

УДК 631.41.1:631.461

## ВЛИЯНИЕ АЗОТА НА СКОРОСТЬ МИНЕРАЛИЗАЦИИ И ГУМИФИКАЦИИ ЛЕСНОГО ОПАДА В МОДЕЛЬНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ\*

© 2017 г. А. А. Ларионова<sup>1</sup>, А. К. Квиткина<sup>1</sup>, С. С. Быховец<sup>1</sup>, В. О. Лопес-де-Гереню<sup>1</sup>, Ю. Г. Колягин<sup>2</sup>, В. В. Каганов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 2E-mail: larioнова\_al@rambler.ru<sup>2</sup> Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, 119234 Москва, Воробьевы горы, 1<sup>3</sup> Центр по проблемам экологии и продуктивности лесов РАН117997 Москва, ул. Профсоюзная, 84/32

Поступила в редакцию 16.06.2016 г.

В длительных лабораторных инкубационных опытах изучено влияние эндогенного и экзогенного азота на разложение фракций лесного опада, отобранных в липово-сосново-осиновом лесу в Приокско-Террасном биосферном заповеднике (Московская обл.). По величине отношения С: N с учетом эндогенного азота фракции опада выстроились в следующий ряд: некромасса цианобактерий *Nostoccommunae* (С: N=9); опад лиственных деревьев (С: N=32); опад хвои сосны (С: N=66); опад коры сосны (С: N=84), крупные древесные остатки липы (С: N=206) и сосны (С: N=510). Для исследования влияния экзогенного азота вносили  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , чтобы довести исходную величину С: N до заданного значения, находящегося в интервале от 5 до 204. Минерализацию оценивали по интенсивности эмиссии  $\text{CO}_2$ . Гумификацию определяли по изменению соотношения структурных фрагментов в составе органического вещества опавов по данным твердофазной  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии. Установлена логарифмическая зависимость между скоростью минерализации углерода и отношением С: N в исходном опаде с максимумом при С: N=22. Внесение минерального азота увеличивало интенсивность минерализации бедных азотом фракций опада (С: N>66) и ингибировало выделение  $\text{CO}_2$  при разложении опада с высоким содержанием азота (С: N=9–32). В процессе разложения всех фракций опада увеличивалось значение отношения “алкил: О-алкил”, которое является показателем глубины гумификации растительного материала в почве. Дополнительное внесение азота стимулировало гумификацию, особенно при разложении хвои сосны. Таким образом, выявлены закономерности влияния эндогенного и минерального азота как на минерализацию, так и на гумификацию лесного опада.

*Лесной опад, разложение растительных остатков, отношение С: N, минерализация, гумификация, минеральный азот*

Разложение растительного опада – ключевой процесс деструкционной части круговорота углерода, определяющий эмиссию углекислого газа, поступление питательных элементов в почву и формирование лесной подстилки. Наиболее общими процессами, сопровождающими образование подстилки, являются последовательная деструкция опада, его измельчение и ферментация (Орлов и др., 1996). Скорость разложения растительных остатков зависит, прежде всего, от температуры и влажности, а также от качества опада: концентрации азота, соотношения С: N, содержания лигнина,

полифенолов и целлюлозы (Пестряков и др., 1990; Орлов и др., 1996; Семенов и др., 2004; Zhanget al., 2008; Prescott, 2010; Berg, 2014).

Опад является одним из наиболее чувствительных к изменениям концентрации азота почвенных пулов углерода, прежде всего из-за высокого значения отношения С: N, в отличие от более обогащенного азотом органического вещества почвы (Орлов и др., 1996; Prescott, 2010). До сих пор существует неопределенность в оценках влияния соединений азота на процессы минерализации углерода растительных остатков. Это особенно актуально при современных темпах вовлечения азота в биогеохимический круговорот (Dijkstra et al., 2004; Обзор., 2014). Имеющиеся в литературе сведения противоречивы, в них можно найти

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (14-04-01738, 14-04-01884).

свидетельства того, что увеличение концентрации азота в опаде как усиливает, так и подавляет процессы его разложения (Knorr et al., 2005; Hobbie et al., 2012). Наконец, существуют экспериментальные данные, показывающие, что влияние азота на минерализацию статистически не значимо либо значимо при низких значениях коэффициента корреляции (Knorr et al., 2005; Zhang et al., 2008).

Эффект от добавления минеральной формы азота к лабильным и стабильным углеродным субстратам, растительным остаткам с низким и высоким содержанием лигнина может вызывать разнонаправленные эффекты. Минеральный азот оказывает противоположно направленное действие на активность ферментов, разлагающих целлюлозу и лигнин. Исследования на чистых культурах грибов показали, что некоторые виды, разлагающие опад, выделяли лигнинолитические ферменты только тогда, когда их рост был лимитирован азотом. Внесение же азота в минеральной форме приводило к сокращению концентрации лигнинолитических ферментов в среде и подавлению разрушения лигнина *in vitro* (Carreiro et al., 2000).

Вследствие медленного разложения лигнина, на ранних стадиях разложения опада азот может повышать скорость его минерализации за счет стимуляции целлюлозолитиков (Zhang et al., 2008). Внесение удобрений в лесные экосистемы может приводить к первоначальному усилению разложения опада и эмиссии  $\text{CO}_2$ , а затем к снижению эмиссии  $\text{CO}_2$  и последующему увеличению связывания углерода в составе гумуса (Dijkstra et al., 2004; Allison et al., 2009).

Для прогнозирования интенсивности минерализации используется показатель качества растительного опада — отношение C: N. Поэтому важно не только оценить степень влияния данного показателя на минерализацию, но и определить зависимость эмиссии  $\text{CO}_2$  от величины C: N в разлагаемом опаде. Наряду с качеством углеродных соединений, соотношение C: N и источник азота (эндогенный или экзогенный) влияют на минерализацию углерода растительного опада. Эндогенный азот в растениях находится преимущественно в органической форме в составе аминокислот, амидов, аминокислот и белков (Пестряков и др., 1990; Орлов и др., 1996) и влияет на разложение опада постепенно. Экзогенный азот поступает в экосистему в более лабильной минеральной форме, и поэтому его поступление извне может резко изменить скорость и направленность процессов разложения органического вещества.

Революция в производстве минеральных удобрений сняла лимитирование агроэкосистем по азоту, а чрезмерное использование минерального азота создало условия для загрязнения естественных экосистем (Прянишников, 1945; Gruber, Galloway, 2008). Выпадение атмосферных осадков, содержащих растворенные нитраты и аммоний, а также внесение азотных удобрений повышают содержание минеральных форм в растениях, опаде и подстилке. Это может сказаться на количественных и качественных характеристиках преобразования растительного опада в ходе его разложения и, как следствие, на качестве и запахах гумуса лесной экосистемы.

В составе атмосферных выпадений на территориях с высокой антропогенной эмиссией азота обычно преобладают нитраты, а в фоновых и сельскохозяйственных районах — аммонийные соединения (The European..., 2011). Повышенное содержание нитратов наблюдается вблизи промышленных и городских агломераций (Dijkstra et al., 2004; Обзор..., 2014). По данным (Обзор..., 2014) в Приокско-Террасном биосферном заповеднике содержание нитратов в атмосферных осадках преобладает над аммонием. Но в лесных подстилках и почвах заповедника минеральный пул азота представлен сопоставимыми концентрациями аммонийных и нитратных соединений (Аверкиева, Припутина, 2011). Аммонийная форма является преобладающей в случае, когда антропогенный источник эмиссии азота — это животноводческие фермы (Аверкиева, Припутина, 2011). В этой связи для оценки влияния экзогенного азота на скорость разложения опада в модельных экспериментах целесообразно вносить азот в обеих формах.

Также предположили, что соотношение C: N в опаде может влиять не только на скорость минерализации, но и на состав продуктов неполной минерализации опадов при формировании лесной подстилки.

Целью нашей работы была оценка влияния величины C: N во фракциях лесного опада на скорость его разложения в модельном эксперименте без внесения и с внесением минерального азота.

В задачи исследования входил сравнительный анализ влияния C: N на скорость минерализации лесного опада, которую определяли по кумулятивным потерям углерода в виде  $\text{CO}_2$ , и на трансформацию растительных остатков, определяемую по изменению содержания структурных фрагментов в составе органического вещества методом твердофазной спектроскопии ядерного магнитного резонанса изотопа  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ -ЯМР).

**Таблица 1.** Схема экспериментов по разложению лесного опада: дозы минерального азота и отношение С: N в зависимости от суммарного содержания эндогенного и экзогенного азота по вариантам опыта

Фракция опада, С: N эндогенный	Дозы минерального азота мг N×г <sup>-1</sup> опада	С: N эндогенный+минеральный
Некромасса цианобактерий С: N=9	35.4	2
	151.8	5
Листья липы, осины, березы С: N=32	32.0	10
	78.9	5
Хвоя сосны С: N=66	9.6	30
	44.7	10
	97.3	5
Кора сосны С: N=84	3.8	50
	17.9	20
	41.2	10
	88.0	5
КДО липы С: N=206	0.2	190
	0.5	170
	0.8	150
	1.3	130
	2.4	100
	7.1	50
	21.3	20
	44.8	10
	91.9	5
КДО сосны С: N=510	1.5	204
	3.0	126
	7.4	59
	88.0	5

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА

Влияние эндогенного азота, входящего в состав растений и представленного преимущественно органическими соединениями, на минерализацию и гумификацию рассматривалось на примере 6 фракций опада. Использовали опад хвойных и лиственных пород деревьев из смешанного липово-сосново-осинового леса с хорошо развитым травянистым ярусом с постоянной пробной площади Приокско-Террасного биосферного заповедника (Московская обл.), формула древостоя 7Л1С10.

Для сравнения с растительным опадом использовали некромассу цианобактерий, клетки которых не содержат лигнина, но содержат хлорофилл и устойчивый к разложению пептидогликан муреин (Practical..., 2015).

По величине отношения С: N опады образовали следующий ряд: некромасса цианобактерий *Nostoccommunae* (С: N=9); опад лиственных деревьев смешанного леса: липы, осины, березы (С: N=32); опад хвои сосны (С: N=66); опад коры сосны (С:

N=84) и крупные древесные остатки (КДО) липы (С: N=206) и сосны (С: N=510).

Выращенный в лаборатории цианобактериальный мат высушили и дважды стерилизовали при 180 °С в течение 3 часов, получив порошок некромассы цианобактерий темно-зеленого цвета. Остальной материал высушили до воздушно-сухого состояния и измельчили с помощью кофемолки, за исключением опада листьев, который был порезан на фрагменты размером 2–4 мм.

Для того, чтобы оценить влияние минерального азота на разложение растительных тканей с одинаковым биохимическим составом, к исходному опадку добавляли раствор NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> различной концентрации, доводя величину отношения С: N до заданных значений (табл. 1). Самый широкий диапазон значений С: N был в двух экспериментах с КДО липы, заложенных последовательно с интервалом 1 месяц. В первом эксперименте азот добавляли, доводя величину С: N до 100, 50, 20, 10 и 5. Во втором опыте вносили

небольшие количества азота, доводя величину С: N до 190, 170, 150, 130.

Различные фракции опада инкубировали в микрокосме (Пестряков и др., 1990) в смеси отмытого кислотами песка с чистым иллитом (отношение по массе “песок: иллит” составило 9:1). Отношение “опад: песчано-иллитная смесь” составило 10:1. Опад разлагался при температуре 22 °С и влажности 70% полной влагоемкости в герметично закрытых флаконах. Полная влагоемкость фракций опада составила 280–350 весовых%. Для быстрой колонизации высушенных образцов опада почвенными микроорганизмами пробы инокулировали водной суспензией из гумусового горизонта А<sub>1</sub> дерново-подзолистой почвы постоянной пробной площади, с которой отбирали растительный опад для модельного эксперимента. Суспензию готовили исходя из соотношения “почва: вода” 1:10.

Эксперименты были заложены в пяти повторностях. Содержание органического углерода (С<sub>орг</sub>) и общего азота (N<sub>общ</sub>) определяли в начале и в конце эксперимента с помощью элементного NCNS-анализатора Vario EL III (Elementar, Германия). Измерения С и N проводили в Центре коллективного пользования ИФХиБПП РАН.

Концентрацию СО<sub>2</sub> определяли на газовом хроматографе “Кристаллюкс-4000” с детектором теплопроводности. Газовую смесь разделяли на хроматографических колонках длиной 3 м, заполненных сорбентом Rogarask-Q, при температуре 50°С. Газовые пробы отбирали на 2-, 3-, 4-, 7-, 10-е сутки, далее еженедельно или реже в течение года, после отбора флаконы проветривали. Общая продолжительность инкубации составила 403 суток. Длительное инкубирование опада позволило оценить влияние экзогенного и эндогенного азота на скорость минерализации как лабильных, так и устойчивых пулов органического вещества исследуемых фракций опада. Интенсивность дыхания вычисляли по накоплению углекислого газа в интервалах между отборами газовых проб.

Эмиссию углекислого газа при разложении опада как показатель полной минерализации органического вещества (С<sub>мин</sub>) рассчитывали в процентах от исходного содержания углерода в опадах (С<sub>орг</sub>):

$$C_{\text{мин}} = C - CO_2 / C_{\text{орг}} \times 100\% \quad (1)$$

Структурные фрагменты органического вещества исследовали методом твердофазного <sup>13</sup>C–ЯМР. <sup>13</sup>C–ЯМР-спектры опада были получены на спектрометре BRUKER AVANCE-II NMR400,

работающем на частоте 100.4 МГц, с использованием двухканального четырехмиллиметрового MAS-датчика. Для записи спектров на ядрах <sup>13</sup>C использованы импульсные методики с контролируемым переносом поляризации. Расчеты положения пиков на спектре (химический сдвиг) выполнены относительно положения СН<sub>2</sub>-групп в структуре адамантана.

Для расшифровки спектры разделяли на диапазоны, соответствующие различным структурным фрагментам (Kögel-Knabner, 2002; Ларионова и др., 2015): 0–45 ppm – незамещенные алкилы (алифатические фрагменты – СН<sub>2</sub>- и СН<sub>3</sub>-группы); 45–110 ppm – О-алкильные группы углеводов; 110–140 ppm – незамещенные или алкил-замещенные ароматические структуры (Н (С)-арилы); 140–160 ppm – О-замещенные (фенольные) ароматические фрагменты (О-арилы); 160–190 ppm – карбонилы СООН-групп; 190–220 ppm – карбонилы альдегидов и кетонов.

Степень ароматичности опада до и после инкубации рассчитывали как отношение арилов к сумме алкилов, О-алкилов и арилов (Ларионова и др., 2015).

Статистическую обработку проводили с помощью дисперсионного анализа ANOVA. Апостериорное сравнение групп осуществлялось согласно критерию Тьюки (P = 0.95).

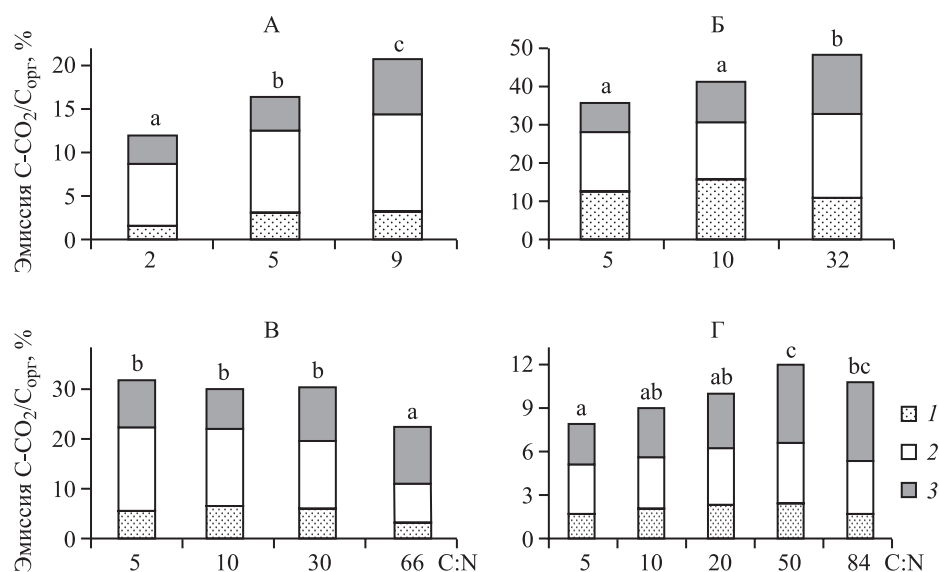
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Минерализация опавов без внесения минерального азота.** Скорости и кумулятивные потери углерода при разложении опада в ряду увеличения С: N различались в зависимости от фракции и качества органического вещества.

Разложение всех фракций опада было наиболее интенсивным на начальной стадии (рис. 1) и существенно замедлялось к концу инкубации.

За время эксперимента около 50% углерода листового опада минерализовалось до СО<sub>2</sub> (рис. 1, Б). Опад хвои сосны и некротомасса цианобактерий потеряли более 20% (рис. 1, А и В), кора сосны 11% (рис. 1, Г), а КДО липы и сосны – лишь 2.4% и 2.9% углерода от его исходного количества, соответственно (рис. 2, А Б).

Аналогичное распределение типов опада по интенсивности их минерализации наблюдалось и на более ранних стадиях разложения. За первые 90 суток инкубации также наиболее интенсивно разлагался листовая опад, где минерализовалось 33% углерода. КДО разлагались наименее



**Рис. 1.** Эмиссия  $C-CO_2$  от  $C_{орг}$  при разложении лесного опада без внесения азота и в вариантах с добавлением минерального азота А – некротомасса цианобактерий, Б – лиственный опад, В – опад хвои сосны, Г – опад коры сосны; 1 – кумулятивная эмиссия за 12 сут., 2 – за 90 сут. и 3 – за 403 сут. Буквами а, б, с на рис. 1 и 2 обозначены достоверные различия между средней эмиссией за 403 сут. в зависимости от величины С: N во фракциях опада, рассчитанные по критерию Тьюки ( $P = 0.95$ ).

интенсивно, потери углерода в виде  $CO_2$  составили 1.3–2.0% за 90 сут.

На первый взгляд, результаты экспериментов подтверждают обратную зависимость между интенсивностью минерализации и величиной С: N в опаде: чем меньше значение С: N, тем интенсивней идет минерализация при разложении опада как лиственных, так и хвойных деревьев. Однако включение в общий анализ данных по интенсивности минерализации некротомассы цианобактерий нарушает линейный характер зависимости скорости минерализации от величин С: N в растительном материале. Обладая самым малым значением С: N=9, некротомасса цианобактерий разлагалась медленнее опада листьев с С: N=32 (рис. 2). Как следствие, зависимость минерализации от величины С: N имела нелинейный характер (рис. 3) и описывалась уравнением:

$$y = 1/(a + b \cdot \ln x + c \cdot \ln^3 x), \quad (2)$$

где  $a = 0.249$ ,  $b = -0.107$ ,  $c = 0.00341$  ( $R^2 = 0.981$ ), если потери углерода в виде  $CO_2$  за год выразить как долю  $C_{орг}$  в исходном опаде. При подстановке численных значений параметров уравнение (2) принимает вид:

$$C - CO_2 = 1/(0,249 - 0.107 \cdot \ln(C/N) + 0.00341 \cdot \ln^3(C/N)) \quad (3)$$

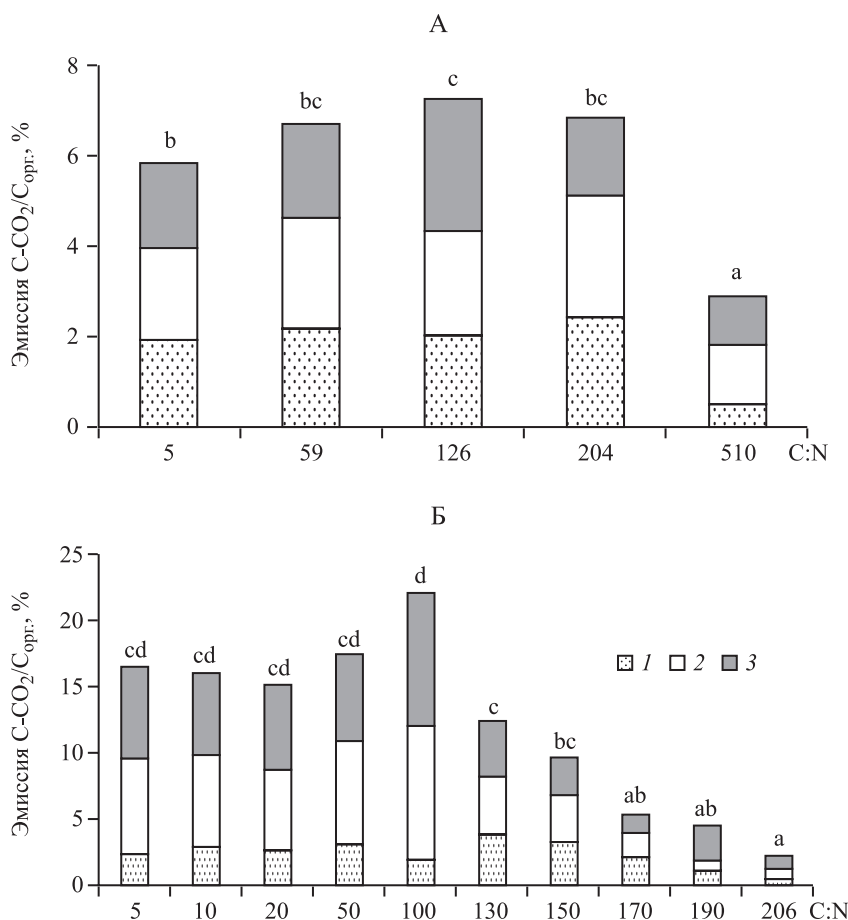
Согласно уравнению (3) максимум эмиссии  $CO_2$  должен наблюдаться при С: N = 22 (рис. 3). Такие величины С: N наблюдаются в травянистых

растениях или сельскохозяйственных культурах, которые не были включены в данный эксперимент.

Предполагаемым недостатком данной зависимости является ограниченная применимость уравнения (3) для медленно разлагающихся КДО. В нашем эксперименте были использованы КДО первой стадии разложения. Известно, что максимальная скорость разложения КДО на ранних стадиях невелика. В дальнейшем она возрастает в несколько раз, достигает максимума на стадии 3 и снова снижается на 4-й и 5-й стадиях разложения (Сафонов и др., 2012). Вероятно, полученную нами зависимость целесообразно использовать для прогнозирования минерализации углерода при известной величине отношения С: N для быстро разлагающихся опадов. Возможность аппроксимации с помощью уравнения (3) минерализации КДО необходимо оценить, включив в исследуемый ряд опадов образцы КДО на разных стадиях разложения валежа.

В целом, полученные результаты согласуются с литературными данными: ежегодный опад лиственных деревьев разлагается быстрее хвойных (Ведрова, 1997, 2008; Preston et al., 2009a). Отличие от закономерностей, приведенных в литературе, отмечено при разложении КДО. В нашем эксперименте скорости минерализации КДО хвойных и лиственных пород были статистически неразличимы.

**Влияние внесения минеральной формы азота на минерализацию опадов.** Внесение азота



**Рис. 2.** Эмиссия С–СО<sub>2</sub> от С<sub>орг.</sub> при разложении КДО сосны (А) и липы (Б) первой стадии разложения без внесения азота и с добавлением минерального азота. Обозначения – см. рис. 1.

стимулировало минерализацию углерода только в бедных азотом опадах: КДО и хвое сосны (рис. 1, В; 2, А и Б). На разложение богатого азотом опада листьев (С: N=32) и цианобактериальной массы (С: N=9) добавление минерального азота оказывало ингибирующее действие (рис. 1, А и Б). Больше всего азот влиял на минерализацию опада с наиболее низким содержанием N – КДО липы и сосны (рис. 2А и Б). Добавление минерального азота к КДО липы, ведущее к снижению величины С: N с 206 до 190 и ниже увеличивало интенсивность минерализации углерода с 2,3% до 10–25% от исходного С<sub>орг.</sub>, т.е. в 5–10 раз. Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными других авторов (Allison et al., 2009), когда обедненные субстраты откликнулись повышением минерализации на внесение небольших доз азота.

Интенсивность минерализации опада коры сосны несущественно повышалась при внесении небольшого количества экзогенного азота, приводящего к снижению величины С: N от 84 до 50 (рис. 1, Г). Но применение высоких доз азота, соответствующих снижению величины С: N до 5,

вело к уменьшению интенсивности минерализации данной фракции опада с 11% до 8%.

При добавлении разных доз минерального азота наиболее сильное воздействие на эмиссию СО<sub>2</sub> при разложении всех фракций опада наблюдалось в первые 12 сут после внесения азота; затем различия между вариантами с разными дозами внесенного азота сглаживались. Различия сохранялись между контрольным вариантом и вариантами с дополнительным внесением азота, независимо от дозы (рис. 1). Направленность влияния минерального азота на минерализацию проявилась в течение первых 90 сут инкубации и до конца эксперимента оставалась неизменной. Влияние минерального азота на интенсивность минерализации уменьшалась в ряду КДО > хвоя > листовенный опад > некромасса цианобактерий > кора.

Изменение показателей интенсивности минерализации опавов для вариантов с добавлением минерального азота плохо аппроксимируется уравнением (3) вследствие противоположно

направленных эффектов и разного влияния внесения азота на разные фракции опада. Как следствие, для прогнозирования влияния экзогенного азота на минерализацию опада для каждой фракции следует проводить аппроксимацию с индивидуально подобранными уравнениями.

Отметим, что даже при небольших дозах минерального азота, снижающих величину  $C:N$  в КДО липы от 206 до 190 и 170, эмиссия  $CO_2$  увеличивалась в два раза. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что увеличение эмиссии  $CO_2$  под действием азота атмосферных выпадений возможно преимущественно вследствие стимулирования минерализации КДО. При организации модельных экспериментов в полевых условиях необходимо в первую очередь оценить влияние экзогенного азота на скорость минерализации валежа.

**Изменение отношения  $C:N$  в процессе разложения опада.** При разложении опадов без внесения азота наблюдалось значительное снижение  $C:N$  для опада листьев (с 31.6 до 20.8), коры сосны (с 84.4 до 66.4) и КДО сосны (с 510 до 287). Для остальных фракций опада изменения  $C:N$  в ходе инкубации были статистически недостоверными (табл. 2).

В естественных условиях разложение лесного опада во времени обычно сопровождается постепенным уменьшением величины  $C:N$  при переходе от поверхностного опада к подстилке и почве (Орлов и др., 1996; Prescott, 2010; Berg, 2014). В отличие от лесной подстилки в природных условиях, в нашем лабораторном эксперименте растворимые соединения азота и углерода не могут мигрировать вниз и вверх по профилю почвы в жидкой фазе или перемещаться животными. Поэтому мы объясняем неизменность значений  $C:N$  пропорциональной эмиссией из наших микрокосмов газообразных соединений азота в процессе денитрификации и углерода в ходе минерализации.

Потери азота при разложении опада, рассчитанные по изменению общего содержания азота в микрокосме в начале и конце опыта, существенно различались в зависимости от фракции опада. В опаде листьев без внесения азота его количество в субстрате микрокосма практически не изменилось, т.е. потери азота были ничтожно малы. При разложении некромассы цианобактерий количество азота уменьшилось на 25%. Бедные азотом опады (хвоя сосны, ветки липы также теряли азот по мере разложения. Потери азота при разложении хвой составили 21%, а при деструкции КДО – 14–25% от исходной величины  $N_{общ}$ .

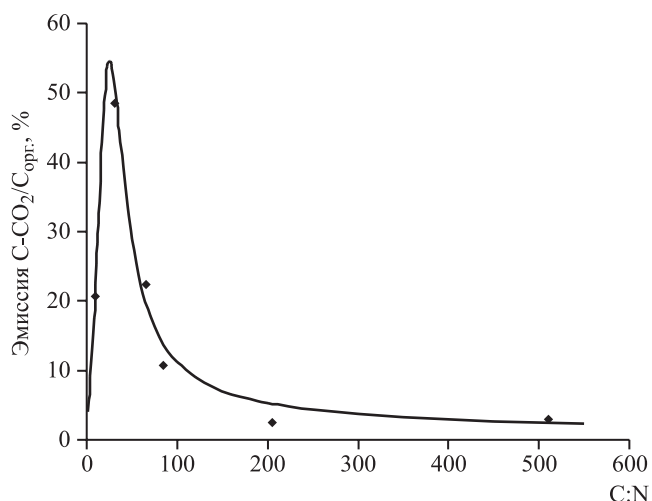


Рис. 3. Результаты аппроксимации кумулятивных потерь углерода в виде  $CO_2$  за год от  $C_{орг.}$  в зависимости от величины  $C:N$  с помощью уравнения (3) для вариантов эксперимента без внесения минерального азота.

Изменение  $C:N$  по окончании инкубации позволяет выяснить причину низкой интенсивности минерализации КДО липы по сравнению с КДО сосны. Известно, что скорость разложения КДО хвойных пород существенно ниже, чем КДО лиственных деревьев (Prestonet al., 2009a). В нашем эксперименте, наоборот, КДО сосны разлагались немного быстрее, чем КДО липы, хотя разница была статистически недостоверной (рис. 2 и 3). Высокая скорость минерализации КДО сосны в наших исследованиях объясняется существенным снижением величины  $C:N$  в процессе разложения. В отличие от КДО сосны, при разложении КДО липы снижения  $C:N$  не происходило. Напротив, величина  $C:N$  несколько увеличилась, хотя повышение было статистически незначимым (табл. 2).

Снижение  $C:N$  в процессе разложения возникает вследствие более высоких потерь углерода по сравнению с потерями азота (Prestonet al., 2009a). Наряду с денитрификацией, процесс фиксации азота контролирует баланс газообразных потерь азота при разложении КДО (Leppänen et al., 2013). Интенсивность азотфиксации регулируется уровнем дефицита азота в разлагающемся субстрате (Умаров и др., 2007), т.е. величиной  $C:N$  в исходных КДО. Учитывая большой дефицит азота в КДО сосны ( $C:N=510$ ) по сравнению с КДО липы ( $C:N=206$ ), интенсивность азотфиксации в ходе разложения КДО сосны, вероятно, была выше, что и привело к снижению значения  $C:N$  почти в 2 раза (табл. 2) и стимулировало разложение КДО сосны до скоростей, наблюдавшихся при разложении КДО липы. Таким образом,

**Таблица 2.** Отношение С: N и индексы гумификации в начале и конце инкубационного эксперимента по разложению лесного опада.

Фракция опада	Вариант	С: N		Алкил: О-алкил		Степень ароматичности	
		0-е сут	403-е сут	0-е сут	403-е сут	0-е сут	403-е сут
Некромасса цианобактерий	Без N	9.2 <sup>b*</sup>	10.0 <sup>b</sup>	0.33	0.28	0.06	0.05
	+ N <sub>мин</sub>	5.0 <sup>a</sup>	5.1 <sup>a</sup>	0.33	0.39	0.06	0.08
Опад листьев липы, осины, березы	Без N	31.6 <sup>c</sup>	20.9 <sup>b</sup>	0.32	0.41	0.13	0.14
	+ N <sub>мин</sub>	5.0 <sup>a</sup>	5.5 <sup>a</sup>	0.32	0.43	0.13	0.13
Хвоя сосны	Без N	66.0 <sup>b</sup>	69.4 <sup>b</sup>	0.29	0.39	0.13	0.13
	+ N <sub>мин</sub>	5.0 <sup>a</sup>	5.9 <sup>a</sup>	0.29	0.88	0.13	0.18
Кора сосны	Без N	84.4 <sup>b</sup>	66.3 <sup>a</sup>	0.23	0.21	0.21	0.20
	+ N <sub>мин</sub>	5.0 <sup>a</sup>	7.8 <sup>a</sup>	0.23	0.28	0.21	0.21
КДО липы	Без N	205.6 <sup>b</sup>	274.0 <sup>bc</sup>	0.04	0.03	0.11	0.11
	+ N <sub>мин</sub>	5.0 <sup>a</sup>	5.5 <sup>a</sup>	0.04	0.05	0.11	0.12
КДО сосны	Без N	510.2 <sup>c</sup>	286.5 <sup>b</sup>	0.02	0.06	0.19	0.22
	+ N <sub>мин</sub>	5.0 <sup>a</sup>	5.9 <sup>a</sup>	—	—	—	—

\* Разные буквенные индексы (a, b, c) обозначают достоверные различия между средними значениями С: N до и после инкубации, оцененные на основании критерия Тьюки (P=0.95) по фракциям опада.

Примечание: N – экзогенный азот, N<sub>мин</sub> минеральный азот, КДО – крупные древесные остатки, “—” – свойство не определяли.

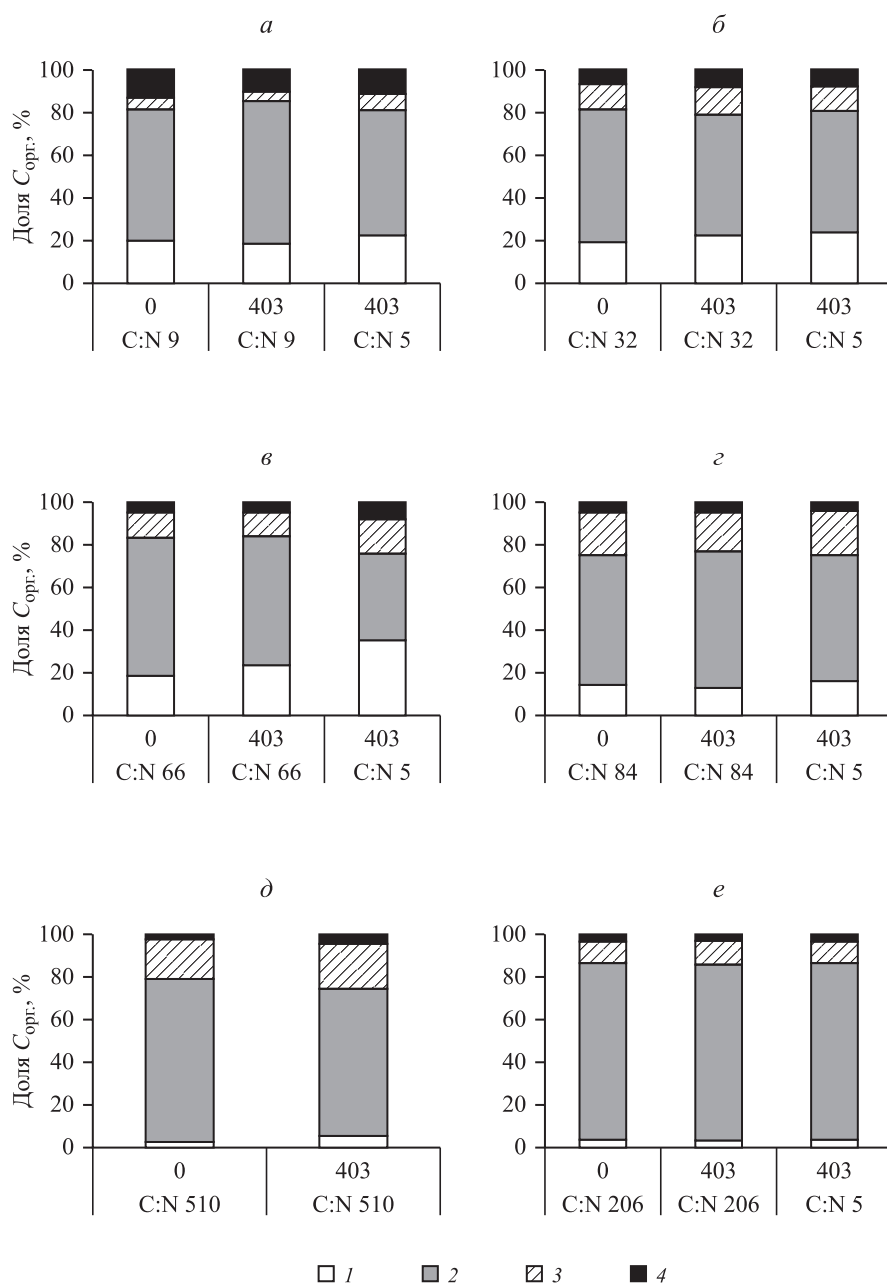
процесс разложения регулируется не только начальной величиной С: N, но и ее изменением во времени. Наиболее важную роль данные изменения играют при минерализации КДО как наиболее медленно разлагающейся фракции опада.

При внесении минерального азота потери этого элемента в ходе инкубирования были значительно выше, чем при разложении опавов, содержащих только эндогенный азот. Потери экзогенного азота составили 41–49% для опада листьев, хвои, КДО, и 32–35% для коры. Таким образом, экзогенный минеральный азот стимулирует микробную активность, способствуют усилению денитрификации при разложении всех фракций опада и увеличивает скорость минерализации углерода в опаде с низким содержанием азота.

**Влияние азота на трансформацию органического вещества опада.** По результатам <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии преобладающим (до 85%) структурным фрагментом органического углерода во всех фракциях опада являются О-алкилы, которые были представлены, в основном, целлюлозой и гемицеллюлозой (рис. 4). При разложении растительных остатков эти компоненты трансформируются в первую очередь.

Содержание устойчивого к разложению лигнина, наряду с отношением С: N, довольно широко используется в качестве предиктора скорости минерализации опада (Александрова, 1980; Kögel-Knabner, 2002; Preston et al., 2009a, b). Содержание лигнина чаще всего определяют как фракцию органического вещества опада, не гидролизующую серной кислотой (Александрова, 1980; Preston et al., 2009a). Помимо ароматических соединений – лигнина и танина, при таком анализе устойчивыми к гидролизу оказываются алифатические липиды, кутин и суберин. Используемый нами анализ <sup>13</sup>C-ЯМР позволяет достаточно четко разделить алифатические и ароматические фрагменты и оценить взаимосвязь между содержанием этих компонентов в исходном органическом веществе опада и скоростью его минерализации. По содержанию наиболее устойчивых к разложению ароматических фрагментов, или арилов, исследуемые фракции опада различаются в 5 раз: минимальная концентрация (4–5%) наблюдалась в некромассе цианобактерий, а максимум (20–22%) обнаружен в коре и КДО сосны (рис. 4, А и Д). Полученные результаты хорошо совпадают с литературными данными (Preston et al., 2009b). Несмотря на отсутствие лигнина, небольшое содержание арилов в цианобактериях Kögel-Knabner, 2002), вероятно, связано с наличием хлорофилла и вторичных метаболитов типа фенольных соединений.





**Рис. 4.** Соотношение структурных фрагментов органического вещества опада до и после инкубации А – некромасса цианобактерий; Б – лиственный опад, В – опад хвои сосны, Г – опад коры сосны, Д – КДО сосны, Е – КДО липы; 1 – алкил, 2 – О-алкил, 3 арил, 4 – карбонил.

Корреляция между содержанием арилов и минерализацией углерода опада оказалась незначительной. В опаде листьев, хвои сосны, КДО липы содержалось примерно одинаковое количество арилов 11–12% (рис. 4, Б, В и Е), однако скорости разложения этих фракций опада различались на порядок (рис. 1, Б и В; 2, Е).

Сведения по содержанию алкилов в опаде растений и некромассе цианобактерий вполне согласуются с опубликованными данными (Kögel-Knabner, 2002). Исследуемые фракции опада

содержат, как правило, не более 5% алкильных групп. Исключение составляет некромасса цианобактерий, где доля алкилов была существенно выше и составила 20%  $C_{орг}$  (рис. 4). В нашем эксперименте связь между скоростью минерализации и первоначальным содержанием алкилов оказалась такой же неустойчивой, как и для арилов. Наименьшее количество алкилов (2–3.5%) содержалось в КДО сосны и липы, которые разлагались медленнее всего. В опаде листьев, хвое сосны, некромассе цианобактерий

содержалось около 20% алкилов, однако листья разлагались в 1.5 раза интенсивнее, чем хвоя и цианобактерии (рис. 1).

Алкилы –  $\text{CH}_2$ - и  $\text{CH}_3$ -группы, входящие в состав жирных кислот, восков, кутина и суберина, являются устойчивыми компонентами органического вещества (Kögel-Knabner, 2002; Ларионова и др., 2015). В отличие от названных соединений алкильные фрагменты белков и многих органических кислот являются неустойчивыми к разложению микроорганизмами (Kögel-Knabner, 2002). Учитывая двойственный характер алкильных групп в формировании устойчивости органического вещества, содержание алкилов вряд ли может быть предиктором скорости минерализации опада.

Сравнение величины  $\text{C}:\text{N}$  и соотношения алкильных,  $\text{O}$ -алкильных и ароматических фрагментов в органическом веществе как предикторов скорости минерализации опада приводит к выводу о предпочтении показателя  $\text{C}:\text{N}$ . Несмотря на нелинейный характер связи между  $\text{C}:\text{N}$  и скоростью минерализации (рис. 3), величина  $\text{C}:\text{N}$  позволяет с высокой вероятностью оценить скорость минерализации опада. Несомненным преимуществом показателя  $\text{C}:\text{N}$  является простота определения по сравнению с анализом структурных фрагментов органического вещества с помощью  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии.

Наряду с содержанием структурных фрагментов органического вещества почвы соотношение между алифатическими и ароматическими фрагментами дает важную информацию о трансформации опада в процессе разложения и гумификации. Основными индексами гумификации опада являются степень ароматичности и отношение “алкил:  $\text{O}$ -алкил” (Ларионова и др., 2015). Последний индекс особенно информативен для лесных почв, поскольку гумификация в них не всегда сопровождается увеличением содержания ароматических фрагментов или степени ароматичности. Основным процессом трансформации органического вещества в лесном опаде считается превращение  $\text{O}$ -алкилов в алкилы, поэтому отношение между этими величинами отражает глубину гумификации (Kögel-Knabner, 2002).

Сравнение отношения “алкил:  $\text{O}$ -алкил” и степени ароматичности в исходных и инкубированных фракциях опада (табл. 2) свидетельствует о незначительном изменении этих индексов при разложении в течение года, что вполне согласуется с литературными данными (Prestonet al., 2009b). Известно, что разложение опада сопровождается не только возрастанием соотношения

“алкил:  $\text{O}$ -алкил”, но и возрастанием количества карбоксилов. При этом содержание ароматических и фенольных компонентов изменяется слабо или не изменяется совсем (Kögel-Knabner, 2002; Preston et al., 2009b). В нашем эксперименте основные изменения структуры по окончании инкубации заключались в увеличении индекса “алкил:  $\text{O}$ -алкил” (табл. 2), тогда как степень ароматичности практически не изменялась. Наиболее существенное повышение индекса “алкил:  $\text{O}$ -алкил” – от 0.3 до 0.4 – наблюдалось при разложении опада листьев и хвои сосны (табл. 2). Внесение азота приводило к увеличению индекса “алкил:  $\text{O}$ -алкил” при разложении всех фракций опада. Наиболее интенсивная трансформация органического вещества при внесении азота наблюдалась при разложении хвои сосны в варианте  $\text{C}:\text{N}=5$ : по окончании инкубирования произошло увеличение и отношения “алкил:  $\text{O}$ -алкил” от 0.29 до 0.88; степени ароматичности от 0.13 до 0.18; содержания карбоксильных групп от 4 до 7% (табл. 2, рис. 4, В). Таким образом, внесение азота не только изменяет скорость минерализации опада, но и стимулирует процесс гумификации.

**Заключение.** Разложение лесного опада, которое определяли по кумулятивной эмиссии  $\text{CO}_2$  в течение длительной инкубации при оптимальных условиях ( $22^\circ\text{C}$  и 70% полной влагоемкости), различалось более чем в 20 раз в зависимости от фракции опада и соотношения в ней  $\text{C}:\text{N}$ . Фракции опада выстроились в следующий ряд по убыванию скорости минерализации: листовая опад > некромасса цианобактерий  $\geq$  опад хвои сосны > опад коры сосны > КДО сосны  $\geq$  КДО липы. За время эксперимента около 50% углерода листового опада минерализовалось до  $\text{CO}_2$ . Опад хвои сосны и некромасса цианобактерий потеряли более 20%, кора сосны – 11%, а КДО сосны и липы – лишь 2.9 и 2.4% углерода от его исходного количества  $\text{C}_{\text{орг}}$ , соответственно.

Скорость разложения в зависимости от величины  $\text{C}:\text{N}$  в лесном опаде в вариантах опыта без добавления азота описывалась логарифмическим уравнением с максимумом при  $\text{C}:\text{N}=22$ . Включение дополнительных вариантов не только лесного, но и лугового опада позволит оценить, насколько универсальна установленная зависимость.

Отношение  $\text{C}:\text{N}$  оказалось более предпочтительным предиктором скорости минерализации опада по сравнению с соотношением устойчивых и лабильных структурных фрагментов органического вещества опада, определяемых с помощью метода твердофазной  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии.

Внесение минерального азота увеличивало в 1.3–10 раз минерализацию бедных азотом фракций опада (С: N>66) и ингибировало выделение CO<sub>2</sub> при разложении опада с высоким содержанием азота (С: N=9–32) в 1.5–1.8 раз. Влияние минерального азота на интенсивность минерализации уменьшалось в ряду: КДО > хвоя > лиственный опад > некромасса цианобактерий > кора.

Добавление даже небольших доз минерального азота к КДО липы приводило к увеличению скорости минерализации углерода в 2–5 раз, а при внесении высоких доз азота минерализация КДО липы и сосны увеличивалась на порядок. Следовательно, среди рассмотренных фракций лесного опада разложение КДО может быть чувствительно к поступлению азота с атмосферными выпадениями.

В процессе разложения всех рассмотренных фракций опада уменьшалось количество О-алкилов и увеличивалось содержание в них алкильных структурных фрагментов в составе органического вещества, что приводило к повышению отношения “алкил: О-алкил”, которое является показателем глубины гумификации опада. Внесение минерального азота привело к более заметному увеличению индекса “алкил: О-алкил”, т.е. стимулировало гумификацию, особенно при разложении хвои сосны.

Таким образом, минеральный азот, поступающий с атмосферными выпадениями и удобрениями, как правило, приводит к увеличению скорости минерализации и изменяет состав продуктов гумификации лесного опада, что необходимо учитывать при оценке экологических последствий индустриальных выбросов соединений азота, использовании удобрений при внедрении интенсивного лесопользования и при моделировании циклов биофильных элементов в лесных экосистемах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Аверкиева И.Ю., Припутина И.В.* Оценка влияния техногенной эмиссии NO<sub>x</sub> на питательный режим лесных биогеоценозов Подмосквы // Вестник Костромского государственного университета им. Н.А. Некрасова. Научно-методический журнал. 2011. 17. Основной выпуск. № 3. С. 51–57.

*Александрова Л.Н.* Органическое вещество почвы и процессы его трансформации. Л.: Наука, 1980. 287 с.

*Ведрова Э.Ф.* Разложение органического вещества лесных подстилок // Почвоведение. 1997. № 2. С. 216–223.

*Ведрова Э.Ф.* Интенсивность деструкции органического вещества серых почв в лесных экосистемах

южной тайги Центральной Сибири // Почвоведение. 2008. № 8. С. 973–982.

*Ларионова А.А., Золотарева Б.Н., Колягин Ю.Г., Квиткина А.К., Каганов В.В., Кудеяров В.Н.* Состав структурных фрагментов и интенсивность минерализации органического вещества в почвах зонального ряда // Почвоведение. 2015. № 10. С. 1232–1241.

Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации за 2013 год. М.: Росгидромет, 2014. 228 с.

*Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Суханова Н.И.* Органическое вещество в почвах России. М.: Наука, 1996. 254 с.

*Пестряков В.К., Ковш Н.В., Попов А.И., Чуков С.Н.* Моделирование трансформации органических веществ в лабораторном эксперименте // Почвоведение. 1990. № 3. С. 30–41.

*Прянишников Д.Н.* Азот в жизни растений и в земледелии СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1945. 200 с.

*10.Сафонов С.С., Карелин Д.В., Грабар В.А., Латышев Б.А., Грабовский В.И., Уварова Н.Е., Замолотчиков Д.Г., Коротков В.Н., Гитарский М.Л.* Эмиссия углерода от разложения валежа в южнотаежном ельнике // Лесоведение. 2012. № 5. С. 44–49.

*Семенов В.М., Иванникова Л.А., Кузнецова Т.В., Семенова Н.А.* Роль растительной биомассы в формировании активного пула органического вещества почвы // Почвоведение. 2004. № 11. С. 1350–1359.

*Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л.* Микробиологическая трансформация азота в почве. М.: ГЕОС, 2007. 137 с.

*Allison S.D., LeBauer D.S., Ofrecio M.R., Reyes R., Ta A.M., Tran T.M.* Lowlevelsofnitrogenadditionstimulatedecomposit ionbyborealforestfungi// SoilBiology & Biochemistry. 2009. V. 41. P. 293–302.

*Berg B.* Decomposition patterns for foliar litter:A theory for influencing factors// Soil Bioljgy & Biochemistry. 2014. V. 78. P. 222–232.

*Carreiro M.M., Sinsabaugh R.L., Repert D.A, Parkhurst D.F.* Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition // Ecology. 2000. V. 81. P. 2359–2365.

*Dijkstra F.A., Hobbie S.E., Knops J.M.H., Reich P.B.* Nitrogen deposition and plant species interact to influence soil carbon stabilization // Ecology letters. 2004. V. 7. P. 1192–1198.

*Gruber N., Galloway N.* An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle// Nature. 2008. V. 451. P. 293–296.

*Hobbie S., Eddy W., Buyarski C., Adair C., Ogdahl M., Weisenhorn P.* Response of decomposing litter and its microbial community to multiple forms of nitrogen enrichment // Ecological monographs. 2012. V. 82. P. 389–405.

*Knorr M., Frey S.D., Curtis P.S.* Nitrogen additions and litter decomposition: a meta-analysis // Ecology. 2005. V. 86. P. 3252–3257.

- Kögel-Knabner I.* The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter // *Soil Biology & Biochemistry*. 2002. V. 34. P. 139–162.
- Leppänen S.M., Salemaa M., Smolander A., Mäkipää R., Tiitola M.* Nitrogen fixation and methanotrophy in forest mosses along a N deposition gradient // *Environmental & Experimental Botany*. 2013. V. 90. P. 62–69.
- Practical handbook of microbiology. Third edition/ Eds E. Goldman, L.H. Green. Boca Raton: CRC Press, 2015. 1055 p.
- Prescott C.* Litter decomposition: what controls it and how can we alter it to sequester more carbon in forest soils // *Biogeochemistry*. 2010. V. 101. P. 133–149.
- Preston C.M., Nault J.R., Trofymov J.A.* and CIDET Working Group Chemical changes during 6 year decomposition of 11 litters in some Canadian forest sites Part 1. Elemental Composition, Tannins, Phenolics, and Proximate Fractions // *Ecosystems*. 2009a.V. 12. P. 1053–1077.
- Preston C.M., Nault J.R., Trofymov J.A.* Chemical Changes During 6 Years of Decomposition of 11 Litters in Some Canadian Forest Sites. Part 2.  $\delta^{13}\text{C}$  Abundance, Solid-State  $\delta^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy and the Meaning of “Lignin”// *Ecosystems*. 2009b.V. 12. P. 1078–1102.
- The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives/ Eds. M.C. Sutton, J.M. Howar et al. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. 412 p.
- Zhang D., Hui D., Luo Y., Zhou G.* Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors // *Journal of Plant Ecology*. 2008. V. 1. P. 85–93.