

УДК 631.433.3

ОБОРАЧИВАЕМОСТЬ “НОВОГО” И “СТАРОГО” УГЛЕРОДА В СОСТАВЕ БИОМАССЫ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2013 г. И. В. Евдокимов*,¹, А. А. Ларионова*, А. Ф. Стулин**

*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино, Московская обл.

**Воронежский филиал Всероссийского научно-исследовательского института кукурузы РАСХН, Воронежская обл.,
Хохольский р-н, пос. Опытной станции ВНИИК

Поступила в редакцию 06.11.2012 г.

Определяли вклад “нового” углерода, поступающего из растений с С4 типом фотосинтеза (кукурузы), и “старого” углерода из почвенного органического вещества (ПОВ), сформировавшегося под С3 растительностью, как источников углерода для микроорганизмов. Почвенные образцы были отобраны с площадок полевых экспериментов на агрочерноземе и агросерой почве. Величины $\delta^{13}\text{C}$ определяли в выделяющемся CO_2 , ПОВ, общей микробной биомассе ($\text{C}_{\text{мик}}$) и жирных кислотах фосфолипидов (ЖКФ), предполагая, что чем более обогащены ЖКФ-маркеры для определенных таксономических групп микроорганизмов углеродом С4, тем значительнее роль этих микроорганизмов в трансформации корневых выделений и растительных остатков. По обогащению “новым” С углеродные пулы располагались в следующем порядке: ПОВ < $\text{C}_{\text{мик}}$ < CO_2 . Следовательно, “новый” углерод оказался более предпочтительным субстратом для микробного роста, чем “старый”. Доля С4 в составе маркеров варьировала от 18 до 60% (среднее 38%) в агросерой почве и от 17 до 44% в агрочерноземе (среднее 28%). По степени обогащения “новым” углеродом группы микроорганизмов в агросерой почве выстроились в следующий ряд: простейшие < сапротрофные грибы < актиномицеты < грамположительные бактерии < грамотрицательные бактерии < микоризные грибы. В агрочерноземе вклад С4 в состав углерода ЖКФ значимо не отличался для разных групп организмов. Содержание С4 в составе ЖКФ-маркеров грамотрицательных бактерий и грибов не продемонстрировало решающего вклада данных групп организмов в трансформацию “нового” С. Вероятно, долговременный С3–С4 переход приводит к образованию широкого ряда углеродных пулов, близких по содержанию С4, но различающихся по устойчивости к минерализации; поэтому грамположительные бактерии получали возможность ассимилировать С4 из устойчивых пулов С. Низкое содержание нового “углерода” в ЖКФ-маркерах грибов может быть объяснено значительной долей покоящихся форм.

Ключевые слова: структура микробного сообщества, микробная биомасса, ^{13}C , С3–С4 переход, “старый” и “новый” углерод, почвенное дыхание.

DOI: 10.7868/S0026365613040034

Трансформация растительных остатков и корневых выделений являются важными компонентами цикла углерода в почве [1–3]. Данные об этих процессах учитываются при разработке мер по увеличению секвестрирования С в почве и, как следствие, смягчению изменений климата и сохранению природных ресурсов нашей планеты. Важнейшими аспектами разложения и трансформации органических веществ в почве являются: 1) структура и активность почвенного микробного сообщества, 2) устойчивость почвенного органического вещества (ПОВ) к разложению микроорганизмами. Структура и активность почвенного микробного сообщества имеют огромное значение, так как почвенные микроорганизмы

являются движущей силой процессов разложения и гумификации органических веществ в почве. Механизмы стабилизации ПОВ в почве довольно сложны и недостаточно изучены, но, в целом, их можно подразделить на группы, связанные с: 1) преимущественным сохранением устойчивых органических соединений в почве; 2) взаимодействием ПОВ с минералами и ионами металлов; 3) пространственной недоступностью ПОВ для микроорганизмов-деструкторов [1, 4]. Поэтому ощущается потребность в новых данных о соотношении углерода растительного происхождения и углерода из гумусовых веществ в составе биомассы микроорганизмов из различных таксономических групп. Это позволяет выяснить, какие микроорганизмы доминируют в процессе разложения почвенного органического вещества [5].

¹ Автор для корреспонденции (e-mail: ilyaevd@rambler.ru).

Наиболее распространенным методом для изучения трансформации углерода растительного происхождения и из ПОВ в почве является метод стабильных изотопов ^{13}C (^{13}C -SIP). Поступление ^{13}C в подземные органы растений и ризосферу можно определять путем мечения растений с CO_2 , обогащенным или обедненным по изотопу ^{13}C , либо используя феномен естественной дискриминации углерода по изотопу ^{13}C для растений с C3 ($\delta^{13}\text{C} \approx -27\text{‰}$) и C4 типом фотосинтеза ($\delta^{13}\text{C} \approx -13\text{‰}$). Иначе говоря, C4 растения естественно обогащены изотопом ^{13}C по сравнению с C3 растениями. Выращивание C4 растений на почвах, сформированных под C3 растениями (C3–C4 переход) или наоборот, C3 растений на C4 почве (C4–C3 переход), приводит к сдвигу между величинами $\delta^{13}\text{C}$ в биомассе растений и растительных остатках и в ПОВ. Таким образом, появляется возможность дифференцировать “новый” углерод растительных остатков и ризодепозитов и “старый” углерод гумуса по величинам обогащения углеродных пулов изотопом ^{13}C [6]. Поступление нового и старого C в биомассу микроорганизмов, то есть предпочтительное использование C3 или C4 в качестве углеродных субстратов, может быть оценено по величине $\delta^{13}\text{C}$ для микробной биомассы в почве и ризосфере. Кроме того, величины изотопного обогащения по ^{13}C в составе углекислого газа, выделяющегося из почвы и ризосферы, дают возможность рассчитать доли минерализованного C, поступившего из пулов C3 и C4. Выращивание C4 растений на C3 почве можно заменить внесением растительного материала C4 растений в C3 почву с последующей длительной инкубацией в полевых или лабораторных условиях.

За последние два десятилетия почвенные микробиологи разработали модификации метода определения жирных кислот фосфолипидов (ЖКФ), которые могут быть использованы для оценки структуры почвенного микробного сообщества. ЖКФ представляют собой важнейший компонент мембран у живых клеток, они не включаются в состав запасных веществ и быстро разлагаются в мертвых клетках [7, 8]. Поэтому ЖКФ служат хорошими маркерами биомассы живых микроорганизмов [9]. Так как различия в химической структуре ЖКФ (длина цепочки, местоположение замещающего радикала, ветвление, образование циклических структур, местоположение двойных связей) служат индикатором принадлежности к той или иной таксономической группе, индивидуальные ЖКФ могут быть использованы в качестве биомаркеров для почвенных микроорганизмов [4]. Специфические ЖКФ маркеры существуют для метанотрофных архей, грамположительных и грамотрицательных бактерий, микоризных и сапротрофных грибов,

прочих эукариот, включая и растения. Для актиномицетов, являющихся представителями грамположительных бактерий, используются специфические ЖКФ-маркеры, содержащие замещающий метиловый радикал в позиции 10.

Грамотрицательные бактерии известны своей доминирующей ролью среди микроорганизмов ризосферы, в то время как грамположительные характеризуются более равномерным распределением по всему гумусовому горизонту [10]. Хотя по индивидуальным ЖКФ маркерам можно определить структуру почвенного микробного сообщества только на уровне родов или физиологических групп микроорганизмов, комбинация с методами ^{13}C -SIP потенциально позволяет определить, какие составляющие почвенного микробного сообщества вовлечены в разложение и гумификацию свежеступившего органического вещества из корневых выделений и растительных остатков. Однако ряд методологических сложностей, таких как естественное варьирование ^{13}C в составе маркеров таксономических групп, неоднозначность подразделения почвенной микробиоты на ризосферных и неризосферных микроорганизмов, сложный характер рециклирования нового и старого C в почве и т.д., препятствует однозначному определению роли тех или иных микроорганизмов в трансформации углерода в почве по величине обогащения ^{13}C [4, 5].

Целью нашего исследования было определить вклад нового C4 и старого C3 углерода как источника для микробного роста. Нашей рабочей гипотезой было предположение о том, что вне зависимости от того, какой способ C3–C4 перехода используется, выращивание C4 растений на C3 почве, или же запахивание растительного C4 материала в C3 почву, а также от типа почвы, изменения в структуре почвенного микробного сообщества и поступление в биомассу тех или иных таксономических групп микроорганизмов нового углерода будут происходить примерно в одном и том же направлении. Кроме того, учитывая противоречивость имеющихся литературных данных, мы решили выяснить, можно ли по содержанию C4 углерода оценить доминирующую роль грамотрицательных бактерий и сапротрофных грибов в разложении растительных остатков и корневых выделений в исследуемых нами почвах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Почва. Почву отбирали с экспериментальных площадок, на которых проводились полевые опыты с C3–C4 переходом. Эксперимент 1 проводили на полевых площадках ВНИИ кукурузы РАСХН (Воронежская область) на агрочерноземе (C 3.6%, N 0.3%, pH 6.8). Кукурузу в полевом опыте выращивали бессменно, начиная с 1966 г. Для каждой из трех делянок площадью 193 м² готови-

ли смешанный образец, из которого потом отбирали индивидуальную повторность для лабораторных экспериментов. Контрольную почву (С3 почву) отбирали с четырех площадок такого же размера, на которых с 1966 г. поддерживается черный пар. Контрольные площадки не удобряли. Доза удобрений на площадках с С3–С4 переходом составляла 120, 90 и 90 кг га⁻¹ для N, P и K соответственно. Среднегодовое поступление углерода с пожнивными остатками кукурузы составляло 152 г С м⁻².

Эксперимент 2 проводили с агросерой почвой на микрополевых площадках (1 м², 3 повторности), заложенных на полях многолетнего полевого эксперимента Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (С 1.4%, N 0.1%, pH 6.0). В течение 5 лет на площадках вносили растительный материал кукурузы – каждую весну, в количестве 1.16 кг С м⁻², что эквивалентно среднегодовому поступлению С в луговых экосистемах на этом типе почвы. Площадки микрополевого опыта в течение года подвергали 5–6 кратному вспахиванию с целью борьбы с сорняками. Контрольные площадки без внесения растительной массы кукурузы обрабатывали по такой же схеме. И контроли, и площадки с С3–С4 переходом получали ежегодную дозу удобрений – 60 кг га⁻¹ для N, P и K. Перед началом микрополевого эксперимента почву использовали в зерно-травяном севообороте.

В июле 2008 г. на полях обоих экспериментов были отобраны почвенные образцы с глубины 0–20 см. Для каждой делянки был приготовлен смешанный образец из 5 индивидуальных образцов по 200 г каждый. Затем из смешанных образцов делянок был приготовлен один репрезентативный почвенный образец агрочернозема (Эксперимент 1, варианты “Ч-Контроль” и “Ч-С3–С4”) и один репрезентативный образец агросеры почвы (Эксперимент 2, варианты “АС-Контроль” и “АС-С3–С4”). В почвенных образцах, отобранных с делянок обоих полевых экспериментов, определяли содержание общего органического С и изотопное соотношение ¹³С : ¹²С. Кроме того, изотопное соотношение определяли и в образцах растительной массы кукурузы, отобранной в Экспериментах 1 и 2. Свежеотобранную почву просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм, затем небольшие камешки и видимые фрагменты корней удаляли вручную при помощи пинцета. Почву высушили при 20°C и хранили при комнатной температуре вплоть до начала инкубационного эксперимента в апреле 2009 г.

Схема лабораторного эксперимента. В начале эксперимента почва была увлажнена деионизированной H₂O до 70% от полной полевой влагоемкости (ППВ) с целью активирования деятельности микроорганизмов и разделена на 2 серии. В первой серии навески по 20 г сухой почвы помещали в 100 мл стеклянные флаконы и увлажняли. Затем

флаконы плотно закрывали резиновыми пробками, чтобы изолировать пространство внутри флаконов от атмосферы. Периодически производили шприцем отбор газовых проб для определения концентрации CO₂ и изотопного соотношения, а также вентиляцию флаконов с таким расчетом, чтобы концентрация углекислого газа внутри флаконов не превышала 2%, для поддержания аэробных условий. Во второй серии сухие почвенные образцы массой 100 г помещали в 500 мл стеклянные флаконы, увлажняли до 70% ППВ и инкубировали по той же схеме, что и образцы серии 1. После 10 сут инкубации почва из серии 1 была проанализирована на содержание растворимого органического вещества (РОВ) и микробного углерода (С_{мик}). Почва из серии 2 была заморожена при –22°C и хранилась вплоть до анализа на ЖКФ и изотопное соотношение в ЖКФ. Кроме того, определяли содержание общего С и величины δ¹³С в РОВ и растительном материале кукурузы.

Определение профилей жирных кислот фосфолипидов (ЖКФ). Анализы ЖКФ проводили в соответствии с методиками, описанными Целлесом и Баи [11] и Гаттингером [8]. Липиды извлекали из свежей почвы (25 г сух. массы) при помощи метанола, хлороформа и фосфатного буфера. Липиды из этого экстракта разделяли на нейтральные, гликолипиды и фосфолипиды (полярные липиды) на кремниевой фазовой колонке (SPE-SI; Bond Elut, “Varian”, Palo Alto, США) элюированием с хлороформом, ацетоном и метанолом соответственно. В результате процедур экстракции, разделения, гидролиза и дериватизации смесь разделяли на метиловые эфиры насыщенных (saturated, SATFA), мононенасыщенных (monounsaturated, MUFA) и полиненасыщенных (polyunsaturated, PUFA) липидов. Полученные метиловые эфиры ЖКФ (fatty acid methylesters, FAMES) разделяли и идентифицировали методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ–МС) (5973MSD GC/MS Agilent Technologies, Palo Alto, США) с использованием полярных колонок (BPX-70, SGE GmbH, “Griesheim”, Германия), 60 м × 0.25 мм × 0.25 мкм, покрытых 70% цианопропил-полисилфенилен-силоксаном [12]. Идентификацию метиловых эфиров ЖКФ проводили на основе сравнения времени удерживания и масс-спектров для стандартных веществ, клеток чистых культур микроорганизмов и природных образцов [7, 8]. Количественную оценку содержания ЖКФ проводили с помощью пакетов программ для хроматографии HP ChemStation (“SOVLVIT”, Швейцария), сравнивая экспериментально полученные хроматограммы со стандартными хроматограммами для индивидуальных ЖКФ. Бактерии были идентифицированы по следующим ЖКФ: насыщенным – i15:0, a15:0, n15:0, i16:0, i17:0, a17:0, n17:0, cy17:0, cy19:0 – и мононенасыщенным –

16:1 ω 7, 16:1 ω 9 и 18:1 ω 7. В вышеперечисленном наборе ЖКФ жирные кислоты су17:0 и су19:0 служили специфическими маркерами для грамотрицательных бактерий, а кислоты i15:0, a15:0, i17:0 и a17:0 – для грамположительных [7, 13]. Специфическими маркерами для других групп были 18:2 ω 6,9 и 18:1 ω 9 – для грибов [14, 15]; 20:2 ω 6,9с, 20:3 ω 6,9,12с и 20:4 ω 6,9,12,15с – для микроэукариот [5]; 10-метилированные насыщенные ЖКФ – для актиномицетов [7].

Величины $\delta^{13}\text{C}$ для индивидуальных ЖКФ определяли комбинированием методов ГХ–МС и изотопной масс-спектрометрии при сжигании ЖКФ на установке GC Combustion III (“Thermo Electron Cooperation”, Bremen, Германия) и определении в них изотопного соотношения на масс-спектрометре (IRMS, Delta Advantage, “Thermo”, Bremen, Германия). Реальные величины $\delta^{13}\text{C}$ рассчитывали на основе экспериментально полученных данных, делая поправку на дополнительный атом С, присоединенный в процессе дериватизации [16]. Изотопный сигнал выражали в единицах промилле $\delta^{13}\text{C}$ относительно такового в международном стандарте Vienna-Pee Dee Belemnite (V-PDB):

$$\delta^{13}\text{C} [\text{‰ VPDB}] = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{V-PDB}}) - 1] \times 1000, \quad (1)$$

где R_{sample} и R_{VPDB} – соотношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в образце и стандарте V-PDB, соответственно ($R_{\text{V-PDB}} = 0.0111802$ [17]).

Определение углерода почвенной микробной биомассы. Углерод почвенной микробной биомассы определяли методом фумигации-экстракции (ФЭ) [18]. Принцип метода ФЭ основан на экстрагировании раствором 0.5 М K_2SO_4 биомассы почвенных микроорганизмов, убитых в течение 24-ч экспозиции образцов почвы в атмосфере, содержащей пары хлороформа. Экстракцию проводили при соотношении почвы к солевому раствору 1 : 4, экстракты фильтровали через плотный бумажный фильтр, замораживали при -20°C и хранили при этой температуре вплоть до анализа на содержание общего растворимого углерода на анализаторе TOC5050 (“Shimadzu”). Навески влажной почвы соответствовали сухой массе 10 г.

Размер пула микробного углерода рассчитывали по величине “прироста С” (“С flush”), то есть по разности между содержанием С в солевых экстрактах из почвы после фумигации и из почвы, не подвергавшейся фумигации (контрольной почвы), с учетом величины пересчетного коэффициента $k_{\text{EC}} = 0.45$ (коэффициента экстракции убитой биомассы микроорганизмов):

$$C_{\text{мик}} - \text{ФЭ} = \text{С flush}/k_{\text{EC}}. \quad (2)$$

Содержание растворимого органического вещества (РОВ) в экстрактах K_2SO_4 определяли на анализаторе общего органического углерода

(TOC5050, “Shimadzu”). Определение величины $\delta^{13}\text{C}$ в солевых экстрактах проводили методом жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии стабильных изотопов (LC-IRMS, “Thermo Electron”, Bremen, Германия) в соответствии с описанием, данным в работах [19] и [20]. Величину $\delta^{13}\text{C}$ в микробном углероде ($\delta^{13}\text{C}_{\text{mic}}$) рассчитывали по следующей формуле [21]:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{mic}} = \frac{\delta^{13}\text{C}_f C_f - \delta^{13}\text{C}_e C_e}{C_f - C_e}, \quad (3)$$

где $\delta^{13}\text{C}_f$ и $\delta^{13}\text{C}_e$ – значения $\delta^{13}\text{C}$ для экстрактов из почвы, подвергшейся фумигации, и свежей контрольной почвы; C_f и C_e – содержание общего С в экстрактах из почвы, подвергшейся фумигации, и свежей контрольной почвы.

Анализ С и изотопного соотношения в CO_2 , почве и растительном материале. Определения концентрации CO_2 и значений $\delta^{13}\text{C}$ в нем проводили методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии стабильных изотопов (Delta plus, “Finnigan MAT”, Germany). Образцы почвы и растительной массы кукурузы высушивали при 65°C , размельчали в автоматическом гомогенизаторе тканей (Retsch MM2, “Retsch GmbH”, Naan, Германия), а затем брали из них навески в цинковые капсулы. Содержание С и величины $\delta^{13}\text{C}$ определяли на элементном анализаторе, комбинированном с изотопным масс-спектрометром (EA-IRMS; “Eurovector”, Milan, Италия, сопряженным с MAT 253, “Thermo Finnigan”, Bremen, Германия). Величину фракции нового (С4) углерода в составе С пулов и CO_2 (% от общего С) рассчитывали по следующей формуле [5]:

$$F_C = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{C4}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{C3}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{maize}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{SOM}}}, \quad (4)$$

где $\delta^{13}\text{C}_{\text{C4}}$ и $\delta^{13}\text{C}_{\text{C3}}$ – значения $\delta^{13}\text{C}$ для пулов углерода или для CO_2 , выделившегося из почвы с С3–С4 переходом и контрольной почвы, соответственно; $\delta^{13}\text{C}_{\text{maize}}$ и $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOM}}$ – значения $\delta^{13}\text{C}$ для биомассы С4 растений (кукурузы) и ПОВ в контрольной почве. Общее содержание С и соотношение $^{13}\text{C} : ^{12}\text{C}$ в составе CO_2 определяли раз в 1–3 сут в зависимости от интенсивности эмиссии углекислого газа. Анализ $C_{\text{мик}}$ и ЖКФ проводили по окончании инкубации.

Статистический анализ. Содержание С, а также изотопное соотношение в ПОВ, биомассе кукурузы, РОВ, $C_{\text{мик}}$ и выделившемся CO_2 определяли в 5 повторностях, а в ЖКФ – в 4 повторностях. Были проведены непарные t -тесты с целью выявления существенных различий для величин $\delta^{13}\text{C}$ в почвенных пулах С и индивидуальных ЖКФ, а

Таблица 1. Значения $\delta^{13}\text{C}$ для растительного материала, ПОВ, микробной биомассы и CO_2 , выделившегося из контрольных почв и почв в условиях С3–С4 перехода, осуществленного следующими способами: 1) выращивание растений кукурузы на С3 почве (агрочернозем, Эксперимент 1); 2) внесение растительного С4 материала (биомассы кукурузы) в С3 почву (агросерая почва, Эксперимент 2)

Тип почвы	Агрочернозем		Агросерая почва		
	Значение	Стандартное отклонение	Значение	Стандартное отклонение	Значимость
$\delta^{13}\text{C}$ кукурузы (‰)	-11.6	(0.2)	-12.0	(0.1)	**
ПОВ в контрольной почве (%)	3.2	(0.1)	1.4	(0.1)	***
ПОВ в почве после С3–С4 перехода (%)	3.4	(0.2)	1.8	(0.1)	***
$\delta^{13}\text{C}$ в ПОВ контрольной почвы (‰)	-25.3	(0.2)	-25.8	(0.2)	**
$\delta^{13}\text{C}$ в ПОВ почвы после С3–С4 перехода (‰)	-24.5	(0.1)	-21.8	(0.2)	***
Новый С4 в ПОВ почвы после С3–С4 перехода (%)	6.4	(0.2)	27.2	(0.2)	***
$\delta^{13}\text{C}$ $S_{\text{мик}}$ в контрольной почве (‰)	-22.9	(0.8)	-27.1	(0.3)	***
$\delta^{13}\text{C}$ $S_{\text{мик}}$ в почве после С3–С4 перехода (‰)	-19.5	(1.1)	-21.6	(0.3)	***
Новый С4 в $S_{\text{мик}}$ почвы в условиях С3–С4 перехода (%)	24.1	(2.5)	39.7	(2.3)	***
$\delta^{13}\text{C}$ в CO_2 , выделившемся из контрольной почвы (‰)	-23.5	(1.1)	-25.9	(1.1)	**
$\delta^{13}\text{C}$ в CO_2 , выделившемся из почвы в условиях С3–С4 перехода (‰)	-20.0	(2.2)	-19.7	(1.1)	Н.д.
Новый С4 составе CO_2 (почва в условиях С3–С4 перехода) (%)	25.6	(2.4)	45.2	(1.3)	***

Значками ** и *** обозначена достоверность различий между агрочерноземом и агросерой почвой при $p < 0.05$ и $p < 0.01$, соответственно (определялась методом непарного t -теста, $n = 5$). Н.д. означает статистически незначимые различия. В круглых скобках указаны величины стандартного отклонения.

также для доли вклада (%) нового (С4) углерода в составе ЖКФ и пулов почвенного С.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Значения $\delta^{13}\text{C}$ и содержание нового (С4) углерода в составе почвенного органического вещества, $S_{\text{мик}}$ и CO_2 . Содержание ПОВ в агрочерноземе было примерно в 2 раза выше, чем в агросерой лесной почве, как в контролях, так и в почве со сменной С3–С4 растительности (табл. 1). При этом контрольные варианты для обеих почв показали примерно одинаковые величины $\delta^{13}\text{C}$. Агросерая лесная почва с С3–С4 переходом была более обогащена изотопом ^{13}C , чем соответствующий вариант агрочернозема. Соответственно, в агросерой почве было выявлено более высокое содержание (27.2%) молодого углерода в ПОВ по сравнению с агрочерноземом (6.4%). Значения $\delta^{13}\text{C}$ для $S_{\text{мик}}$ в контрольных почвах сильно различались для агросерой почвы (-22.9‰) и агрочернозема (-27.1‰), в то время как разница для почвы, подвергшейся С3–С4 переходу, была незначительной: -19.5 и -21.6‰ соответственно. В микробной биомассе агрочернозема было выявлено лишь незначительное превышение величин $\delta^{13}\text{C}$ варианте с С3–С4 переходом по сравнению с контрольной почвой (около 2‰). В агросерой почве эффект от С3–С4 перехода был более четко выраженным – около 6‰ (табл. 1). В то время как величина $\delta^{13}\text{C}$ в составе CO_2 , выделявшегося из контрольной почвы, была выше для агрочернозема, $\delta^{13}\text{C}$ для CO_2 из почвы,

подвергшейся С3–С4 переходу, составляли примерно -20‰ $\delta^{13}\text{C}$ вне зависимости от почвенного типа. Процент нового (С4) углерода в составе всех углеродных пулов был достоверно выше (при $p < 0.05$) для агросерой почвы. В обоих полевых экспериментах доля С4 в составе углеродных пулов возрастала в ряду: ПОВ < $S_{\text{мик}}$ < CO_2 .

В агросерой почве, находившейся в условиях С3–С4 перехода, были обнаружены большие величины микробной биомассы в конце инкубации и суммарной эмиссии CO_2 по сравнению с контрольным вариантом (рис. 1). Агрочернозем показал другую тенденцию: при более высокой величине микробной биомассы в варианте “Ч-С3–С4” общая эмиссия углекислого газа уступала таковой в контроле (рис. 1). Наиболее вероятной причиной была большая устойчивость ПОВ агрочернозема к разложению микроорганизмами. Кроме того, относительно низкая интенсивность почвенного дыхания в варианте “Ч-С3–С4” могла быть связана с тем, что в течение четырех десятилетий делянки под кукурузой получали более высокие дозы минеральных удобрений, чем делянки под черным паром. Это могло привести к значительному увеличению стехиометрического коэффициента роста (Y) у микробного сообщества в почве, подвергшейся С3–С4 переходу [22]. Несмотря на это обстоятельство, для обеих почвенных типов была выявлена следующая принципиальная особенность: величины С3 в составе CO_2 -С и $S_{\text{мик}}$ в контроле, который по определению содержит только С3 углерод, были выше соответствующих величин С3 в составе пулов углерода в почве, находившейся в

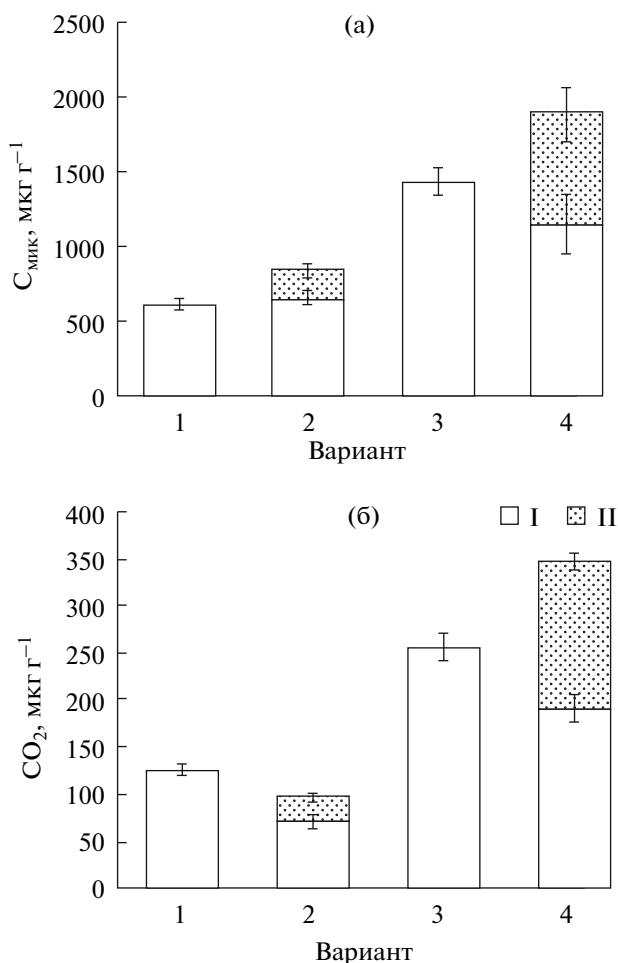


Рис. 1. Старый С3 (I) и новый С4 (II) углерод в составе биомассы почвенных микроорганизмов (а) и CO_2 , выделившегося из почвы в течение 10 сут инкубации (б) из агрочернозема: 1 – контрольная почва; 2 – почва в условиях С3–С4 перехода, и агросерой почвы: 3 – контрольная почва; 4 – почва в условиях С3–С4 перехода, $\mu\text{кг С г}^{-1}$ почвы. Отрезками обозначены величины стандартного отклонения ($\pm\text{SD}$).

условиях С3–С4 перехода. Таким образом, было показано, что С4 является более предпочтительным субстратом для микробного роста, и поэтому новый углерод заменил значительную часть старого в составе микробной биомассы и в составе пулов С, потребляемых почвенными микроорганизмами. В результате, газообразные потери старого углерода из почвенного гумуса в вариантах “С3–С4” были ниже, чем в контролях, то есть мы обнаружили отрицательный затравочный эффект органических соединений растительного происхождения в отношении почвенного гумуса. Отрицательный прайминг-эффект, вероятно, объясняется тем обстоятельством, что С4 углерод представлен более легко разлагаемыми органическими веществами, чем старый С3 в ПОВ: даже спустя годы и десятилетия С3–С4 перехода мы не наблюдаем равномерного

мечения всех пулов почвенного органического вещества новым углеродом.

Несмотря на то, что почвы в полевых Экспериментах 1 и 2 различались по типу, содержанию ПОВ, длительности и количеству ежегодно поступающего в почву углерода растительного происхождения, для обеих почв были выявлены сходные тенденции: в вариантах “С3–С4” углерод микробной биомассы, а также углерод в составе CO_2 был обогащен С4 по сравнению с ПОВ.

Значения $\delta^{13}\text{C}$ и содержание нового (С4) углерода в составе жирных кислот фосфолипидов. Величины $\delta^{13}\text{C}$ в индивидуальных ЖКФ, выделенных из контрольных почв, варьировали в пределах -33.4‰ – -20.1‰ . Для почв, подвергшихся С3–С4 переходу, соответствующий интервал величин составил -28.0‰ – -14.9‰ (табл. 3). Такая высокая вариабельность в обогащении ^{13}C хорошо согласуется с литературными данными. Так, в экспериментах Крамера и Гляйкснера [5] вариабельность величин $\delta^{13}\text{C}$ для индивидуальных ЖКФ составляла -19.9‰ – -38.5‰ в контроле и -8.3‰ – -25.7‰ в почве с С4 переходом. Флесса и соавт. [4] также обнаружили высокую вариабельность величин $\delta^{13}\text{C}$ для ЖКФ, выделенных из почвы под кукурузой, от -11.0 до -27.7‰ .

Все ЖКФ, выделенные в вариантах “С3–С4”, показали более высокую концентрацию ^{13}C по сравнению с контролями, то есть были обогащены новым (С4) углеродом. Самое высокое содержание определяемых ЖКФ было выявлено в варианте “Ч–С3–С4” (табл. 2). Максимальная концентрация для индивидуальных MUFA была выявлена для 18:1 ω 7 и 18:1 ω 9. Наиболее обогащенными изотопом ^{13}C среди мононенасыщенных ЖКФ были 16:1 ω 5 и 18:1 ω 9. Максимальные сдвиги в величинах $\delta^{13}\text{C}$ в ЖКФ в условиях С3–С4 перехода по сравнению с соответствующими ЖКФ в контрольной почве были выявлены для 16:1 ω 5 и 17:1 ω 8 в варианте “АС С3–С4” (7.6 и 8.3 ‰ соответственно – табл. 3).

Помимо мононенасыщенных ЖКФ, вариант “Ч–С3–С4” показал максимальные концентрации и для насыщенных ЖКФ. Из них самые высокие концентрации были определены для Су19:0, i15:0 и a16:0. В агросерой почве наибольшие концентрации были выявлены для Су19:0, a15:0 и a16:0 (0.49, 0.89 и 1.51 нмоль г^{-1} соответственно). Максимальные изменения в величинах $\delta^{13}\text{C}$ при С3–С4 переходе были обнаружены для следующих ЖКФ: 11,17:0 (7.7 ‰), i17:0 (6.6 ‰) и Су19:0 (6.0 ‰) в агросерой почве; i17:0 (6.7 ‰) и a17:0 (6.0 ‰) в агрочерноземе (табл. 3).

Единственный представитель группы полиненасыщенных ЖКФ, выявленный в наших почвенных образцах 18:2 ω 6,9 – маркер для сапротрофных грибов – был обнаружен только в агро-

Таблица 2. Содержание индивидуальных ЖКФ, выделенных из контрольных почв и почв в условиях С3–С4 перехода, осуществленного следующими способами: 1) выращивание растений кукурузы на С3 почве (агрочернозем, Эксперимент 1); 2) внесение растительного С4 материала (биомассы кукурузы) в С3 почву (агросерая почва, Эксперимент 2)

Группа организмов	Название ЖКФ	Агрочернозем				Агросерая почва			
		контрольная почва ЖКФ, нмоль г ⁻¹		почва в условиях С3–С4 перехода ЖКФ, нмоль г ⁻¹		контрольная почва ЖКФ, нмоль г ⁻¹		почва в условиях С3–С4 перехода ЖКФ, нмоль г ⁻¹	
		0.03 (0.02)	0.06 (0.02)	Н.д. (0.02)	0.04 (0.01)	0.03 (0.02)	0.05 (0.01)	Н.д. (0.02)	0.06 (0.01)
Грамположительные бакт.	br14:0	0.19 (0.08)	0.25 (0.03)	Н.о. (0.03)	0.13 (0.04)	0.14 (0.02)	Н.д. (0.02)	0.14 (0.02)	Н.д. (0.02)
Бактерии	n14:0	0.70 (0.03)	1.28 (0.10)	*** (0.10)	0.48 (0.10)	0.52 (0.04)	Н.д. (0.04)	0.52 (0.04)	Н.д. (0.04)
Грамположительные бакт.	il5:0	0.58 (0.07)	0.86 (0.08)	** (0.08)	0.60 (0.14)	0.98 (0.04)	** (0.04)	0.98 (0.04)	** (0.04)
Грамположительные бакт.	a15:0	0.12 (0.02)	0.23 (0.04)	** (0.04)	0.07 (0.01)	0.11 (0.01)	** (0.01)	0.11 (0.01)	** (0.01)
Бактерии	n15:0	0.27 (0.01)	0.49 (0.06)	*** (0.06)	0.19 (0.03)	0.23 (0.04)	Н.д. (0.04)	0.23 (0.04)	Н.д. (0.04)
Грамположительные бакт.	il6:0	1.60 (0.17)	2.35 (0.10)	*** (0.10)	1.65 (0.14)	1.51 (0.14)	Н.д. (0.14)	1.51 (0.14)	Н.д. (0.14)
Грамположительные бакт.	a16:0	0.68 (0.11)	1.13 (0.18)	** (0.18)	0.27 (0.06)	0.34 (0.07)	Н.д. (0.07)	0.34 (0.07)	Н.д. (0.07)
Актиномицеты	10Me17:0	0.29 (0.03)	0.50 (0.07)	** (0.07)	0.14 (0.05)	0.15 (0.02)	Н.д. (0.02)	0.15 (0.02)	Н.д. (0.02)
Грамположительные бакт.	il7:0	0.17 (0.01)	0.27 (0.03)	** (0.03)	0.11 (0.03)	0.18 (0.04)	*	0.18 (0.04)	*
Грамположительные бакт.	a17:0	0.29 (0.04)	0.51 (0.06)	** (0.06)	0.14 (0.03)	0.14 (0.01)	Н.д. (0.01)	0.14 (0.01)	Н.д. (0.01)
Грамположительные бакт.	11,17:0	0.34 (0.03)	0.55 (0.06)	** (0.06)	0.47 (0.15)	0.44 (0.04)	Н.д. (0.04)	0.44 (0.04)	Н.д. (0.04)
Грамтрицательные бакт.	su17:0	0.10 (0.02)	0.18 (0.03)	** (0.03)	0.03 (0.01)	0.05 (0.01)	Н.д. (0.01)	0.05 (0.01)	Н.д. (0.01)
Актиномицеты	10Me18:0	0.53 (0.04)	0.67 (0.02)	** (0.02)	0.30 (0.04)	0.34 (0.02)	Н.д. (0.02)	0.34 (0.02)	Н.д. (0.02)
Грамположительные бакт.	br18:0	0.40 (0.03)	0.62 (0.08)	** (0.08)	0.16 (0.06)	0.23 (0.02)	Н.д. (0.02)	0.23 (0.02)	Н.д. (0.02)
Актиномицеты	10Me19:0	0.67 (0.05)	1.61 (0.16)	*** (0.16)	0.54 (0.17)	0.49 (0.09)	Н.д. (0.09)	0.49 (0.09)	Н.д. (0.09)
Грамтрицательные бакт.	su19:0	0.25 (0.02)	0.42 (0.01)	*** (0.01)	0.14 (0.03)	0.20 (0.05)	Н.д. (0.05)	0.20 (0.05)	Н.д. (0.05)
Грамположительные бакт.	i20:0	0.09 (0.02)	0.13 (0.01)	** (0.01)	0.12 (0.02)	0.12 (0.02)	Н.д. (0.02)	0.12 (0.02)	Н.д. (0.02)
Простейшие	n22:0	0.05 (0.01)	0.09 (0.03)	* (0.03)	0.09 (0.01)	0.06 (0.01)	** (0.01)	0.06 (0.01)	** (0.01)
Простейшие	n24:0	0.01 (0.01)	0.03 (0.01)	*** (0.01)	0.01 (0.01)	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Грамтрицательные бакт.	15:1ω6	0.08 (0.01)	0.13 (0.01)	*** (0.01)	0.07 (0.02)	0.08 (0.02)	Н.д. (0.02)	0.08 (0.02)	Н.д. (0.02)
Арбускулярная микориза	16:1ω5	0.24 (0.03)	0.33 (0.02)	** (0.02)	0.19 (0.07)	0.21 (0.06)	Н.д. (0.06)	0.21 (0.06)	Н.д. (0.06)
Грамтрицательные бакт.	16:1ω7	0.10 (0.02)	0.18 (0.01)	*** (0.01)	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	Н.д. (0.01)	0.03 (0.01)	Н.д. (0.01)
Грамтрицательные бакт.	17:1ω8	0.27 (0.02)	0.36 (0.01)	*** (0.01)	0.19 (0.06)	0.20 (0.04)	Н.д. (0.04)	0.20 (0.04)	Н.д. (0.04)
Метанофиты	18:1ω7	0.22 (0.02)	0.41 (0.03)	*** (0.03)	0.15 (0.03)	0.11 (0.02)	Н.д. (0.02)	0.11 (0.02)	Н.д. (0.02)
Сапротрофные грибы	18:1ω9	0.11 (0.02)	0.26 (0.06)	** (0.06)	Н.о.	0.15 (0.04)	Н.о.	0.15 (0.04)	Н.о.

Значками *, ** и *** обозначена достоверность различий при $p < 0.10$, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно (определялась методом непарного t -теста, $n = 4$). Н.д. означает статистически незначимые различия; н.о. – ЖКФ не обнаружена. В круглых скобках указаны величины стандартного отклонения.

Таблица 3. Значения $\delta^{13}\text{C}$ и сдвига в $\delta^{13}\text{C}$ (‰) для индивидуальных ЖКФ в условиях С3–С4 перехода, осуществленного следующими способами: 1) выращивание растений кукурузы на С3 почве (агрочернозем, Эксперимент 1); 2) внесение растительного С4 материала (биомассы кукурузы) в С3 почву (агросерая почва, Эксперимент 2)

Группа организмов	Название ЖКФ	Агрочернозем			Агросерая почва			сдвиг в $\delta^{13}\text{C}$
		контрольная почва	почва в условиях С3–С4 перехода	сдвиг в $\delta^{13}\text{C}$	контрольная почва	почва в условиях С3–С4 перехода	сдвиг в $\delta^{13}\text{C}$	
Грамположительные бакт.	br14:0	-24.4 (1.7)	-21.3 (0.9)	Н.д.	-25.5 (2.2)	-19.9 (0.8)	**	5.6
Бактерии	n14:0	-27.0 (0.4)	-24.8 (0.7)	*	-26.3 (1.1)	-23.9 (1.0)	*	2.4
Грамположительные бакт.	i15:0	-22.8 (0.9)	-18.2 (0.3)	**	-24.4 (0.7)	-18.4 (0.6)	***	5.9
Грамположительные бакт.	a15:0	-20.6 (1.3)	-16.3 (0.9)	*	-22.0 (0.7)	-16.5 (0.6)	***	5.5
Бактерии	n15:0	-20.1 (2.4)	-17.3 (2.0)	Н.д.	-24.3 (1.6)	-17.3 (2.0)	**	7.0
Грамположительные бакт.	i16:0	-21.5 (1.2)	-17.2 (0.8)	*	-24.6 (0.8)	-18.2 (1.4)	***	6.4
Грамположительные бакт.	a16:0	-22.5 (0.8)	-18.5 (0.4)	**	-24.6 (0.5)	-19.2 (1.3)	***	5.5
Актиномицеты	10Me17:0	-22.8 (0.9)	-18.4 (1.1)	*	-24.7 (0.8)	-19.9 (1.2)	***	4.8
Грамположительные бакт.	i17:0	-21.8 (2.1)	-16.1 (0.6)	*	-23.4 (1.0)	-16.9 (1.3)	***	6.6
Грамположительные бакт.	a17:0	-20.5 (1.2)	-14.5 (1.8)	*	-22.0 (1.3)	-16.7 (0.7)	***	5.2
Грамположительные бакт.	11,17:0	-22.5 (2.1)	-18.4 (1.2)	Н.д.	-22.6 (2.6)	-14.9 (0.3)	**	7.7
Грамтрицательные бакт.	su17:0	-23.3 (0.9)	-18.2 (0.9)	**	-25.7 (1.2)	-20.5 (1.5)	**	5.3
Актиномицеты	10Me18:0	-23.1 (1.5)	-17.9 (0.7)	*	-24.3 (1.3)	-20.8 (1.5)	*	3.5
Грамположительные бакт.	br18:0	-23.9 (0.3)	-20.0 (0.7)	**	-25.1 (0.6)	-22.5 (1.1)	**	2.6
Актиномицеты	10Me19:0	-23.0 (1.1)	-19.2 (1.3)	*	-25.2 (0.5)	-19.8 (0.8)	***	5.4
Грамтрицательные бакт.	su19:0	-23.8 (0.8)	-19.9 (0.4)	**	-27.0 (0.8)	-21.0 (0.7)	***	6.0
Грамположительные бакт.	i20:0	-26.7 (0.8)	-23.6 (0.2)	**	-29.9 (0.7)	-25.7 (0.7)	***	4.2
Простейшие	n22:0	-27.0 (0.4)	-23.0 (0.2)	**	-29.6 (0.7)	-27.8 (0.5)	**	1.7
Простейшие	n24:0	-27.1 (3.2)	-22.8 (1.8)	Н.д.	-29.7 (0.5)	-26.5 (1.3)	**	3.2
Грамтрицательные бакт.	15:1o6	-25.8 (1.4)	-20.2 (0.7)	**	-29.1 (0.4)	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Арбускулярная микориза	16:1o5	-21.9 (1.4)	-17.1 (0.7)	*	-24.7 (0.8)	-17.1 (1.5)	***	7.6
Грамтрицательные бакт.	16:1o7	-24.9 (1.5)	-21.6 (0.6)	*	-27.3 (0.4)	-21.6 (0.6)	***	5.7
Грамтрицательные бакт.	17:1o8	-26.5 (1.3)	-23.1 (0.6)	*	-33.4 (1.6)	-23.9 (1.9)	***	8.3
Метанотрофы	18:1o7	-26.0 (1.5)	-23.6 (0.7)	Н.д.	-27.6 (1.3)	-22.4 (1.5)	**	5.3
Сапротрофные грибы	18:1o9	-20.9 (1.4)	-18.1 (0.6)	*	-22.3 (1.2)	-19.0 (2.6)	Н.д.	3.3
Сапротрофные грибы	18:2o6,9	-22.5 (1.5)	-16.9 (0.7)	**	Н.о.	-18.7 (0.7)	Н.о.	Н.о.

Значками *, ** и *** обозначена достоверность различий при $p < 0.10$, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно (определялась методом непарного t -теста, $n = 4$). Н.д. означает статистически незначимые различия; н.о. – ЖКФ не обнаружена. В круглых скобках указаны величины стандартного отклонения.

Таблица 4. Доля нового (С4) углерода (%) для индивидуальных ЖКФ в условиях С3–С4 перехода, осуществленного следующими способами: 1) выращивание растений кукурузы на С3 почве (агрочернозем, Эксперимент 1); 2) внесение растительного С4 материала (биомассы кукурузы) в С3 почву (агросерая почва, Эксперимент 2)

Группа организмов	Название ЖКФ	Агрочернозем		Агросерая почва		Достоверность
		% С4		% С4		
Грамположительные бакт.	br14:0	21	(6)	41	(5)	**
Бактерии	n14:0	15	(2)	18	(2)	Н.д.
Грамположительные бакт.	i15:0	31	(2)	43	(4)	**
Грамположительные бакт.	a15:0	29	(3)	40	(2)	**
Бактерии	n15:0	30	(6)	51	(8)	**
Грамположительные бакт.	i16:0	29	(4)	46	(10)	*
Грамположительные бакт.	a16:0	27	(1)	40	(5)	**
Актиномицеты	10Me17:0	30	(5)	35	(8)	Н.д.
Грамположительные бакт.	i17:0	38	(5)	48	(6)	Н.д.
Грамположительные бакт.	a17:0	40	(7)	38	(8)	Н.д.
Грамположительные бакт.	11,17:0	27	(3)	56	(2)	***
Грамотрицательные бакт.	cy17:0	34	(4)	38	(4)	Н.д.
Актиномицеты	10Me18:0	35	(6)	25	(5)	Н.д.
Грамположительные бакт.	br18:0	26	(1)	19	(2)	***
Актиномицеты	10Me19:0	26	(4)	39	(4)	**
Грамотрицательные бакт.	cy19:0	26	(3)	44	(8)	**
Грамположительные бакт.	i20:0	21	(1)	30	(7)	*
Простейшие	n22:0	27	(2)	23	(4)	Н.д.
Простейшие	n24:0	29	(9)	23	(4)	Н.д.
Грамотрицательные бакт.	15:1ω6	32	(4)	Н.о.	Н.о.	
Арбускулярная микориза	16:1ω5	32	(2)	55	(14)	*
Грамотрицательные бакт.	16:1ω7	22	(1)	41	(11)	*
Грамотрицательные бакт.	17:1ω8	29	(2)	60	(23)	*
Метанотрофы	18:1ω7	16	(1)	38	(7)	**
Сапротрофные грибы	18:1ω9	18	(1)	24	(6)	Н.д.
Сапротрофные грибы	18:2ω6,9	38	(8)	Н.о.	Н.о.	

Значками *, ** и *** обозначена достоверность различий между агрочерноземом и агросерой почвой при $p < 0.10$, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно (определялась методом непарного t -теста, $n = 4$). Н.д. означает статистически незначимые различия; н.о. – ЖКФ не обнаружена. В круглых скобках указаны величины стандартного отклонения.

черноземе, в почве с высоким содержанием ПОВ, и в варианте “АС-С3–С4”, обогащенном С из биомассы кукурузы. В контрольной агросерой почве данный маркер не был обнаружен (табл. 2–4). В этой почве был выявлен только грибной маркер 18:1ω9 – представитель группы мононенасыщенных ЖКФ, с весьма умеренными величиной изотопного сдвига (3.3‰) и долей С4 в составе ЖКФ (24%). Отсутствие маркера 18:2ω6,9 в почве, бедной ПОВ, вполне соответствует литературным данным. Так, Крамер и Гляйкснер [5] смогли обнаружить маркер 18:2ω6,9 только в относительно плодородной почве (Harlic Luvisol), а в экстрактах из менее плодородной почвы (Harlic Rhaeosem) данная ЖКФ отсутствовала.

Доля С4 в составе ЖКФ варьировала в пределах от 18 до 60% (среднее 38%) в агросерой почве и от 15 до 40% в агрочерноземе (среднее 28%). Наиболее обогащенными новым углеродом были следующие ЖКФ: а) 16:1ω5 – маркер для арбускулярной микоризы (АМ); б) 11,17:0; i17:0 и 17:0 – маркеры для грамположительных бактерий; в) Cy19.0 и 17:1ω8 – маркеры для грамотрицательных бактерий; г) 18:2ω6,9 – уже упоминавшийся маркер для сапротрофных грибов (табл. 4). Значительное содержание углерода С4 в составе ЖКФ-маркера для АМ легко объяснимо, если принять во внимание тесное вовлечение АМ в состав корневой системы растений [23]. По степени обогащения новым углеродом группы микроорганизмов в агросерой почве

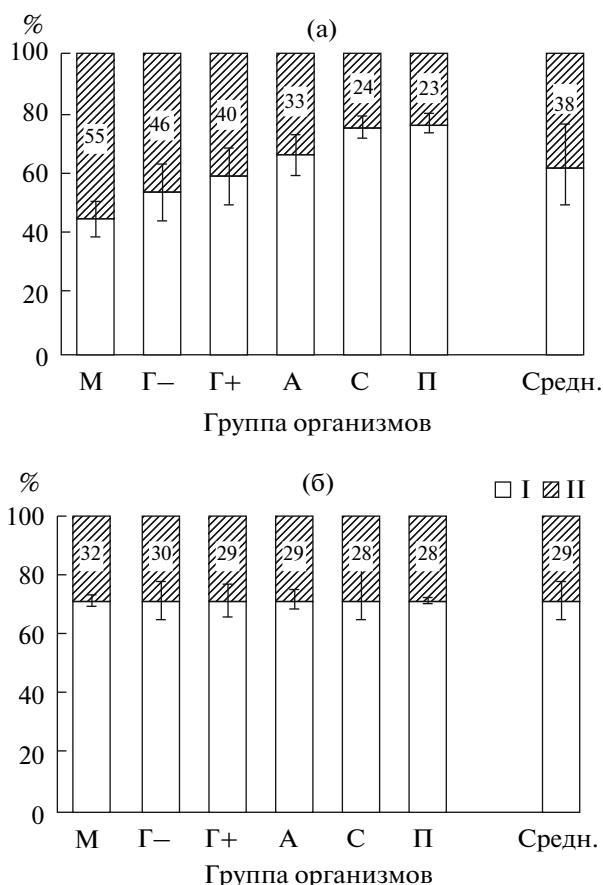


Рис. 2. Вклад старого С3 (I) и нового С4 (II) в углерод биомассы различных групп организмов, определенных методом профилей ЖКФ (%) в почве в условиях С3–С4 перехода в агрочерноземе (а) и агросерой почве (б). Обозначение групп организмов: ГП – грамположительные бактерии, А – актиномицеты; ГО – грамотрицательные бактерии, М – арбускулярные микоризные грибы; Г – грибы; П – простейшие; средн. – среднее для всех групп организмов. Отрезками обозначены величины стандартного отклонения (\pm SD).

выстроились в следующий ряд: простейшие < сапротрофные грибы < актиномицеты < грамположительные бактерии < грамотрицательные бактерии < микоризные грибы (рис. 2). Вклад С4 углерода в состав ЖКФ, выделенных из агрочернозема, не отличался значимо для разных групп организмов, со статистически недостоверным максимумом у микоризных грибов (рис. 2).

Примечательно, что даже спустя более чем четыре десятилетия возделывания монокультуры кукурузы (Эксперимент 1), большая часть углерода в составе ПОВ, $S_{\text{мик}}$ и в большинстве из определяемых нами индивидуальных ЖКФ была представлена старым углеродом (табл. 1, 4). Это хорошо согласуется с данными других авторов. Например, в эксперименте Крамера и Гляйкснера [5] было обнаружено, что только 20% углерода в

ЖКФ и около 15% в ПОВ было замещено С4 углеродом после 39 лет выращивания кукурузы на С3 почве. Даже на почве с относительно высокой величиной замещения старого углерода в ПОВ, почти на одну треть, до половины углерода ЖКФ все еще было представлено старым С3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Считается, что грамотрицательные бактерии предпочитают новый углерод растительного происхождения, а грамположительные бактерии вовлечены, главным образом, в трансформацию старого углерода ПОВ [4, 23, 24]. Поэтому обычно предполагается, что биомасса грамотрицательных бактерий обогащена изотопом ^{13}C по сравнению с биомассой грамположительных бактерий. Однако в нашем эксперименте данная тенденция была довольно “размытой”, статистически недостоверной в агросерой почве, сравнительно бедной органическим веществом, и не была обнаружена в богатом гумусом агрочерноземе. Ранее Крамер и Гляйкснер [5] также указывали, что, хотя ЖКФ-маркеры грамотрицательных бактерий были обогащены С4 углеродом по сравнению с маркерами грамположительных, сдвиги в величинах изотопного обогащения в ЖКФ в почве с более высоким плодородием для грамотрицательных и грамположительных бактерий были сходными. Иначе говоря, данными авторами не было выявлено различий между грамположительными и грамотрицательными бактериями в “стратегии питания”, как можно было бы предположить, исходя из представлений современной почвенной микробиологии. Дэнеф и соавт. [25] тоже показали, что грамположительные бактерии, наряду с грамотрицательными, способны иммобилизовать значительные количества ^{13}C -экссудатов после импульсного мечения растений с $^{13}\text{CO}_2$. Таким образом, распространенное представление о грамотрицательных бактериях как преимущественно ассоциированных с корнями, и грамположительных как равномерно распределенных в почве, и поэтому мало вовлеченных в трансформацию углерода растительного происхождения, не нашло экспериментального подтверждения при использовании изотопных методов.

На наш взгляд, среди наиболее вероятных причин относительно невысокого содержания нового углерода в составе ЖКФ вообще, и в составе маркеров грибов и грамотрицательных бактерий в частности, следует отметить следующие:

1) Происходит ассимиляция (рециклирование) бактериями углерода из грибной некромассы, включая и ^{13}C , а не только углерода непосредственно из ризодепозитов или растительных остатков как таковых. Этим феноменом Дэнеф и соавт. [26] объяснили тот факт, что сначала ими

было выявлено быстрое поступление ^{13}C из меченых экссудатов в биомассу почвенных грибов уже через 10 ч после импульсного мечения растений с $^{13}\text{CO}_2$, а спустя 11 месяцев ЖКФ-маркеры грибов были в гораздо меньшей степени обогащены ^{13}C , чем ЖКФ-маркеры бактерий. Этим же феноменом можно отчасти объяснить и относительно низкое содержание нового углерода в составе 18:1ω9 — одного из маркеров для сапротрофных грибов в нашем эксперименте.

2) Одной из причин относительно низкого содержания нового углерода в биомассе грибов может быть присутствие значительной доли почвенных сапротрофных грибов в виде покоящихся форм (спор). Согласно данным Благодатского и соавт. [27], биомасса микроорганизмов, способных к немедленному росту после внесения в почву легко разлагаемого субстрата (например, глюкозы), составляет не более 1% от общей биомассы всего почвенного микробного сообщества. Даже длительные инкубационные эксперименты с периодическим внесением больших количеств глюкозы увеличивают долю активных микроорганизмов только до 4–10%. Эти данные вполне соответствуют данным Хобби и соавт. [28], которые обнаружили комбинированием радиоуглеродного метода и AMS-спектроскопии, что “возраст” углерода в биомассе сапротрофных грибов (порядка 10 лет) гораздо выше возраста углерода микоризы (не более 2 лет). Применение того же метода в сочетании с фумигационным методом также выявило значительное содержание покоящихся форм в составе биомассы почвенных микроорганизмов [29]. Поэтому можно предположить, что только небольшая часть почвенного грибного сообщества в наших экспериментах была действительно вовлечена в ассимиляцию и минерализацию нового углерода. При этом большая часть биомассы грибного сообщества была представлена биомассой организмов, находившихся в покоящемся состоянии или состоянии поддержания, либо же в условиях недоступности поступающего в почву растительного субстрата из-за пространственной микроразнообразности почвы.

3) Грамположительные бактерии способны ассимилировать как легко разлагаемые органические вещества растительного происхождения, так и устойчивые соединения ПОВ, что было показано методом комбинированного мечения с ^{13}C и ^{14}C [5]. Другие авторы также показали, что в почве происходит интенсивная реутилизация углерода из ПОВ [4, 29]. Таким образом, способность представителей почвенного микробного сообщества к росту на тех или иных углеродных субстратах зависела от доступности субстрата и других экологических условий в гораздо большей степени, чем от собственно структуры почвенного микробного сообщества. Если обратиться к условиям наших

экспериментов, то в ходе длительного С3–С4 перехода в агрочерноземе и агросерой почве вещества, содержащие новый углерод, в значительной мере трансформировались из легко разлагаемых ризодепозитов (вариант “Ч–С3–С4”) или свежевнесенного растительного материала (вариант “АС–С3–С4”) в широкий ряд пулов углерода с различной устойчивостью к минерализации почвенными микроорганизмами. Иначе говоря, получился ряд углеродных пулов, доступных для использования как грамотрицательными, так и грамположительными бактериями.

Для того, чтобы выяснить относительный вклад вышеизложенных механизмов в регуляцию круговорота вновь поступающего С растительных остатков, а также минерализацию гумуса в почве, необходимы дальнейшие эксперименты по изучению сравнительной устойчивости С4 и С3 соединений в составе фракций ПОВ, а также по выяснению особенностей поступления нового углерода как в биомассу различных групп почвенных микроорганизмов, так и в различные фракции почвенного органического вещества.

Таким образом, наш эксперимент по оценке поступления углерода растений с С4 типом фотосинтеза в биомассу почвенных микроорганизмов показал, что углерод в составе биомаркерных ЖКФ для всех таксономических групп в агрочерноземе и агросерой почве был обогащен С4 углеродом по сравнению с ПОВ, с максимальной долей в биомассе микоризы. Была показана тенденция к преимущественному использованию почвенными микроорганизмами свежепоступившего С растительного происхождения по сравнению с углеродом гумуса, то есть отрицательный затравочный эффект. Напротив, доминирование грамотрицательных бактерий и сапротрофных грибов в ассимиляции углерода растительного происхождения, которое предполагалась, исходя из имеющихся литературных данных, в нашем эксперименте не было выявлено. По нашему мнению, данный феномен объясняется тем обстоятельством, что долговременный С3–С4 переход приводил к образованию широкого ряда С4-содержащих пулов углерода с различной устойчивостью к минерализации, и в результате почвенные микроорганизмы ассимилировали С как из легко разлагаемых, так и устойчивых форм органических соединений С4 происхождения. Вероятно, поэтому С4 углерод оказывался в составе биомассы не только преимущественно ризосферных микроорганизмов (например, грамотрицательных бактерий), но и микроорганизмов, вовлеченных в минерализацию гумусовых веществ (например, грамположительных бактерий). Кроме того, на долю С3 и С4 углерода в составе ЖКФ-маркеров тех или иных групп почвенных микроорганизмов большое влияние оказывало то обстоятельство, что большая часть биомассы почвенного микробного сообщества представлена

покоящимися, а не активно растущими формами. Для выяснения количественного вклада данных механизмов нужны дополнительные эксперименты по параллельному определению поступления С4 углерода в биомассу различных таксономических групп микроорганизмов и в разные фракции почвенного органического вещества.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда Александра Гумбольдта (A. von Humboldt Stiftung), Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 11-04-00938-а и 11-04-01787-а), Президиума РАН (программа № 4), гранта НШ-6620.2012.4 “Исследование биогенных источников, резервуаров и стоков парниковых газов в условиях меняющейся окружающей среды”. Особую благодарность мы выражаем Францу Бюггеру (Franz Buegger) за проведение анализа $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ и Юргену Эспершютцу (Jürgen Esperschütz) за помощь в проведении анализов ЖКФ. Мы благодарны также другим членам персонала Института Почвенной Экологии (Нойерберг, Германия) за техническую поддержку и ценные рекомендации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lützw M.V., Kögel-Knabner I., Ekschmitt K., Matzer E., Guggenberger G., Marschner B., Flessa H. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions – a review // *Eur. J. Soil. Sci.* 2006. V. 57. P. 426–445.
- Курганова И.Н., Ермолаев А.М., Лопес де Гереню В.О., Ларионова А.А., Кузяков Я., Келлер Т., Ланге Ш. Баланс углерода в почвах залежей Подмосковья // *Почвоведение.* 2007. № 1. С. 60–68.
Kurganova I.N., Yermolaev A.M., Lopes de Gerenyu V.O., Larionova A.A., Kuzyakov Ya., Keller T., Lange S. Carbon balance in the soils of abandoned lands in Moscow region // *Eurasian Soil Sci.* 2007. V. 40. P. 51–58.
- Семенов В.М., Иванникова Л.А., Кузнецова Т.В., Семенова Н.А., Тулина А.С. Минерализуемость органического вещества и углерод-секвестрирующая емкость почв зонального ряда // *Почвоведение.* 2008. № 7. С. 819–832.
Semenov V.M., Ivannikova L.A., Kuznetsova T.V., Semenova N.A., Tulina A.S. Mineralization of organic matter and the carbon sequestration capacity of zonal soils // *Eurasian Soil Sci.* 2008. V. 41. P. 717–730.
- Flessa H., Amelung W., Helfrich M., Wiesenberger G.L.B., Gleixner G., Brodowski S., Rethemeyer L., Kramer C., Grootes P.M. Storage and stability of organic matter and fossil carbon in a Luvisol and Phaeozem with continuous maize cropping: A synthesis // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2008. V. 171. P. 36–51.
- Kramer C., Gleixner G. Variable use of plant- and soil-derived carbon by microorganisms in agricultural soil // *Soil Biol. Biochem.* 2006. V. 38. P. 3267–3278.
- Balesdent J., Mariotti A. Measurement of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundance // *Mass Spectrometry in Soils* / Eds. Baulton T.W., Yamasaki S. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, 1996. P. 83–111.
- Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review // *Biol. Fert. Soils.* 1999. V. 29. P. 111–129.
- Gattinger A., Guenther A., Schloter M., Munch J.C. Characterization of Archaea in soils by polar lipid analysis // *Acta Biotechnol.* 2002. V. 23. P. 133–139.
- Evershed R.P., Crossmas Z.M., Bull I.D., Mottram H., Dungait J.A.J., Maxfield P.J., Brennada E.L. ^{13}C -labeling of lipids to investigate microbial communities in the environment // *Cur. Opin. Biotechnol.* 2006. V. 17. P. 72–82.
- Söderberg K.H., Probanza A., Jumpponen A., Baath E. The microbial community in the rhizosphere determined by community level physiological profiles (CLPP) and direct soil- and cfu-PLFA techniques // *Appl. Soil Ecol.* 2004. V. 25. P. 135–145.
- Zelles L., Bai Q.Y. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by soil phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS // *Soil Biol. Biochem.* 1993. V. 25. P. 130–134.
- Esperschütz J., Schloter M., Gattinger A., Buegger W., Lang H., Munch J.C. Winkler J.B. A continuous labeling approach to recover photosynthate ^{13}C in plant tissue and rhizosphere organisms of beech (*Fagus sylvatica* L.) // *Plant Soil.* 2009. V. 323. P. 21–29.
- Wiemken V., Laczko E., Ineichen K., Boller T. Effects of elevated carbon dioxide and nitrogen fertilization on mycorrhizal fine roots and the soil microbial community in beech-spruce ecosystems on siliceous and calcareous soil // *Microbial Ecol.* 2001. V. 42. P. 126–135.
- Frostegård A., Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil // *Biol. Fert. Soils.* 1996. V. 22. P. 59–65.
- Kaiser C., Frank A., Wild B., Koranda M., Richter A. Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2 ω 6,9 and 18:1 ω 9 // *Soil Biol. Biochem.* 2010. V. 42 P. 1650–1652.
- Abrajano J.T.A., Murphy D.E., Fang J., Comet P., Brooks J.M. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in individual fatty acids of marine mytilids with and without bacterial symbionts // *Organ. Geochem.* 1994. V. 21. P. 611–617.
- Werner R.A., Brand W.A. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis // *Rapid Commun. Mass Spectrometry.* 2001. V. 15. P. 501–519.
- Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C // *Soil Biol. Biochem.* 1987. V. 19. P. 703–707.
- Krummen M., Hilker A.W., Juchelka D., Duhr A., Schlüter H.-J., Pesch R. A new concept for isotope ratio monitoring liquid chromatography/mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrometry.* 2004. V. 18. P. 2260–2266.
- Marx M., Buegger F., Gattinger A., Marschner B., Zsolnay Á., Munch J.C. Determination of the fate of ^{13}C labelled maize and wheat rhizodeposit-C in two agricultural soils in a greenhouse experiment under ^{13}C -CO₂-enriched atmosphere // *Soil Biol. Biochem.* 2007. V. 39. P. 3043–3055.

21. Ryan M.C., Aravena R. Combining ^{13}C natural abundance and fumigation-extraction methods to investigate soil microbial biomass turnover // *Soil Biol. Biochem.* 1994. V. 26. P. 1583–1585.
22. Blagodatsky S.A., Larionova A.A., Yevdokimov I.V. Effect of mineral nitrogen on the respiration rate and growth // *Eurasian Soil Sci.* 1993. V. 25. P. 85–89.
23. Waldrop M.P., Firestone M.K. Microbial community utilization of recalcitrant and simple carbon compounds: impact of oak–woodland plant communities // *Oecologia.* 2004. V. 138. P. 275–284.
24. Lu Y.H., Abraham W.R., Conrad R. Spatial variation of active microbiota in the rice rhizosphere revealed by in situ stable isotope probing of phospholipids fatty acids // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. P. 474–481.
25. Deneff K., Roobroeck D. Wadu M.C.W.M., Lootens P., Boeckx P. Microbial community composition and rhizodeposit – carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils // *Soil Biol. Biochem.* 2009. V. 41. P. 144–153.
26. Deneff K., Bubenheim H., Lenhart K., Vermeulen J., Van Cleemput O., Boeckx P., Muller C. Community shifts and carbon translocation within metabolically-active rhizosphere microorganisms in grasslands under elevated CO_2 // *Biogeosciences.* 2007. V. 4. P. 769–779.
27. Blagodatsky S.A., Heinemeyer O., Richter J. Estimating the active and total soil microbial biomass by kinetic respiration analysis // *Biol. Fertil. Soils.* 2000. V. 32. P. 73–81.
28. Hobbie E.A., Weber N.S., Trappe J.M., van Klinken G.J. Using radiocarbon to determine the mycorrhizal status of fungi // *New Phytologist.* 2002. V. 156. P. 129–136.
29. Garnett M.H., Bol R., Bardgett R.D., Wanek W., Baumler R., Richter A. Natural abundance radiocarbon in soil microbial biomass: Results from a glacial foreland // *Soil Biol. Biochem.* 2011. V. 43. P. 1356–1361.