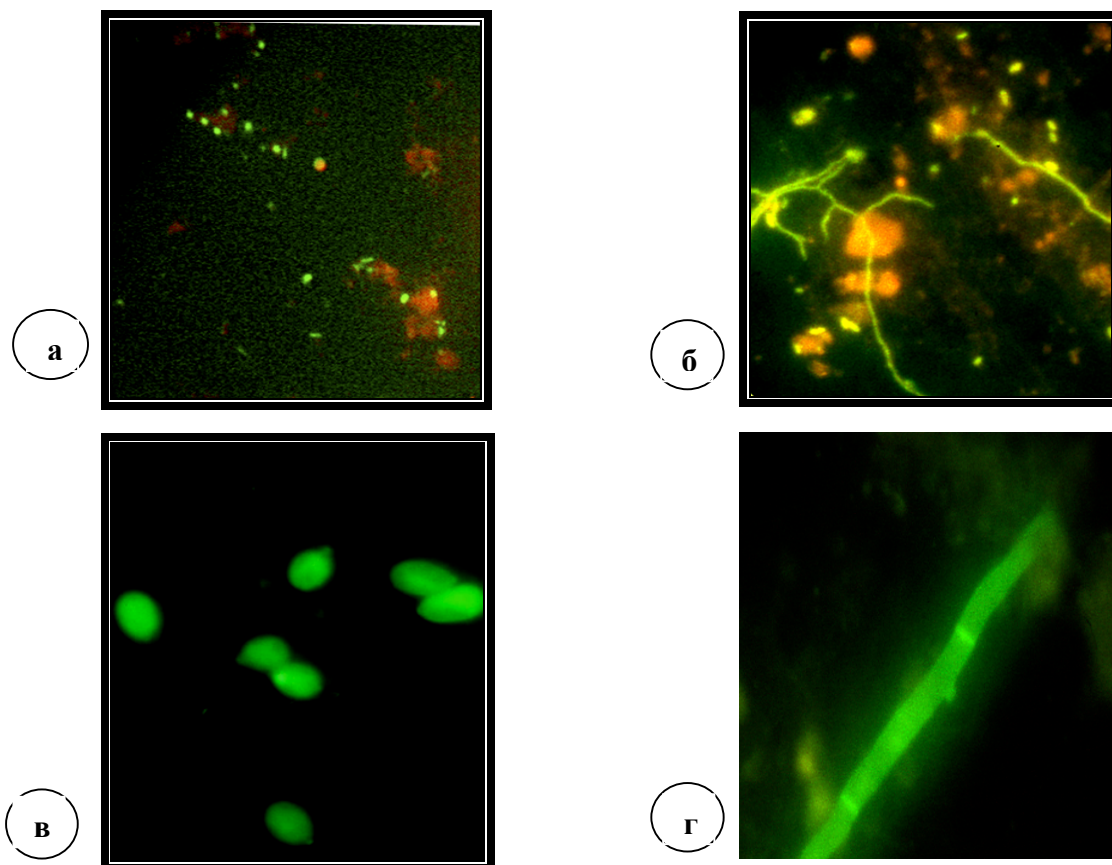


Рис. 1. Клетки бактерий (а), мицелий актиномицетов (б), окрашенные красителем акридином оранжевым, споры (в) и мицелий грибов (г), окрашенные красителем калькофлуором белым, при просмотре препаратов в люминесцентном микроскопе. Увеличение $\times 1000$.

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 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).

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 «Сынпор» 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, использовали 2 фильтра с размером пор 1.85 мкм, первый 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, условно принимая размеры клеток, равными диаметру пор фильтра, на котором они осаждались. В расчетах принимали, что клетки имеют шаровидную форму (Полянская и др. 2012).

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, мкм^2 ; 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); c – 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%.

Модельный опыт по продуванию почвы водородом. Для получения водорода в лабораторных условиях использовался генератор водорода типа сгс-2. В пенициллиновые флаконы объемом 15 мл помещалась навеска почвы массой 5 г, 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

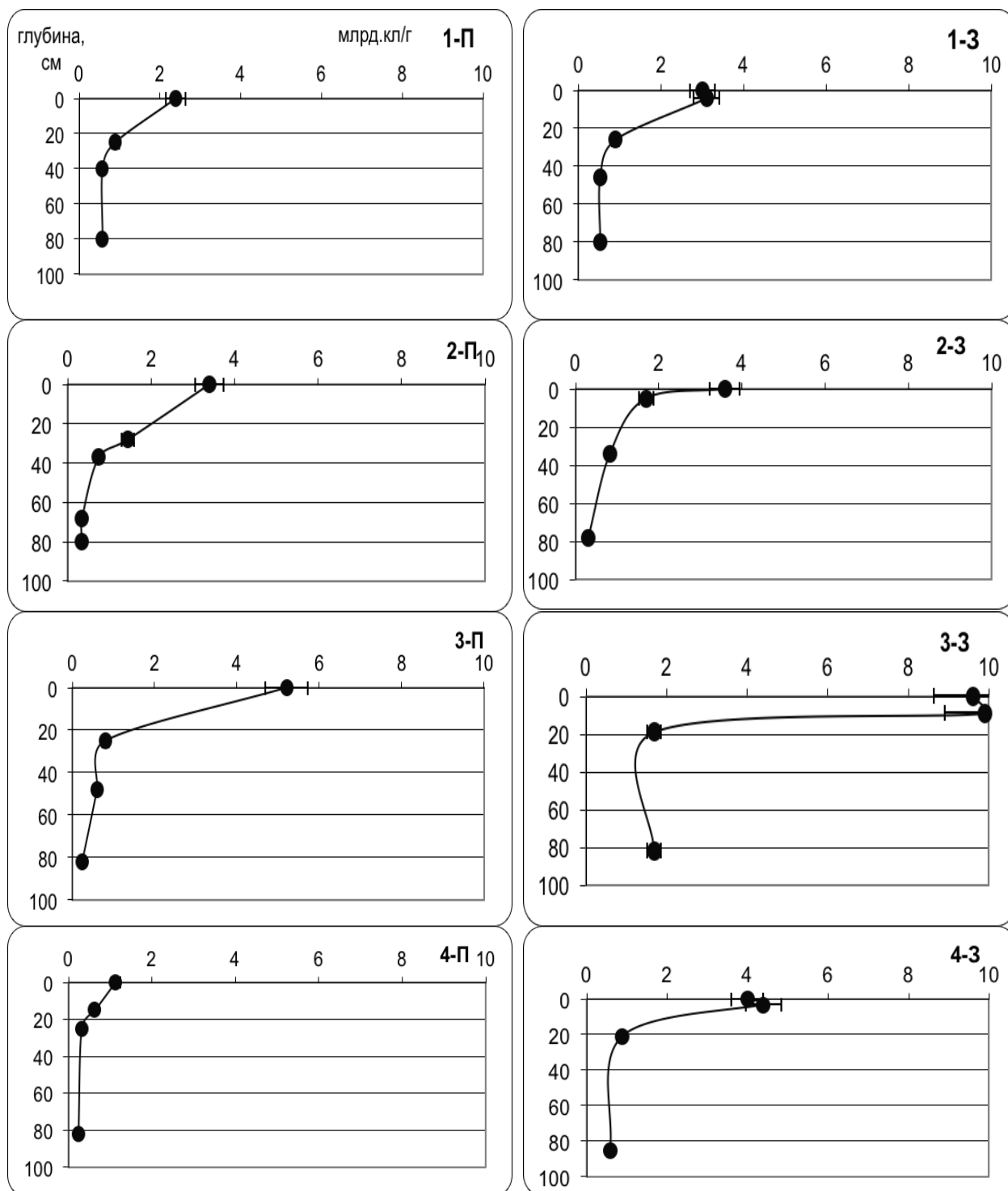
Особенности изменения структуры микробной биомассы почв в условиях залежи.

На рис. 2А 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.

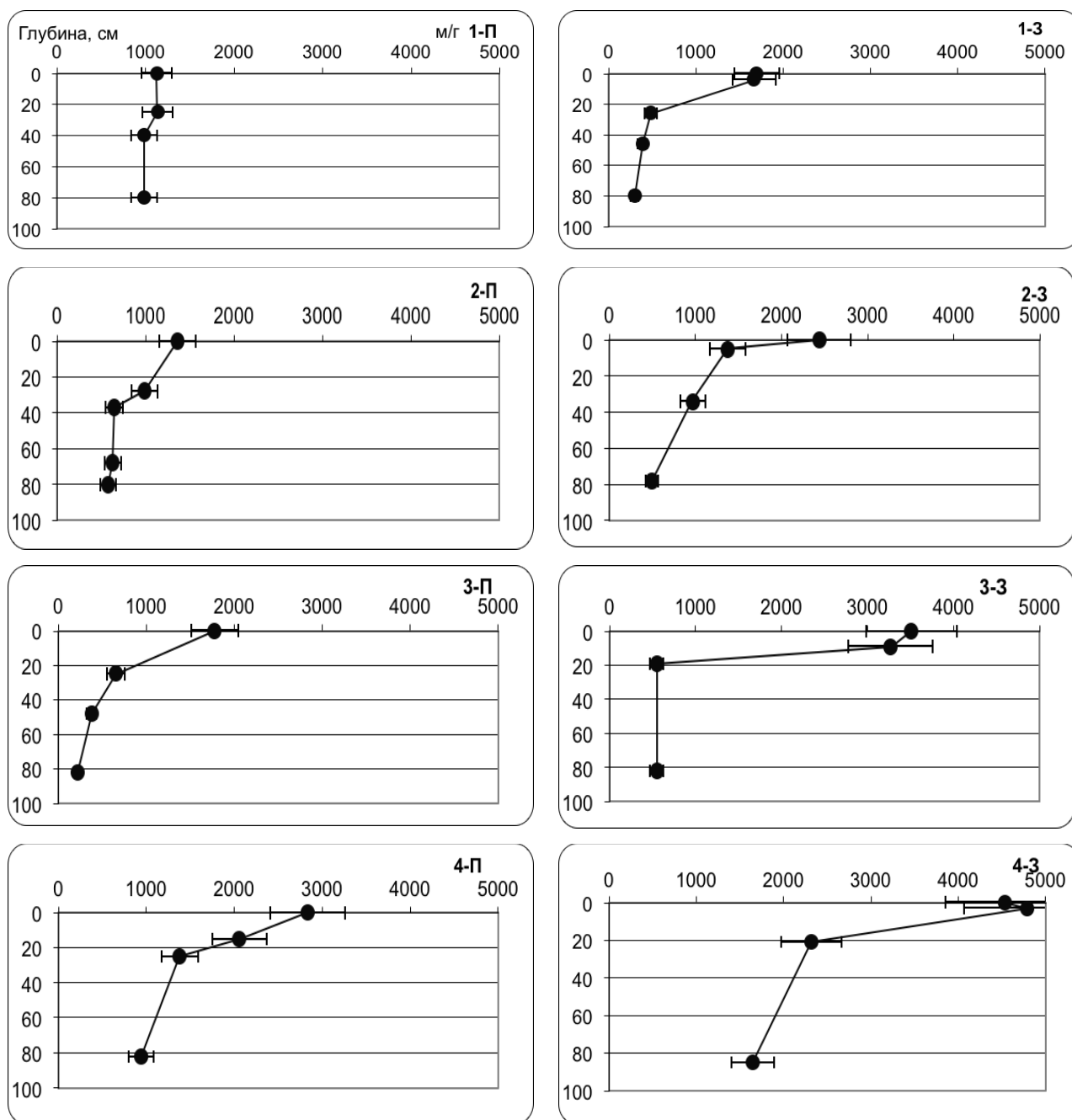
Длина актиномицетного мицелия в верхнем слое пашен выщелоченного чернозема примерно одинакова во всех вариантах. Но в дерново-карбонатной почве она составляла около 200 м/г почвы, что более чем в 2 раза ниже таковых для разных вариантов выщелоченного чернозема. В верхнем слое гор. А всех изученных вариантов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



А



Б

Рис. 2. Распределение микроорганизмов по профилю изученных почв: А – распределение численности клеток бактерий, Б – распределение длины мицелия грибов.

Обозначение: П-пашня, З-залежь.

1-П, 1-З – выщелоченный чернозем, находящийся 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.

Табл. 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

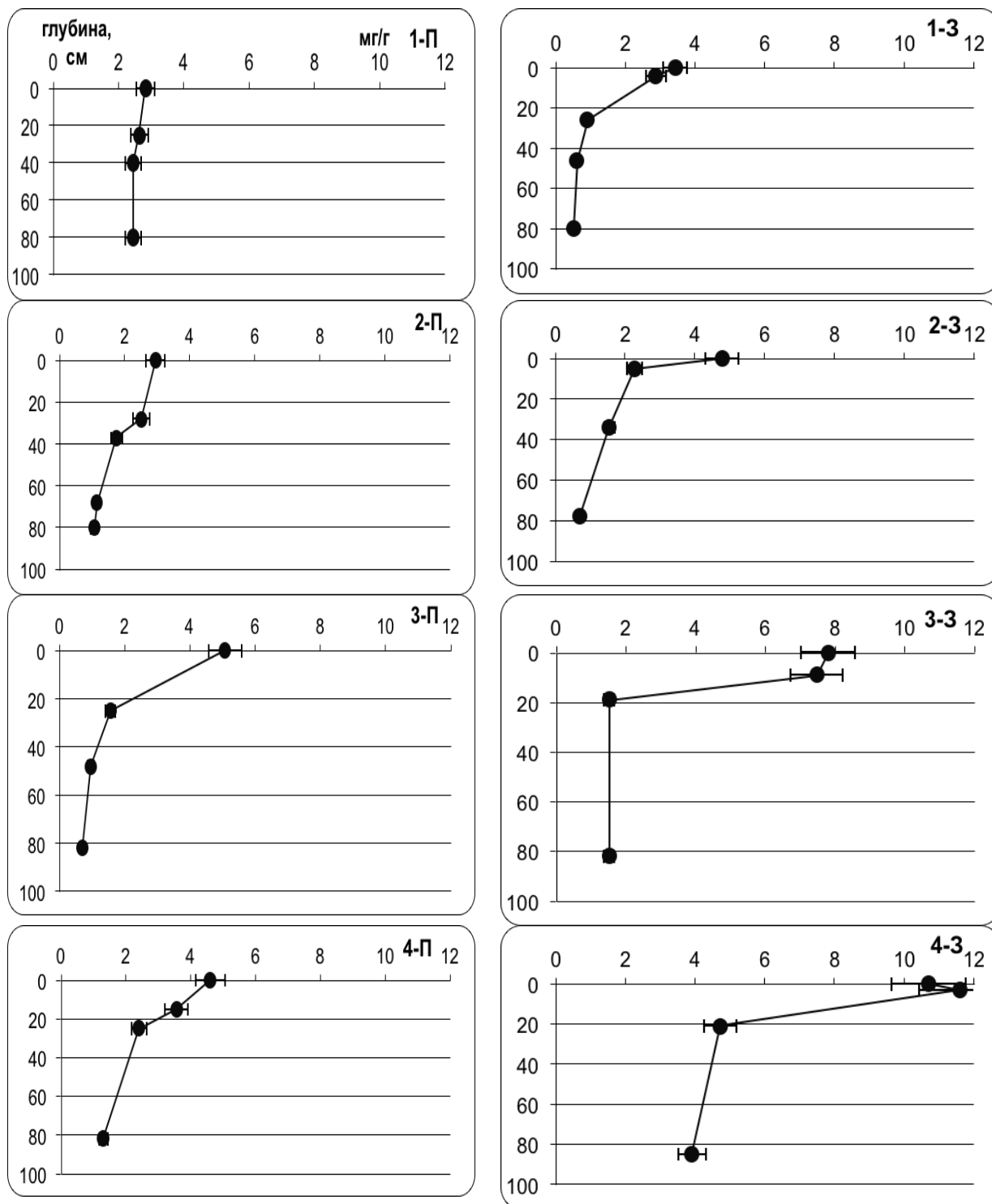


Рис. 3. Распределение общей биомассы разных групп микроорганизмов (мг/г почвы) по профилю изученных почв. Обозначения см. рис. 2.

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. Как следует из таблицы, процент спор в общей биомассе микроорганизмов в 1,5-2 раза выше в верхнем слое распаханной почвы 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 на рис. 3, показывает тенденцию ее распределения 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;).

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. 4 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 залежи она была чуть ниже таковой пашни. Это связано с резким падением длины грибного мицелия в нижних горизонтах залежи (рис.3 Б).

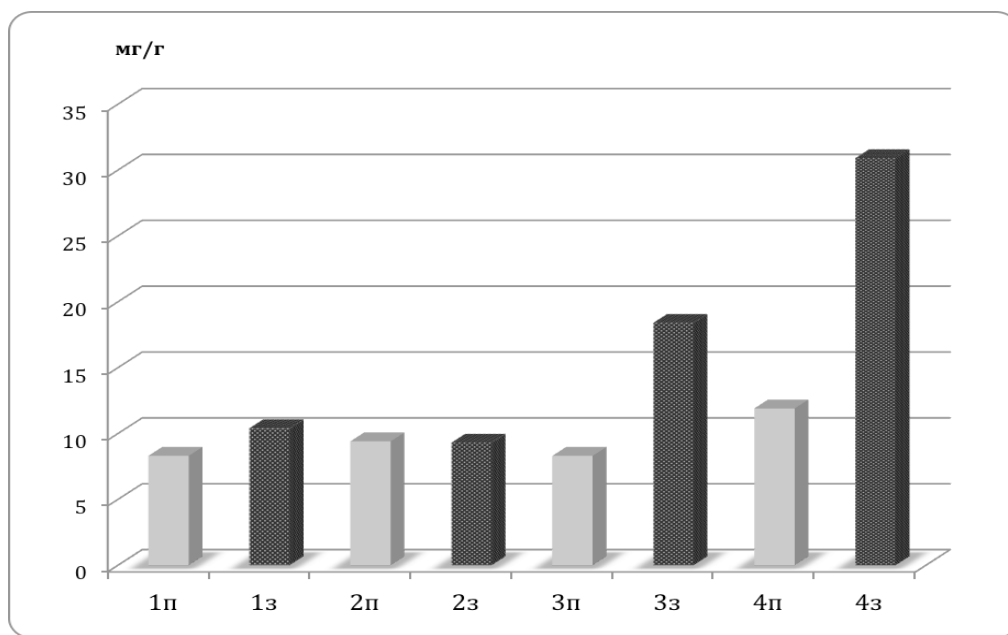
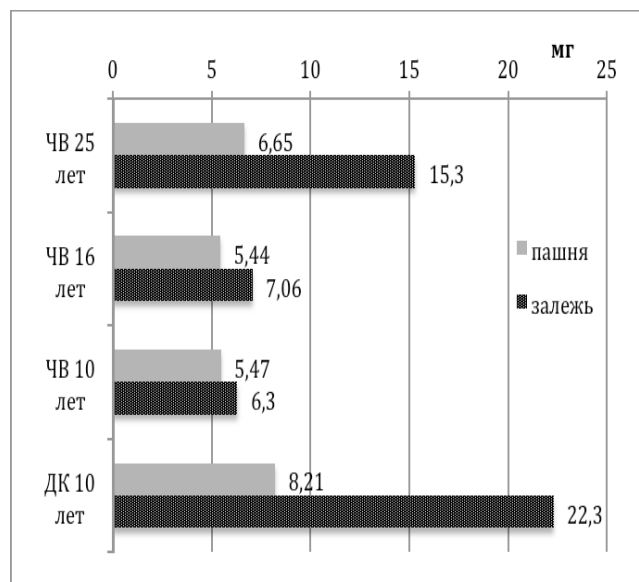
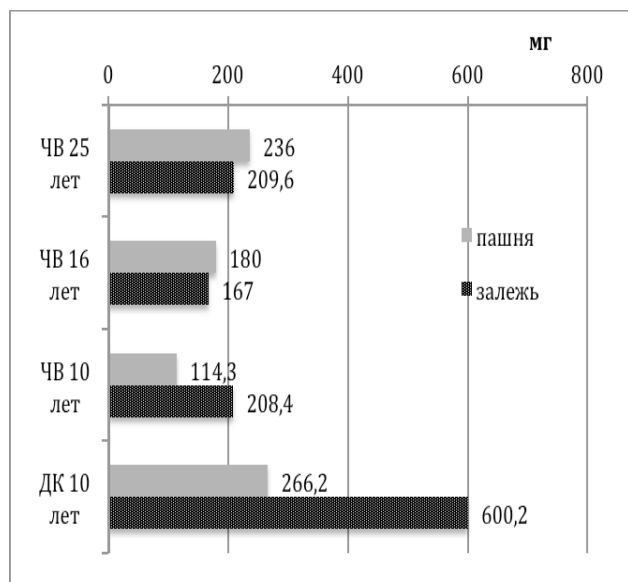


Рис. 4. Запасы общей микробной биомассы в 1 г почвы, взятой на разных глубинах профиля изученных почв. Обозначения см. рис. 2.

Общая биомасса микроорганизмов (рис. 5А) в залежи дерново-карбонатной почвы 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).



А

Б

Рис. 5. Запасы общей биомассы микроорганизмов по профилю всех изученных почв (А) и в двух верхних гумусированных горизонтах (Б) на пашне и в залежи. ЧВ – чернозем выщелоченный, ДК – дерново-карбонатная почва.

В отличие от биомассы по всему профилю почв (рис. 5А), микробная биомасса во всех вариантах залежи гумусированных горизонтов (рис. 5Б) была существенно выше биомассы этих горизонтов пашен. На основании этих данных была сделана попытка рассчитать скорость прироста микробной биомассы в залежах этих почв.

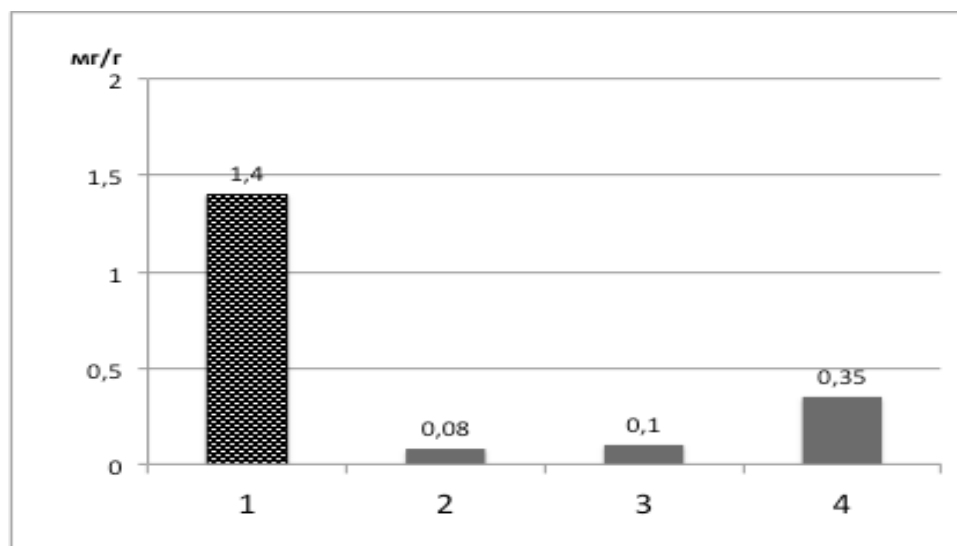


Рис. 6. Прирост микробной биомассы в год в гумусированных горизонтах залежей разных лет.

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.

На рис. 6 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 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.). 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.

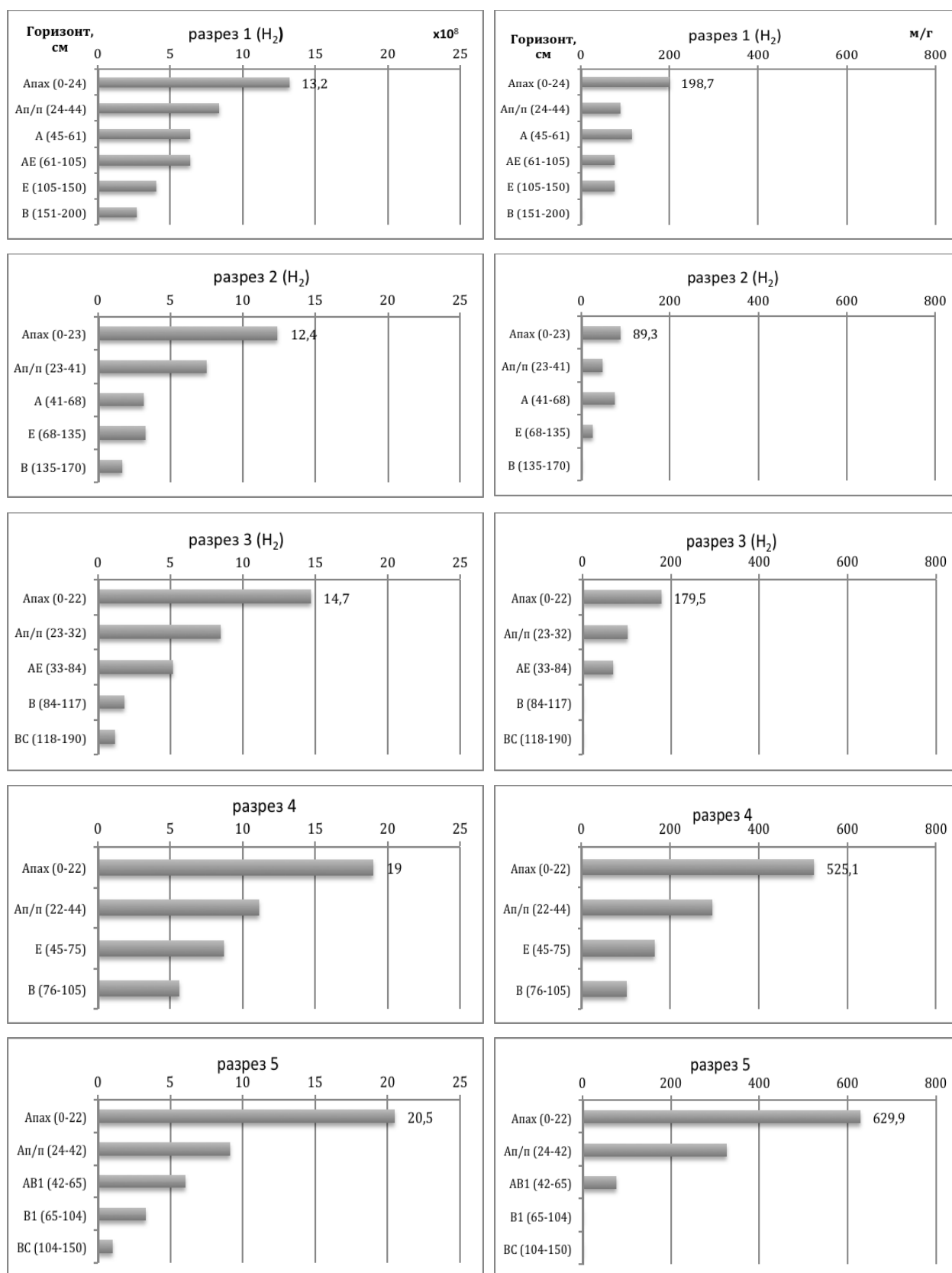
Особенности структуры микробной биомассы почв западин Липецкой и Волгоградской областей.

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.

Западина в Липецкой области (серая лесная почва)

Распределение численности бактерий по профилю (рис. 7А) 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 и не превышала количества клеток $12-13 \times 10^8$ в верхних 20-ти см. В нижних же она уменьшалась в 10 раз (на порядок). 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. 7Б, 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.



А

Б

Рис. 7. Распределение численности бактерий (А) и длины грибного мицелия (Б) в серой лесной почве по профилю разрезов, расположенных непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1-3) и на удалении (разрезы 4, 5).

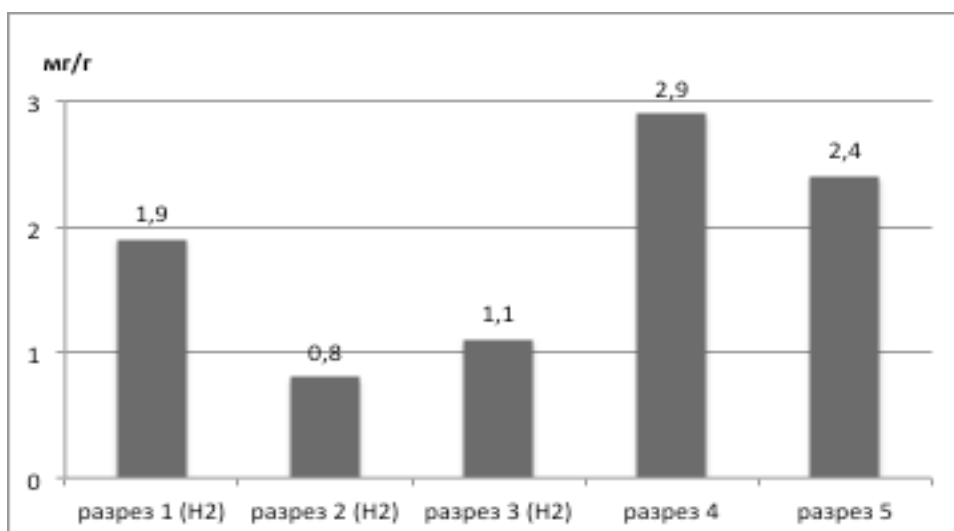


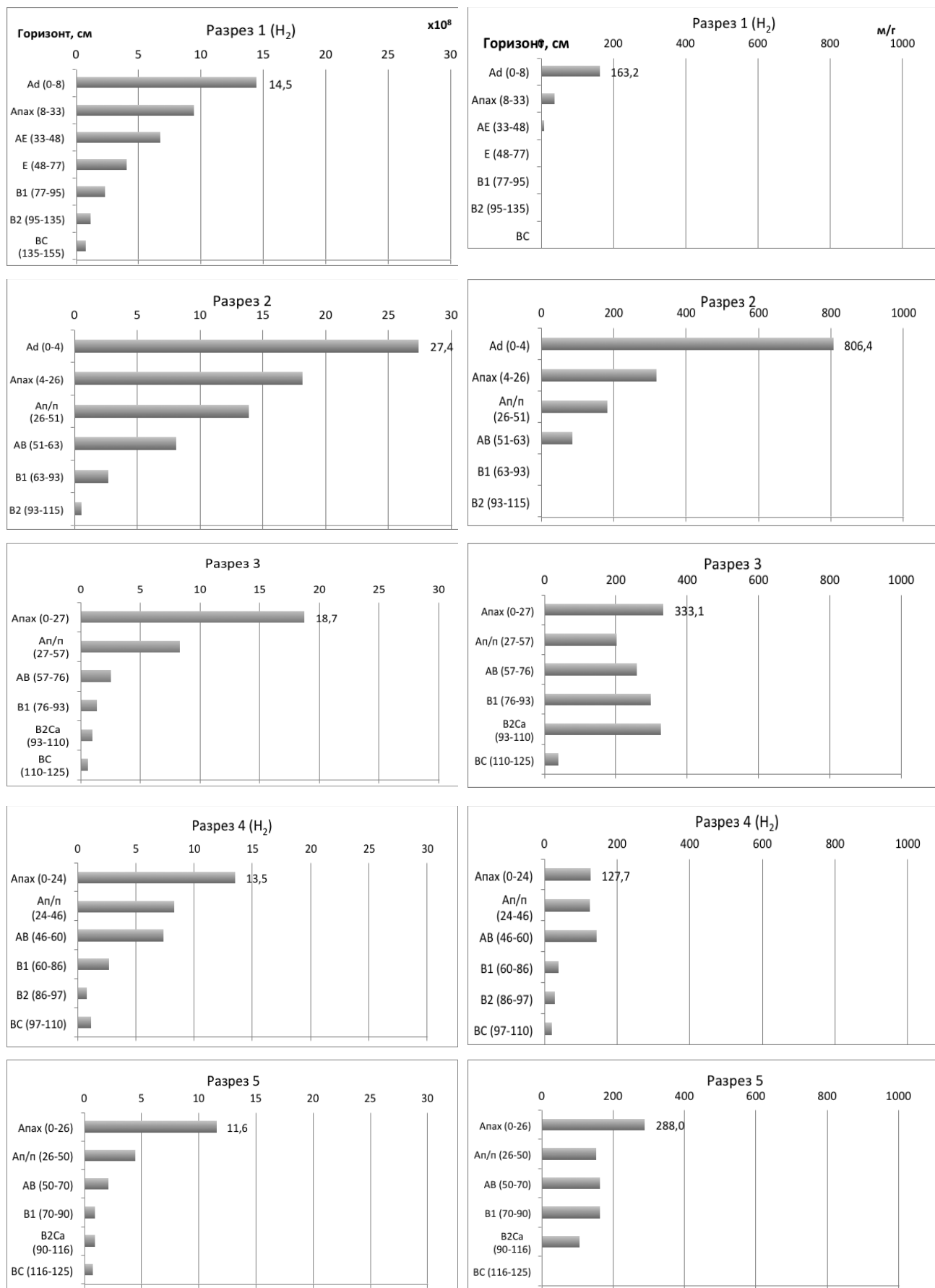
Рис. 8. Биомасса микроорганизмов в профиле разрезов серой лесной почвы.

Так как профиль всех изученных почв примерно одинаков, была сделана попытка сложить биомассу всех микроорганизмов в грамме почв всех слоев в профиле. На рис. 8 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.

Западина в Волгоградской области (чернозем обыкновенный и лугово-черноземная почва)

Для изучения численности и структуры биомассы микроорганизмов в сходных условиях были исследованы образцы почв черноземного ряда. На рис. 9А 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. 9Б) показало, что наименьшая длина наблюдалась в разрезах 1 и 4, на месте выхода водорода, составляя при этом 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 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.



А

Б

Рис. 9. Распределение численности бактерий (А) и длины мицелия грибов (Б) в почвах черноземного ряда по профилю разрезов, расположенных непосредственно на месте выхода водорода (разрезы 1, 4) и на удалении (разрезы 2, 3 и 5).

Общая биомасса микроорганизмов в разрезах, представленная на рис. 10, 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.

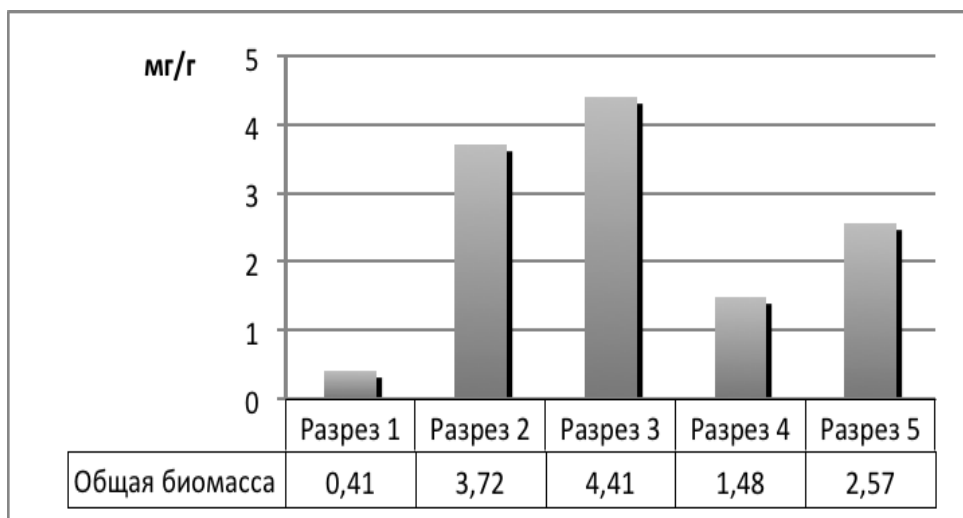


Рис. 10. Общая биомасса микроорганизмов по разрезам: разрезы 1 и 4, в которых шло выделение водорода, разрезы 2, 3, 5 – на удалении.

Распределение клеток бактерий по размерам в 4 и 5 разрезах, полученное с помощью метода «каскадной» фильтрации, показывает, что во всех случаях преобладали мелкие фракции бактерий (размеры клеток 0,38 мкм и 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 (13×10^8 клеток) – без водородной дегазации – в подпахотном горизонте превышала таковую в 4 разрезе (5×10^8 клеток) в 2,5 раза, а в горизонте ВС – в 1,5 раза.

Таким образом, было показано изменение численности и биомассы бактерий и грибного мицелия в серых лесных почвах (рис. 7А, Б) и в почвах черноземного ряда (рис. 9А, Б), вероятно, за счёт совместного влияния на них потоков эндогенного водорода и временного избыточного переувлажнения. Разделить влияние этих факторов в природных условиях 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 подпахотном горизонте, и была заметна разница в горизонте ВС. Во всех случаях доминировали бактерии диаметром 0,23 и 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).

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. 11). 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. 12), объясняется тем, что при подсчете по методу 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.

Небольшой средний объем клеток 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).

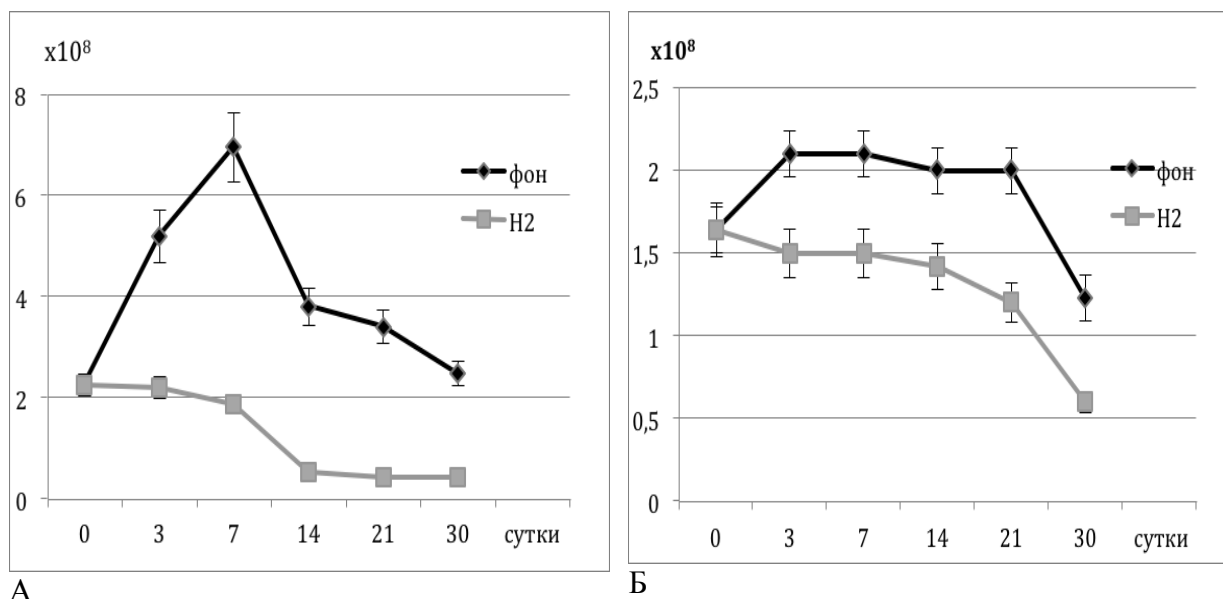


Рис. 11. Численность бактерий в фоновом образце и в образце, подвергнутом влиянию водорода, учтенная методом люминесцентной микроскопии (на стеклах) (А) и методом «каскадной» фильтрации (на фильтрах) (Б).

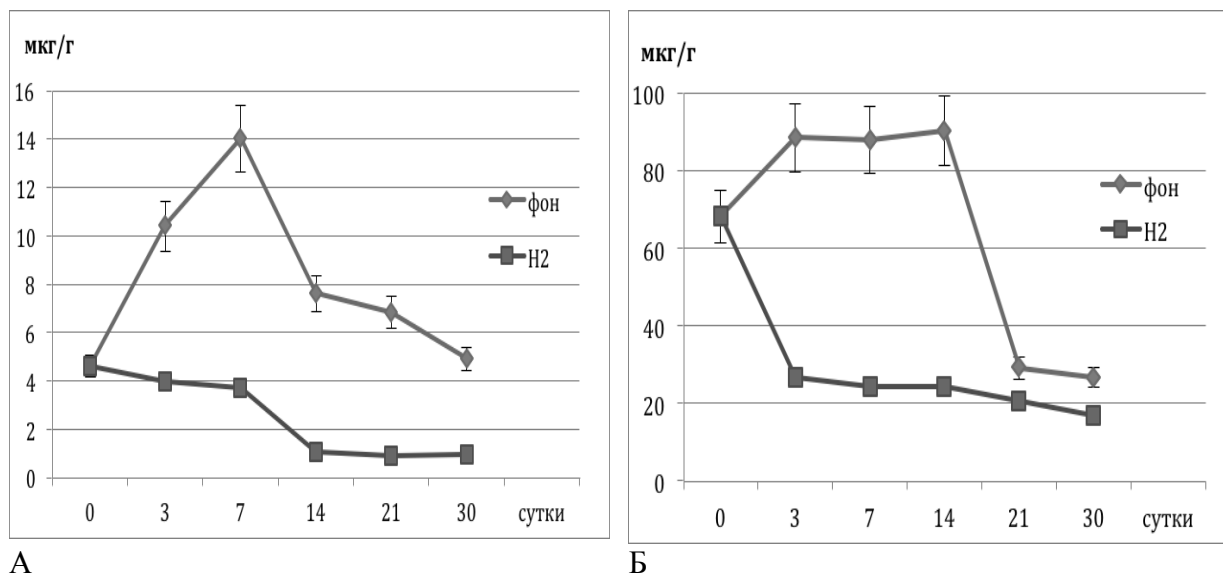


Рис. 12. Биомасса бактерий в фоновом образце и в образце, подвергнутом влиянию водорода, учтенная методом люминесцентной микроскопии (на стеклах) (А) и методом «каскадной» фильтрации (на фильтрах) (Б).

Из данных (рис. 13) 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 мг/г. Затем они резко снижаются, доходя в почве с содержанием водорода до 0 м/г и 0 мг/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.

Присутствие актиномицетного мицелия в рассматриваемых образцах незначительно и достигает лишь 50 м/г на 7-е сутки в фоновых почвах, и 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.

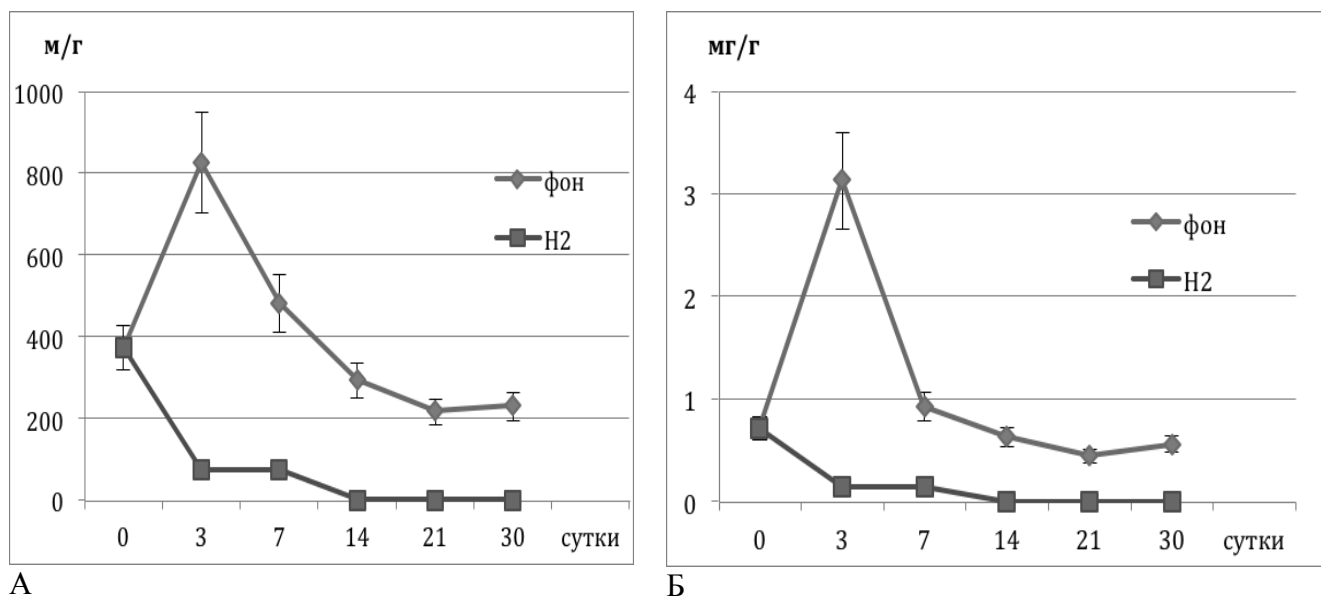


Рис. 13. Длина грибного мицелия (А) и его биомасса (Б) в фоновой почве и в почве, подвергнутой влиянию водорода.

Распределение клеток по размерам методом «каскадной» фильтрации 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.

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 актиномицетного мицелия по сравнению с фоновыми образцами. Исходя из полученных данных, можно утверждать, что именно водород влияет на микробное сообщество почв западин, хотя нельзя отрицать и негативную роль избыточного увлажнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что в почвах пашен (дерново-карбонатная и выщелоченный чернозем) доминировала биомасса грибного мицелия. В почвах залежи процент грибного мицелия был выше по сравнению с почвами пашни. В последних почвах был выше процент биомассы

спор грибов. Доля прокариот была невысока и не превышала нескольких процентов, причем в почвах залежи этот процент был несколько выше, чем в пашне. Более высокая скорость прироста микробной биомассы наблюдалась в дерново-карбонатной почве.

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.

III. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Полянская Л.М., Суханова Н.И., **Чакмазян К.В.**, Звягинцев Д.Г. **«Особенности изменения структуры микробной биомассы почв в условиях залежи» // Почвоведение, 2012. № 7. С. 792-798.**
2. Полянская Л.М., **Чакмазян К.В.** «Численность и структура микробной биомассы в почвах пашень и залежей». Мат.докладов VI съезда Общества почвоведов им.В.В.Докучаева. Всеросс. с международным участием научная конференция «Почвы России: современное состояние, перспективы изучения и использования». Петрозаводск, Карельский научный центр РАН, 2012. Кн.2. С. 245-425.
3. **Чакмазян К.В.** «Влияние выделения глубинного водорода на почву и микробное сообщество». Материалы Международной научной конференции XVI Докучаевские молодежные чтения «Законы почвоведения: новые вызовы». Санкт-Петербург, 2013. С. 97-98.
4. Полянская Л.М., **Чакмазян К.В.** «Микробная биомасса как показатель экологического состояния почв». Материалы XI Международной конференции «Государственное управление: РФ в современном мире», М., 2013 г. [Электронный ресурс]- 1 электрон. Опт.диск DVD-ROM) ISBN 978-5-9904587-2-7.
5. **Чакмазян К.В.** «Особенности структуры микробной биомассы почв кольцевых западин Липецкой и Волгоградской областей». 18-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушкино, 2014 г. С. 231.
6. Полянская Л.М., Суханова Н.И., **Чакмазян К.В.**, Звягинцев Д.Г. **«Особенности структуры микробной биомассы почв кольцевых западин Липецкой и Волгоградской областей» // Почвоведение, 2014. №9. С. 1089-1094.**
7. Полянская Л.М., **Чакмазян К.В.** «Структура микробного сообщества серых почв западин Липецкой области как показатель их экологического состояния». Материалы Международной научной конференции «Экология и биология почв», Южный Федеральный Университет. Ростов-на-Дону, 2014. С. 211-212.
8. **Чакмазян К.В.** «Изменение структуры микробной биомассы почв в условиях залежи за разный временной период». Материалы Международной научной конференции XVII Докучаевские молодежные чтения. Санкт-Петербург, 2015. С. 168-169.
9. Полянская Л.М., Степанов А.Л., **Чакмазян К.В.** **Влияние эмиссии водорода на структуру микробной биомассы почв // Почвоведение, 2017 (принята в печать).**