

Железова Алена Дмитриевна

**Изменение функциональных и структурных характеристик
прокариотного сообщества почв под воздействием гербицида глифосата**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2018 г.

Работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук
Манучарова Наталия Александровна

Официальные оппоненты: **Терехова Лариса Петровна**
доктор биологических наук, профессор,
Научно-исследовательский институт по
изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.
Гаузе, руководитель отдела микробиологии
Васильева Лина Васильевна
доктор биологических наук, старший
научный сотрудник, ФИЦ
«Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, Институт
микробиологии имени С.Н. Виноградского,
лаборатория реликтовых микробных
сообществ
Ермакова Инна Тихоновна
кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник, Институт биохимии и
физиологии микроорганизмов им. Г.К.
Скрябина РАН, лаборатория микробной
энзимологии

Защита диссертации состоится «13» марта 2018 г. в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.03.08 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, дом 1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М-1. Тел: 8(495)-939-54-83, эл.почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д.27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru>.

Автореферат разослан « » февраля 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



к.б.н. Пискункова
Нина Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время наблюдается возрастающее антропогенное воздействие на почву и сопредельные среды, обусловленное интенсификацией сельского хозяйства. Для повышения продуктивности угодий и увеличения экономической выгоды при производстве сельскохозяйственных культур используются органические и минеральные удобрения, химические средства защиты растений и модификация технологий обработки почвы. Сельскохозяйственная деятельность в целом оказывает влияние на физические и химические свойства почвы, что ведет к комплексному воздействию на почвенное микробное сообщество.

Экологические функции микробного сообщества почвы имеют большое значение для производства сельскохозяйственных культур, устойчивости почвы, её плодородия и здоровья. Будучи относительно динамичным компонентом экосистемы, почвенные микроорганизмы участвуют в биогеохимических циклах макро- и микроэлементов, обеспечивают растения доступными элементами минерального питания и защитой от патогенов, осуществляют деградацию ксенобиотиков. Ввиду комплексности почвенной среды, включающей в себя микрзоны с контрастно различающимися условиями, микробное сообщество почвы обладает большим разнообразием и функциональным потенциалом (Звягинцев и др., 2005).

Рост числа пестицидов (препаратов и действующих веществ) является одним из последствий интенсификации сельского хозяйства. В настоящее время количество применяемых препаратов составляет более 100 тыс. наименований, основанных на нескольких сотнях действующих веществ. По данным FAO, около 50 % от применяемых пестицидов составляют гербициды – вещества, предназначенные для контроля сорной растительности. Для многих из них нет сведений об изменениях в результате биотрансформации в почве и дальнейших процессов, происходящих с метаболитами, равно как и об их влиянии на почвенные микроорганизмы. Становится актуальной проблема загрязнения гербицидами почв и сопредельных сред (Villeneuve, Larroudé, Humbert, 2008). В связи с этим проводится поиск способов уменьшения негативных последствий применения гербицидов и ремедиации загрязненных территорий биологическими, физическими и физико-химическими методами (Morillo, Villaverde, 2017).

Одним из наиболее распространенных гербицидов в мире является глифосат. В соответствии с Государственным каталогом пестицидов и агрохимикатов (2017), на территории Российской Федерации зарегистрировано 106 гербицидных препаратов с глифосатом или его солями в качестве действующего вещества. Этот гербицид был разработан компанией Monsanto и широко применялся в течение более чем сорока лет.

Глифосат – (N-(фосфонометил)-глицин) – это высокоэффективный малотоксичный системный гербицид, широко использующийся для контроля сорной растительности и в качестве дефолианта. Механизм гербицидного действия глифосата заключается в ингибировании фермента 5-енолпирувилшिकимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) шикиматного пути биосинтеза

бензоидных ароматических соединений в растениях (Duke, Powles, 2008). При попадании в почву глифосат адсорбируется на минеральной части почвы (глинистые частицы, оксиды алюминия и железа) или на некоторых фракциях гумусовых веществ. Воздействие глифосата на микробное сообщество почвы может быть как стимулирующим, так и подавляющим. С одной стороны, микробное сообщество почвы играет важную роль в разложении глифосата; основной путь деградации этого гербицида в почве – биологический. Биомасса и активность почвенного микробного сообщества являются ключевыми факторами, влияющими на разложение глифосата (Stenrod et al., 2006). Глифосат может быть использован микроорганизмами в качестве питательного субстрата (Panettieri et al., 2013) и как источник фосфора в условиях его недостатка (Hove-Jensen et al., 2014). Деградация гербицида почвенным микробным сообществом в основном осуществляется путем ко-метаболизма и зависит от активности многих микроорганизмов. С другой стороны, выявлена чувствительность некоторых групп микроорганизмов к гербициду. Применение глифосата на посевах генно-модифицированных глифосат-резистентных культур сои и кукурузы привело к уменьшению интенсивности симбиотической азотфиксации (Kremer, Means, 2009). Схожие результаты были получены и другими исследователями (Dos Santos et al., 2005, Bohm et al., 2009; Zobiole et al., 2010, Fan et al., 2017), что позволило создать концепцию негативного влияния глифосата на симбиотических азотфиксаторов.

Применение гербицидов может приводить к изменению состояния микробного сообщества почвы, и, следовательно, вызывать нарушения его нормального функционирования. Однако действующая система проверки пестицидов и агрохимикатов включает ограниченное количество тестов, касающихся воздействия на микробиоту почв. В этих тестах обычно оцениваются лишь общие показатели биологической активности почв: утилизация углеродных субстратов и нитрификация (Jacobsen, Hjelmsø, 2014). Результаты этих тестов не могут в полной мере охарактеризовать воздействие препаратов на минорные компоненты микробного сообщества. Традиционный подход «доза – эффект», используемый в экотоксикологии для изучения эффекта токсикантов на растения и животных, не вполне подходит для характеристики влияния на микробные сообщества почв ввиду комплексности и избыточности пула почвенных микроорганизмов. С одной стороны, даже при значительных структурных изменениях в микробном сообществе будет проявляться его функциональная избыточность, т.е. потери функции не произойдет ввиду высоких темпов адаптации микроорганизмов к нарушениям. С другой стороны, существует вероятность того, что незначительные изменения в структуре или функционировании сообщества могут все же уменьшить способность к дальнейшей адаптации или устойчивость к другим стрессовым воздействиям (Rose et al., 2016).

Таким образом, микробное сообщество почвы может являться как биоиндикатором негативного воздействия токсикантов, так и активным агентом ремедиации почвы. В связи с этим возникает необходимость в подробном изучении изменений свойств микробных сообществ почв в результате

применения гербицидов и других сельскохозяйственных воздействий, а также в поиске способов восстановления исходных характеристик почвы.

Цели и задачи

Целью работы являлась характеристика изменений в структуре и функционировании прокариотного сообщества дерново-подзолистой почвы при краткосрочном и длительном воздействии гербицида глифосата.

Были поставлены следующие задачи:

- Оценка структурных и функциональных изменений прокариотного сообщества почвы и его метаболически активной части, происходящих при внесении глифосата в почву в эксперименте с микрокосмами
- Сравнение структуры и активности прокариотных сообществ почв, подвергшихся длительному воздействию глифосата, и ненарушенных прокариотных сообществ
- Оценка деградации глифосата в почве

Научная новизна

В настоящей работе впервые было изучено влияние глифосата на метаболически активную часть прокариотного сообщества агротрансформированных дерново-подзолистых почв. Сделан сравнительный анализ структуры и функционирования прокариотного сообщества в лабораторных условиях в опыте с сукцессиями. Проведено биологическое тестирование прокариотного сообщества почв методами люминесцентной микроскопии, FISH и мультисубстратного тестирования, что позволило выявить чувствительные и устойчивые к воздействию глифосата филогенетические и функциональные группы прокариот. Был проведен поиск факторов, влияющих на деградацию глифосата, и изучен способ восстановления исходных микробиологических параметров почвы с помощью внесения биочара.

Практическая значимость

Полученные результаты характеризуют состояние как ненарушенного, так и измененного вследствие применения глифосата микробного сообщества почвы, углубляют представления о воздействии ксенобиотиков на метаболически активную часть прокариотного сообщества дерново-подзолистой почвы, свидетельствуют об изменении его функциональных характеристик.

Изучение реакции микробного сообщества на применение гербицида способствует выявлению диагностических признаков, характеризующих устойчивость прокариотного сообщества к антропогенным воздействиям, и является значимым вкладом в оценку экологических последствий применения глифосата. Материалы исследования могут быть использованы для разработки новых методов почвенно-микробиологического мониторинга для биотестирования гербицидов.

Личный вклад автора

Работа является результатом оригинальных исследований. Автором была выбрана тема исследования, на разных этапах работа проведена автором самостоятельно: выбор пробных площадей, отбор проб, проведение анализов в лабораторных условиях, математическая обработка и интерпретация результатов. Доля личного участия в совместных публикациях пропорциональна числу соавторов.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014; 2015), на 18ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2014), на Международной научной конференции «XVII Докучаевские молодежные чтения» (Санкт-Петербург, 2014), на конференции «Workshop on pesticide fate in soil and water in the northern zone» (Uppsala, Sweden, 2016).

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в базы данных Web of Science и RSCI.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, объекты и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает 186 источников. Работа изложена на 111 страницах, содержит 37 рисунков и 10 таблиц.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования были взяты образцы почвы в двух регионах (Москва, Россия; Уппсала, Швеция). Изученные почвы различались по генезису и по истории применения гербицида глифосата.

Отбор образцов почвы проводили в июне, августе и ноябре 2013 года на территории полигона Центра точного земледелия РГАУ – МСХА имени К.А.Тимирязева (далее – ЦТЗ РГАУ–МСХА), где заложен полевой научно-производственный опыт для сравнения традиционного и точного земледелия, а также классической и ресурсосберегающей технологии производства (Железова и др., 2017). Почва была определена как агротрансформированная дерново-подзолистая среднесуглинистая на неоднородной почвообразующей породе с включениями тяжелосуглинистого материала и опесчаненными линзами (Железова и др., 2017; Хитров, 2012).

Образцы были взяты в разные сроки с глубины 0-10 см в двукратной повторности по схеме, представленной на Рисунке 1. После отбора почва была высушена до воздушно-сухого состояния и гомогенизирована.

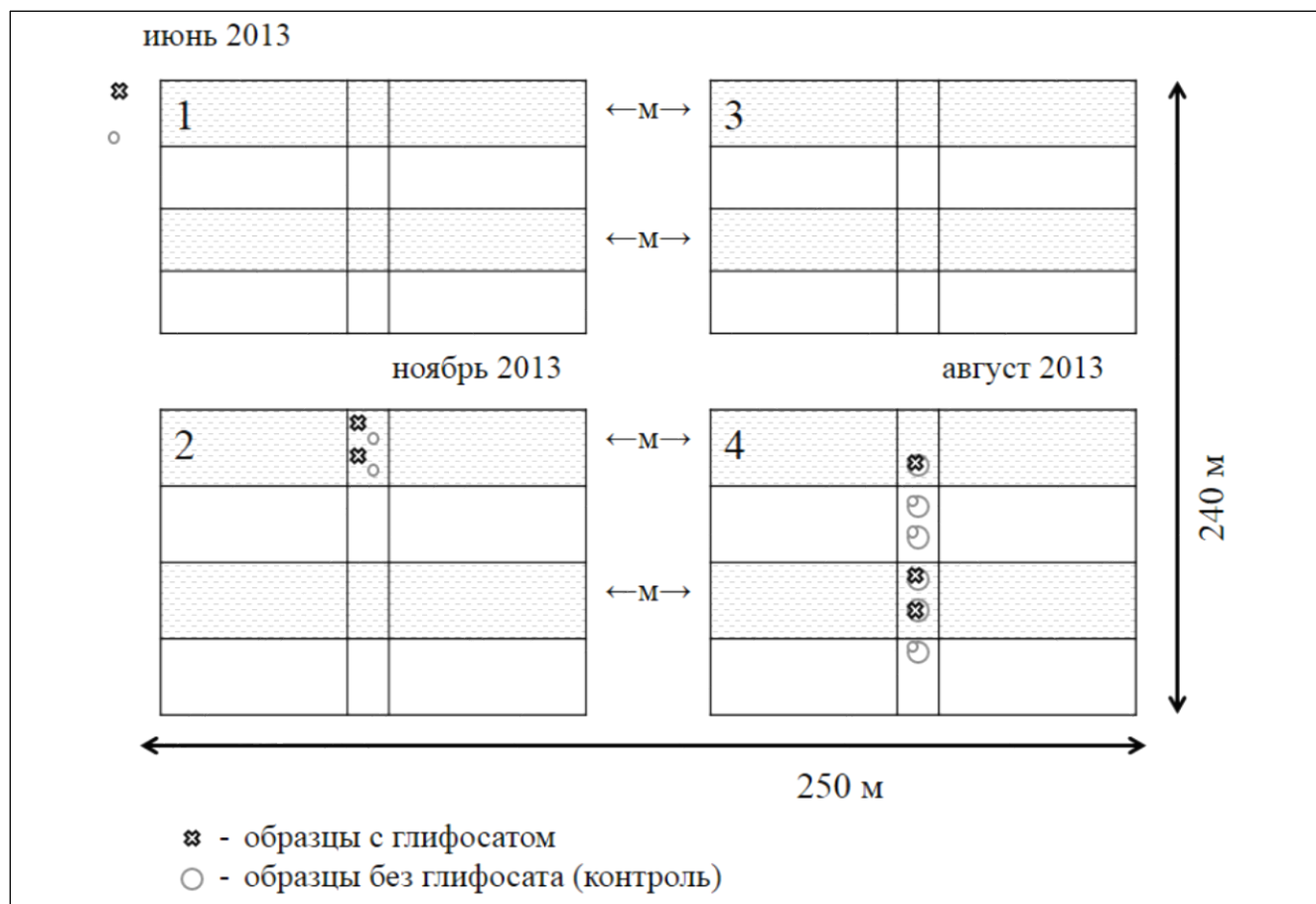


Рисунок 1. Схема проботбора на полигоне Центра точного земледелия РГАУ-МСХА. Серой штриховкой и буквой «м» обозначены участки с ресурсосберегающей технологией обработки почв (минимальная обработка)

Для исследования краткосрочного воздействия глифосата на почвенное микробное сообщество в полевых условиях образцы были взяты в августе 2013 года на поле ЦТЗ-4 с полос под минимальной обработкой. Отбор образцов

проводили после уборки вико-овсяной смеси в 2 срока: непосредственно перед обработкой глифосатом и после обработки (доза - 2 кг/га).

Для изучения длительного воздействия гербицида на микробное сообщество отбор образцов был проведен в ноябре на поле ЦТЗ-2 через 3 недели после предпосевной обработки почв глифосатом (2 кг/га) и в июне на поле ЦТЗ-1 спустя 7 месяцев после обработки. В качестве контрольных были взяты необработанные гербицидом образцы. На поле ЦТЗ-1 отбор проб был проведен в двух близко расположенных местах: 1) край поля, не подвергавшийся предпосевной обработке глифосатом; 2) участок на обочине поля, где произошла утечка гербицида при начале предпосевной обработки и превышение в два раза нормальной полевой дозы внесения.

Отбор образцов для изучения деградации глифосата в почве производили на поле у населенного пункта Лэнна (59°52'N, 17°58'E, Уппсала, Швеция) в сентябре 2015го года. Почва охарактеризована как слаборазвитая почва (Cambisol), почвообразующей породой являются озёрные отложения времен плейстоцена. Две части вспахиваемого поля различаются по проценту органического вещества: исторически обогащенная биочаром часть и фоновая часть. В почву в течение 20 лет вносился древесный уголь (продукт пиролиза биомассы, аналогичный биочару), который является отходом производства железной руды. Из-за долгосрочного внесения древесного угля обогащенная им почва характеризуется более низкой объемной плотностью, более высокими потерями при прокаливании и водоудерживающей способностью.

Образцы почвы из верхнего слоя (5-15 см) отбирали в 5 точках. После просеивания фракцию с диаметром < 2 мм гомогенизировали и хранили при -20 °С в полиэтиленовых пакетах до начала эксперимента.

Было изучено кратковременное и длительное влияние гербицида на микробное сообщество при обработке почвы глифосатом в полевых условиях и при его лабораторном внесении, а также его деградация в почве. Были исследованы образцы, отобранные после обработки гербицидом в полевых условиях (доза внесения – 2 кг/га) и образцы почвы после внесения глифосата в лабораторных условиях (в концентрации 10 ПДК, 5 мкг/кг почвы) в опыте в микрокосмах.

Оценка структурных изменений микробного сообщества почвы под воздействием глифосата проводилась с использованием методов люминесцентной микроскопии, метода FISH (fluorescence *in situ* hybridization) и ПЦР в реальном времени. Функциональные характеристики микробного сообщества оценивали с помощью методов газовой хроматографии и мультисубстратного тестирования. Деградация глифосата в почвах была оценена по остаточной концентрации гербицида и его метаболита АМФК (аминометилфосфоновой кислоты) в лабораторном эксперименте.

Дизайн экспериментов представлен в Таблице 1.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью встроенного статистического пакета Excel (MS Office 2007) и в программе STATISTICA 10.0.

Таблица 1. Дизайн экспериментов

№	Исследованные почвы, время пробоотбора	Характеристика образцов	Задача эксперимента	Методы
1	ЦТЗ -1: - смешанный образец с угла поля 1	- 7 месяцев после внесения глифосата	Оценить отличия в структуре и активности прокариотного сообщества почвы после длительного срока с момента применения глифосата и ненарушенного прокариотного сообщества	Сукцессия в микрокосмах (30 суток): - измерение эмиссии CO ₂ - общая численность бактерий (люминесцентная микроскопия) - численность отдельных филогенетических групп бактерий и архей (FISH) Мультисубстратное тестирование исходных образцов
	- смешанный образец с края поля 1 06.2013	- нет истории внесения глифосата		
	ЦТЗ -2: - смешанные образцы с 2х точек без обработки глифосатом, 2 - обработаны глифосатом 11.2013	- 3 недели после внесения глифосата (2 кг/га)		
2	ЦТЗ -3: - образцы до и после обработки глифосатом под минимальной обработкой 08.2013	- 4 дня после внесения гербицида (2 кг/га)	Проследить структурные и функциональные изменения прокариотного сообщества почвы, происходящие при краткосрочном воздействии глифосата	Сукцессия в микрокосмах (30 суток): - измерение эмиссии CO ₂ - общая численность бактерий (люминесцентная микроскопия) Мультисубстратное тестирование после инициирования микробной сукцессии (7 сутки)
	- образцы, отобранные в те же сроки под вспашкой	- гербицид не применяли		
3	Лэнна, Швеция: - образцы с 2х частей поля 09.2015	- различная способность к сорбции глифосата	Оценить скорость разложения глифосата в почве и влияющие на неё параметры	Сукцессия деградации гербицида 30 суток, оценка остаточной концентрации
4	ЦТЗ: - то же, что в эксперименте 2 Лэнна: - то же, что и в эксперименте 3	- различный генезис и свойства исследуемых почв	Сравнить структурные изменения в прокариотных сообществах исследуемых почв, происходящие при лабораторном внесении глифосата	Сукцессия в микрокосмах (7-е сутки): - общая численность бактерий (люминесцентная микроскопия, ПЦР) - численность отдельных филогенетических групп бактерий и архей (FISH)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент 1 – изменения в структуре и функциях прокариотного сообщества почвы при длительном воздействии глифосата.

Была проведена оценка численности метаболически активных представителей разных филогенетических групп доменов *Bacteria* и *Archaea* в почвенных образцах, отобранных на поле ЦТЗ-1 в июне 2013 г. через 7 месяцев после внесения. Были взяты 2 смешанных образца почвы: с края поля, не подвергавшегося предпосевной обработке гербицидом глифосатом (далее «контроль», фоновая почва), и с участка, где произошла утечка гербицида при начале предпосевной обработки и превышение нормальной полевой дозы внесения (далее «опыт»). Сравнительный анализ данных, полученных для образцов с двух площадок пробоотбора, показал изменения в составе метаболически активной части прокариотного комплекса после 7 месяцев с момента внесения гербицида.

Общая численность бактерий значимо не различалась для двух образцов и составляла $1,56 - 1,95 \times 10^9$ клеток/г почвы (Рисунок 2 А). Численность метаболически активных представителей домена *Bacteria* составляла $0,99 \times 10^9$ и $1,06 \times 10^9$ клеток/г почвы в контрольном и опытном варианте, соответственно. Однако нами было выявлено достоверное снижение численности метаболически активных представителей домена *Archaea* в почве после внесения глифосата ($9,2 \times 10^7$ и $4,6 \times 10^7$ клеток/г почвы для вариантов контроль и опыт, соответственно) (Рисунок 2 Б).

Была оценена численность отдельных филогенетических групп домена *Bacteria*. В изученных образцах доминировали представители филогенетической группы *Gammaproteobacteria* ($2,7 - 3 \times 10^8$ клеток/г почвы). Наблюдалось достоверное увеличение численности представителей филума *Actinobacteria* ($7,05 \times 10^7$ и $1,98 \times 10^8$ клеток/г почвы), а также снижение численности представителей филума *Acidobacteria* ($1,03 \times 10^8$ и $5,14 \times 10^7$ клеток/г почвы) на площадке «опыт» (Рисунок 2 В).

Было проведено исследование сукцессий микробного сообщества почвы, инициированных увлажнением и внесением глифосата. Сравнились сукцессии «контроль» и «глифосат» в двух почвах (после длительного воздействия глифосата – «о» и фоновая почва – «к»). Статистически достоверные различия в дыхательной активности наблюдались между сукцессиями «контроль» и «глифосат» для почвы «опыт» (Рисунок 3). Выявлена стимуляция дыхательной активности до 5,45 и 9,74 мкмоль $\text{CO}_2/\text{мл}$ в 1 и 7е сутки при повторном лабораторном внесении глифосата. Это может свидетельствовать об адаптации микробного сообщества в результате длительного воздействия гербицида и о развитии отдельных функциональных групп прокариот, способных к его разложению.

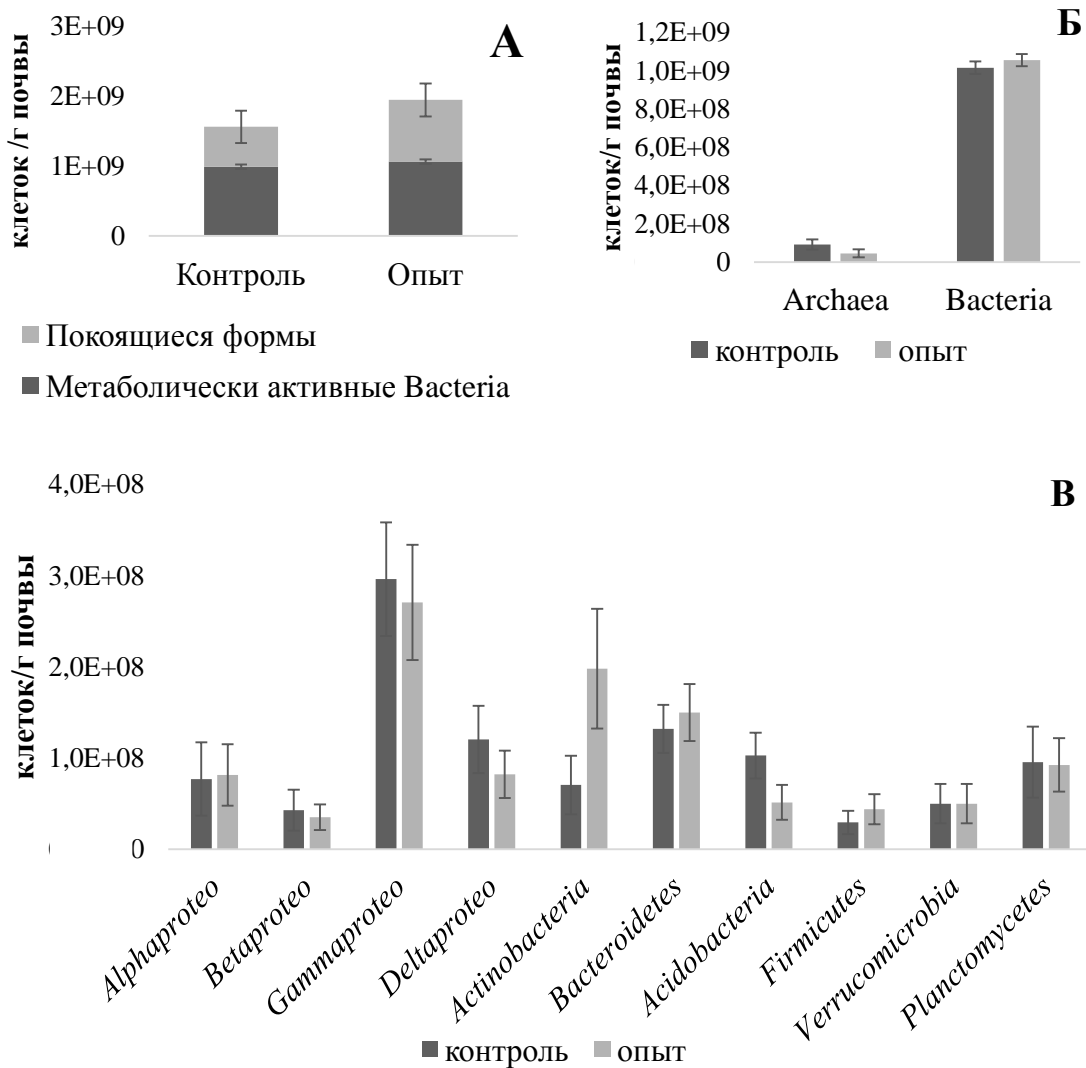


Рисунок 2. А - соотношение метаболически активных и покоящихся форм бактерий в почве; Б - численность метаболически активных представителей доменов Archaea и Bacteria; В - численность метаболически активных представителей отдельных филогенетических групп домена Bacteria

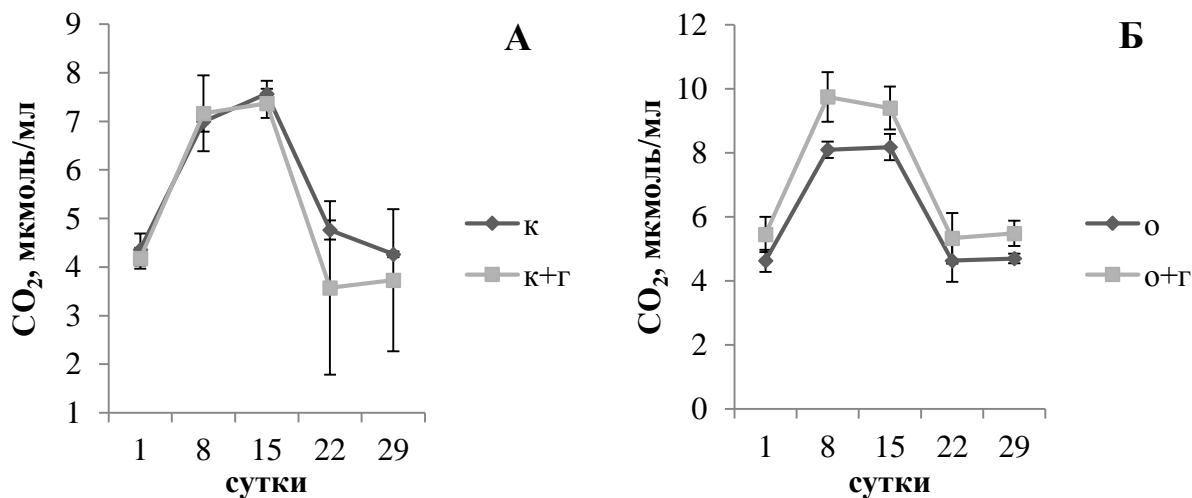


Рисунок 3. Динамика эмиссии CO₂ в сукцессии с фоновой почвой (А) и с почвой с длительным воздействием глифосата (Б)

Для выявления изменений в функционировании микробного сообщества при длительном воздействии глифосата было проведено мультисубстратное тестирование образцов фоновой почвы и почвы, подверженной воздействию гербицида в течение 7 месяцев, а также 4х образцов почв с поля ЦТЗ-2 (обработанных глифосатом и необработанных, отбор образцов был произведен через 3 недели после обработки).

По результатам мультисубстратного тестирования были определены коэффициенты, описывающие функционирование микробного сообщества исследованных почв. Наиболее информативными коэффициентами являлись d (характеристика устойчивости микробного сообщества), W (метаболическая работа) и N (описывает функциональное разнообразие). Уменьшение коэффициента d и увеличение коэффициента W наблюдалось в почвах с внесением глифосата по сравнению с почвами без гербицида. Показатель функционального разнообразия варьировал в пределах 26-32 для всех почв (Таблица 2).

Кластерный анализ методом Варда с определением Евклидовых расстояний был проведен для совокупности значений оптической плотности, характеризующей потребление разных субстратов, а также для коэффициентов W (метаболическая работа), N (функциональное разнообразие), d (устойчивость сообщества). В массиве данных, включающем образцы, отобранные в разные сроки, было выделено 2 кластера (Рисунок 4). Один из них был сформирован из группы образцов с глифосатом, а другой – из не подвергавшихся внесению гербицида образцов. Это свидетельствует о сходстве функциональных потенциалов микробных сообществ почв, подвергшихся обработке глифосатом, через 3 недели и через 7 месяцев после обработки.

Для оценки разницы в интенсивности потребления разных субстратов микробными сообществами в контрольных почвах и в почвах с внесением глифосата был применен t -тест (двухвыборочный t -критерий независимых выборок). Выявленные различия учитывались при достаточно высоком уровне использования субстрата, т.е. при значениях оптической плотности более 300. Обнаружено, что интенсивность потребления некоторых сахаров (рамнозы, маннитозы, сахарозы) статистически достоверно увеличивалась в исследованных почвах при длительном воздействии гербицида, в то время для некоторых солей органических кислот (цитрат, октаноат) и некоторых полимерных соединений (крахмал, твин-80) наблюдалась обратная тенденция. Воздействие глифосата на интенсивность потребления азотсодержащих соединений также было различным: уменьшалось использование пролина и тимидина, увеличивалось использование гистидина и аспарагина. Не было выявлено эффекта длительного воздействия глифосата на интенсивность потребления спиртов.

Таблица 2. Функциональные характеристики микробных сообществ исследованных почв: устойчивость (d), функциональное разнообразие (N) и метаболическая работа (W)

Время отбора образцов	Место отбора (номер полосы)	Внесение глифосата	d	N	W
ноябрь 2013 (3 недели после применения глифосата)	40	-	0,91	32	1349
	39	+	0,49	26	1561
	44	-	0,51	29	1666
	43	+	0,48	31	1616
июнь 2013 (7 месяцев)	Край поля	-	0,19	29	1825
	Край поля	+	0,07	25	2079

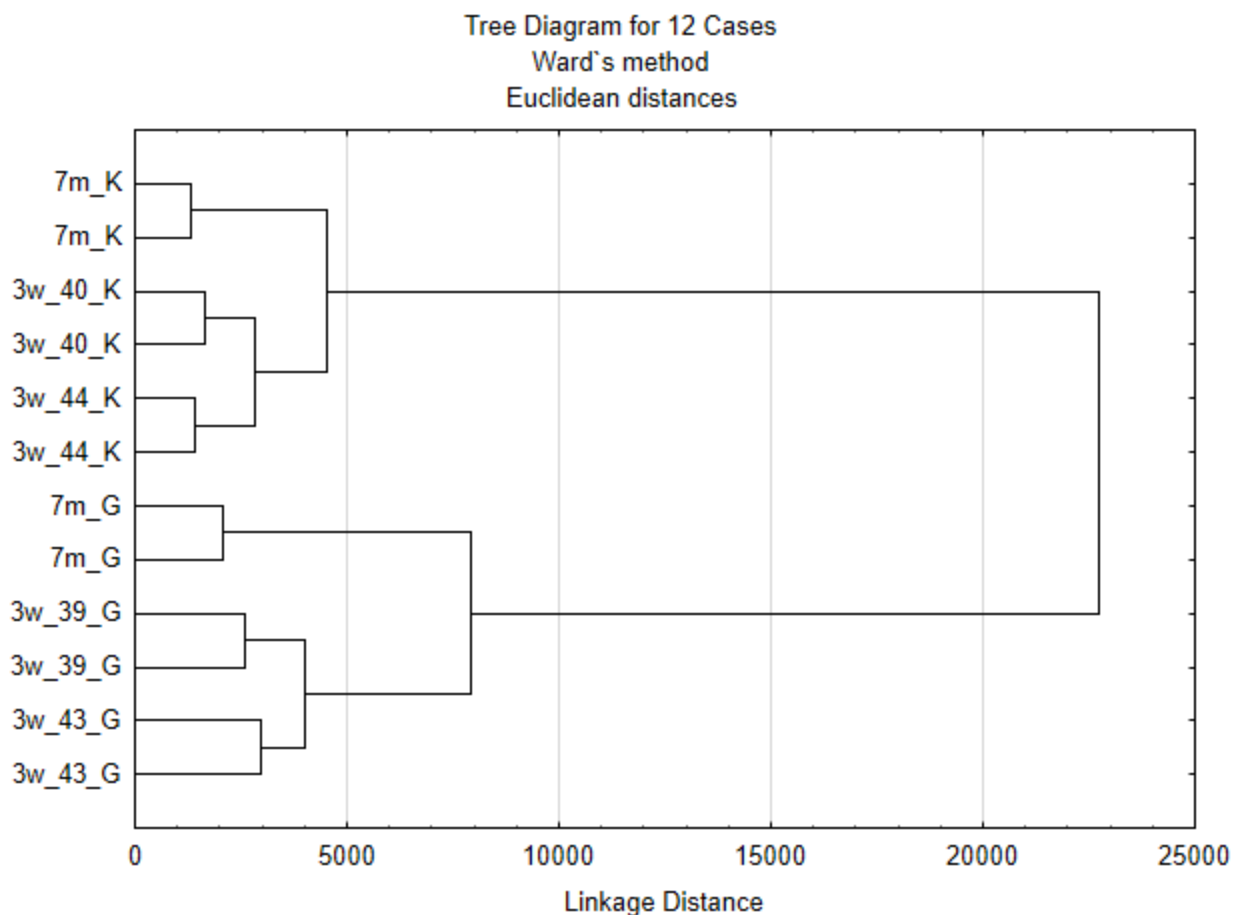


Рисунок 4. Результат кластерного анализа спектра потребляемых субстратов, эксперимент 1. 3w – отбор образцов через 3 недели после внесения глифосата, 7m – через 7 месяцев, номер обозначает полосу отбора образца, К – (контроль) – без внесения глифосата, G – образцы с глифосатом

Эксперимент 2 – краткосрочный эффект внесения глифосата на прокариотное сообщество почв, находящихся под разными типами сельскохозяйственного воздействия

Для оценки краткосрочного эффекта внесения глифосата в полевых и в лабораторных условиях были взяты образцы, отобранные в августе 2013го года после уборки урожая с поля ЦТЗ-4 в 2 срока: до послеуборочного применения гербицида на полосах под минимальной обработкой (40, 22, 17) и через 4 дня после применения глифосата (доза – 2 кг/га). В то же время были взяты образцы на полосах под вспашкой (№№ 10, 30, 35), где глифосат не применяли. Было проведено сравнение микробиологических показателей, определенных для разных образцов, а также изучены сукцессии в микрокосмах, инициированные лабораторным внесением глифосата.

Общая численность прокариот составляла $1,2 - 1,5 \times 10^9$ клеток/грамм почвы на участках под минимальной обработкой до применения глифосата и $1,02 - 1,7 \times 10^9$ клеток/грамм почвы после применения (Рисунок 5 А). Не было выявлено значимого изменения общей численности прокариот, связанного с применением гербицида. Общая численность прокариот на участках под вспашкой, где гербицид не применяли, также была определена для тех же сроков отбора образцов для характеристики вариации численности по времени и составляла от $0,9 \times 10^9$ до $1,3 \times 10^9$ клеток/грамм почвы (Рисунок 5 Б). В целом выявлена более высокая численность прокариотной составляющей микробного сообщества в почве под минимальной обработкой.

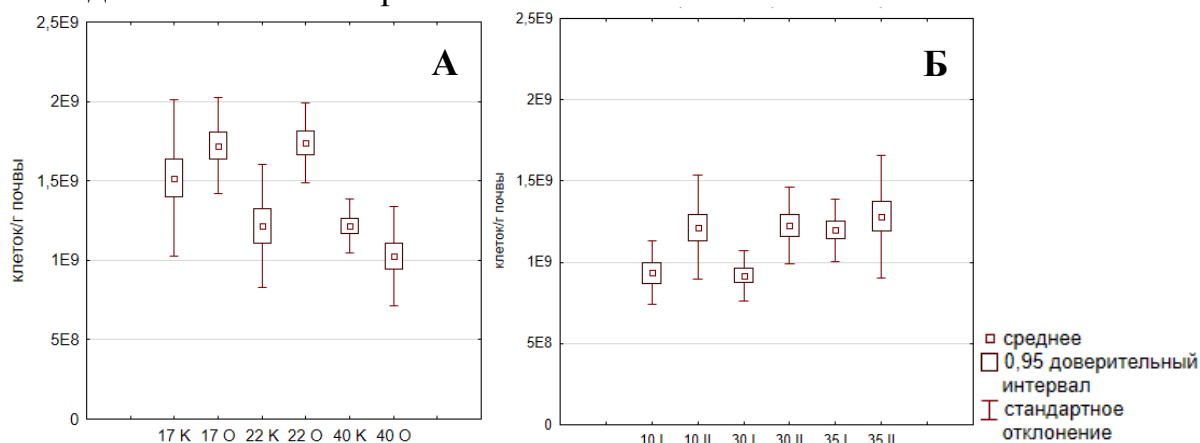


Рисунок 5. А - общая численность прокариот до (К) и после (О) послеуборочного применения глифосата на участках под минимальной обработкой; Б - общая численность прокариот на участках под вспашкой (I, II обозначают разные сроки отбора образцов)

Был поставлен сукцессионный эксперимент в микрокосмах. Для изучения эффекта полевого внесения гербицида на эмиссию CO_2 были взяты почвы с полос под минимальной обработкой (№№ 17, 22, 40), отобранные в 2 срока (до и после обработки глифосатом). Для оценки влияния лабораторного внесения глифосата с образцами всех почв были инициированы два типа сукцессии: «контроль» (только увлажнение) и «глифосат» (увлажнение и добавление глифосата в дозе, соответствующей 10 ПДК).

Эмиссия CO₂ варьировала в пределах 2-7 мкмоль CO₂/сутки для образцов почв под минимальной обработкой. Не было выявлено существенных различий между динамикой сукцессий типов "контроль" и "глифосат" для образцов с разными сроками пробоотбора. В некоторых образцах повторное внесение глифосата стимулировало эмиссию CO₂ в 1-е и 7-е сутки. В образцах 10, 30 и 35, отобранных с полос под вспашкой, не было выявлено стимуляции эмиссии CO₂ после внесения глифосата. Стоит отметить, что эмиссия CO₂ была выше в образцах почвы под минимальной обработкой по сравнению со вспашкой.

Методом мультисубстратного тестирования было выявлено негативное воздействие глифосата на микробное сообщество почвы с полос 17 и 40, находящихся под минимальной обработкой, которое проявлялось и при полевом, и при лабораторном внесении. В двух изученных повторностях (2 полосы) происходило снижение коэффициента W, характеризующего метаболическую работу, а также увеличение коэффициента d, говорящее о дестабилизации сообщества. Не было выявлено чёткого паттерна в изменении коэффициента функционального биоразнообразия N (Таблица 3).

Напротив, в образцах с полос 10 и 30, находящихся под вспашкой, глифосат при лабораторном внесении приводил к уменьшению коэффициента d, и, следовательно, увеличению стабильности микробного сообщества почвы. Следует отметить, что различия в изученных показателях между образцами, отобранными с полос под вспашкой, были более значительными по сравнению с образцами, отобранными с полос под минимальной обработкой.

Таблица 3. Функциональные характеристики микробного сообщества почв: устойчивость (d), функциональное разнообразие (N), метаболическая работа (W)

Номер полосы	Тип с/х обработки	Время отбора	Глифосат		d	N	W
			Полевая обработка	Лабораторное внесение			
10	вспашка	16.08.13	-	-	1,072	26	1528
10	вспашка	16.08.13	-	+	0,34	34	2043
10	вспашка	27.08.13	-	-	1,817	16	1298
10	вспашка	27.08.13	-	+	0,219	31	1963
17	минимальная	16.08.13	-	-	0,897	19	1535
17	минимальная	16.08.13	-	+	1,208	16	1402
17	минимальная	27.08.13	+	-	0,745	24	1479
17	минимальная	27.08.13	+	+	1,518	21	1421
30	вспашка	16.08.13	-	-	2,226	13	1254
30	вспашка	16.08.13	-	+	1,567	22	1575
30	вспашка	27.08.13	-	-	2,161	19	1382
30	вспашка	27.08.13	-	+	1,556	9	1191
40	минимальная	16.08.13	-	-	1	24	1487
40	минимальная	16.08.13	-	+	1,281	17	1466
40	минимальная	27.08.13	+	-	0,873	27	2034
40	минимальная	27.08.13	+	+	1,654	17	1467

Эксперимент 3 – исследование скорости разложения глифосата в зависимости от сорбционных характеристик почв

Деградация гербицида была изучена для почв, отобранных в Швеции: LC (фоновая) и LB (исторически обогащенная биочаром). Для исследования влияния биочара на скорость дегградации гербицида биочар был добавлен в фоновую почву в количестве от 1 до 30% от общей сухой массы. Дегградация гербицида была оценена в лабораторных условиях.

Также была проведена количественная характеристика адсорбции глифосата в исследованных вариантах. Адсорбция является важным фактором, влияющим на биодоступность гербицидов для растений и микроорганизмов, и, следовательно, на скорость их разложения. Выявлена высокая адсорбционная способность фоновой почвы LC по отношению к глифосату. В почве LB коэффициент адсорбции K_F (константа Фрейндлиха) был снижен (Таблица 4).

В исследованных почвах наблюдалась разница в скорости дегградации глифосата. Значительное снижение количества глифосата и увеличение количества АМФК (аминометилфосфоновой кислоты) наблюдалось во время эксперимента по дегградации в почве LB. В фоновой почве LC количество глифосата также уменьшалось параллельно с образованием АМФК. Дегградация глифосата была несколько медленнее в почве LC с добавлением биочара, формирование АМФК было обнаружено только при 1 и 10% биочара.

В почвах LB и LC с разным количеством добавленного биочара за всю продолжительность эксперимента дегградировало от 10 до 70% добавленного глифосата. Период полуразложения глифосата в почве LC варьировал от 51 до 187 дней. Самый короткий период полуразложения глифосата (17 дней) наблюдался в почве LB (Таблица 4).

Не было выявлено корреляций между периодом полуразложения глифосата и количеством добавленного биочара. Однако период полуразложения коррелировал со значением K_F для глифосата в образцах почвы LB и LC с разным количеством добавленного биочара (Рисунок 6).

Таблица 4. Коэффициенты адсорбции (a) и периоды полуразложения (b) глифосата в изученных почвах (LB, LC и LC с добавлением биочара (в процентах)). K_F - константа Фрейндлиха, $1/n$ – характеристика степени приближения изотермы адсорбции к прямой, R^2 – величина достоверности аппроксимации

	K_F^a	$1/n$	R^2	$T^{1/2}b$	R^2
LB	129,42	0,8717	0,99	17	0.97
LC	1217,87	0,8418	0,99	87	0.606
LC+1%	1892,34	0,8715	0,99	187	0.333
LC+10%	1294,20	0,806	0,99	151	0.385
LC+20%	1101,54	0,7962	0,99	131	0.402
LC+30%	1099,01	0,7801	0,98	51	0.945

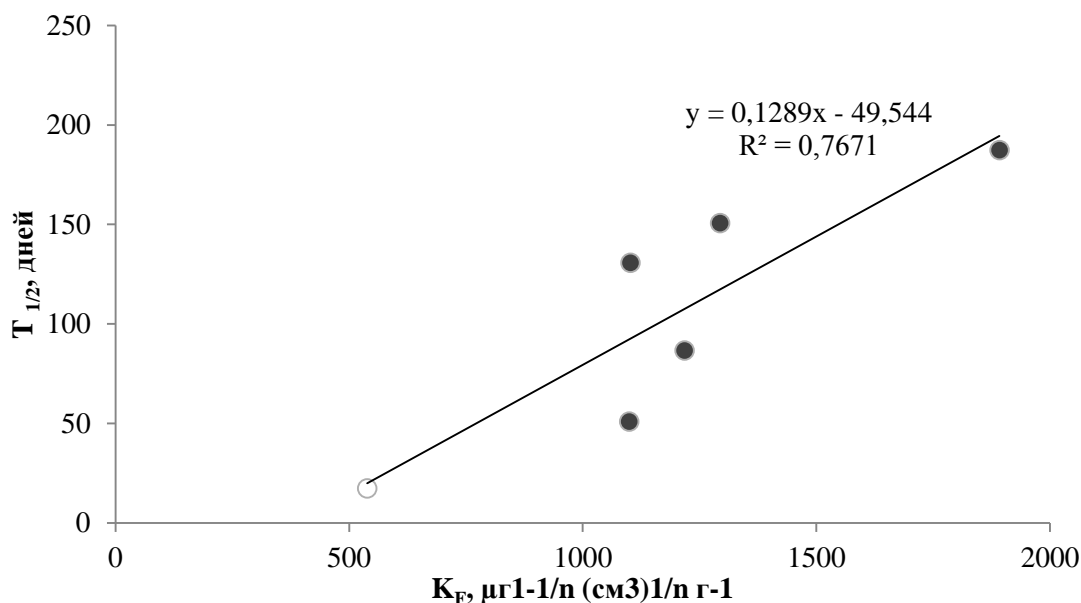


Рисунок 6. Зависимость периода полуразложения глифосата от K_F (константы Френдлиха), характеризующей адсорбцию глифосата для почвы LB (обозначена белым) и почвы LC с разным количеством добавленного биочара (обозначены серым)

Эксперимент 4 – изучение влияния лабораторного внесения гербицида на прокариотное сообщество почв разного генезиса

Был поставлен лабораторный эксперимент с инициированными сукцессиями в микрокосмах. Для опыта были выбраны 4 образца почв: 2 образца агротрансформированной дерново-подзолистой почвы, отобранных под вспашкой (образец 30) и под минимальной обработкой (образец 17) (поля ЦТЗ РГАУ – МСХА, Москва), и 2 образца слаборазвитой почвы (Уппсала, Швеция), фоновой (далее LC) и обогащённой биочаром (далее LB). Для микрокосмов была взята навеска 5 г из каждого предварительно гомогенизированного образца. Были запущены сукцессии «контроль» (увлажнение) и «глифосат» (увлажнение и внесение глифосата в количестве, соответствующем 10 ПДК). После 7 дней почва из микрокосма была использована для проведения анализа структуры прокариотного комплекса.

Было выявлено уменьшение общей численности бактерий в образцах LC и LB на 7ой день сукцессии после добавления глифосата по сравнению с контрольной ($6,1 \times 10^9$ и $5,4 \times 10^9$ клеток/г почвы и $3,9 \times 10^9$ и $2,5 \times 10^9$ клеток/г почвы, соответственно). Однако в образцах дерново-подзолистой почвы подобного тренда не наблюдалось, численность бактерий во всех микрокосмах сохранялась в пределах $1,0 - 1,7 \times 10^9$ клеток/г почвы.

Также было оценено количество копий генов бактериальной 16S рРНК на грамм почвы на 7ой день сукцессии, инициированной увлажнением (К) или увлажнением и внесением глифосата (G). Выявлено, что в верхних горизонтах дерново-подзолистой почвы количество копий генов бактериальной 16s рРНК составляло от $3,9 \times 10^9$ до $7,7 \times 10^9$ на 1 грамм почвы, а для слаборазвитой почвы этот показатель был несколько выше (от $5,8 \times 10^9$ до $8,1 \times 10^9$ копий гена/грамм

почвы). Наблюдалось большее обилие бактерий в сукцессии, инициированной гербицидом, по сравнению с контрольной сукцессией во всех почвах за исключением образца 30. С помощью метода количественной ПЦР также было измерено относительное обилие архей. Количество копий архейной 16S рНК варьировало в пределах $1,1 \times 10^8$ – $2,1 \times 10^8$ на грамм почвы и не различалось для разных сукцессий во всех почвах, за исключением образца 17, где наблюдалось снижение обилия архей в 2 раза в сукцессии, инициированной внесением гербицида.

Численность метаболически активных представителей домена Bacteria была наибольшей в почве LC ($1,09 \times 10^9$ клеток/г почвы) по сравнению с другими почвами. Не было выявлено значимых изменений этого показателя в результате внесения глифосата. Напротив, снижение численности метаболически активных представителей домена Archaea коррелировало с фактором внесения гербицида. Для более подробного исследования чувствительных к глифосату прокариот была оценена численность метаболически активных представителей трёх филогенетических групп, составляющих домен Archaea: *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota*.

В образцах были выявлены разные соотношения между численностью метаболически активных представителей трех филогенетических групп домена Archaea. В образцах дерново-подзолистой почвы превалировали *Euryarchaeota* ($1,49 \times 10^8$ – $2,69 \times 10^8$ клеток/г почвы) в образцах слаборазвитой почвы – *Thaumarchaeota* ($1,2 \times 10^8$ – $2,74 \times 10^8$ клеток/г почвы). Численность представителей филогенетической группы *Crenarchaeota* и их доля среди метаболически активных архей была снижена в образцах с внесением глифосата (Рисунок 7).

Был проведен t-тест для сравнения микробиологических показателей в сукцессиях типов «контроль» и «глифосат». Как было описано ранее, достоверные различия наблюдаются для численности метаболически активных представителей домена Archaea и филогенетической группы *Crenarchaeota* (Таблица 5).

Таблица 5. Результаты сравнения численности разных групп микроорганизмов в зависимости от типа сукцессии с помощью t-теста. Значения определены с помощью люминесцентной микроскопии (1), метода FISH (2), количественной ПЦР (3). Жирным шрифтом выделены значимые различия

	Среднее, контроль	Среднее, глифосат	t- критерий	количество степеней свободы	p (уровень значимости)
Прокариоты (общ.) (1)	3,62E+09	2,22E+09	1,00121	6	0,355378
Bacteria (2)	7,56E+08	8,04E+08	-0,27407	6	0,793219
Archaea (2)	3,01E+08	1,75E+08	2,80629	6	0,030907
<i>Crenarchaeota</i> (2)	1,79E+08	9,44E+07	2,88409	6	0,027908
<i>Thaumarchaeota</i> (2)	1,77E+08	1,39E+08	0,71378	6	0,502171
<i>Euryarchaeota</i> (2)	1,73E+08	1,44E+08	0,58139	6	0,582146
Bac/Arch rate (2)	2,79	5,30	-1,50547	6	0,182912
Bacteria 16s рНК (3)	6,33E+09	6,97E+09	-0,59758	6	0,571966
Archaea 16s рНК (3)	1,38E+08	1,34E+08	0,09603	6	0,926625

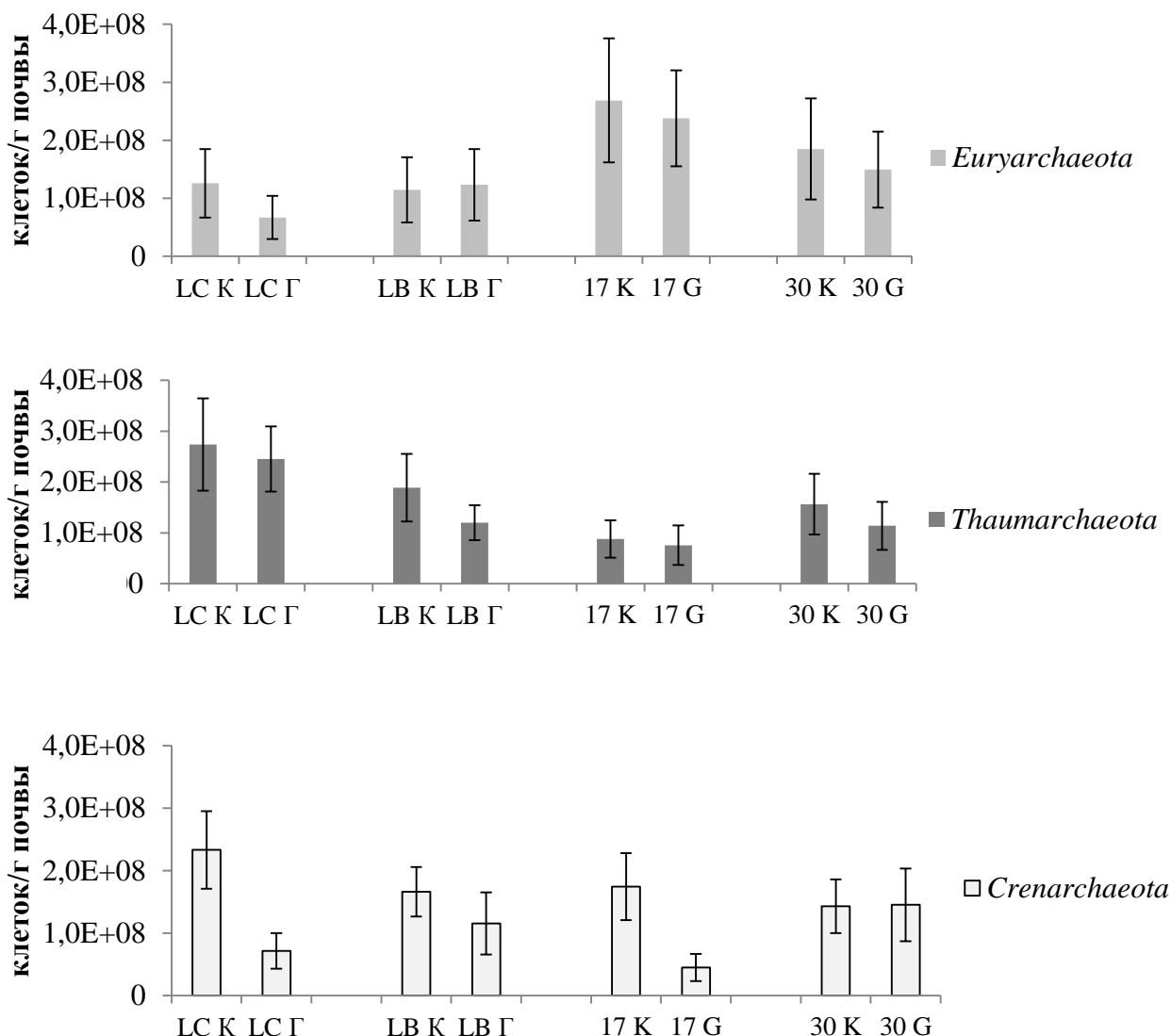


Рисунок 7. Численность метаболически активных представителей трех филогенетических групп (*Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Crenarchaeota*) домена Archaea в образцах слаборазвитой (LC, LB) и дерново-подзолистой (17, 30) почв в сукцессиях типов «контроль» (К) и «глифосат» (Г, G)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение функциональных характеристик прокариотного сообщества дерново-подзолистой почвы непосредственно после применения глифосата в дозе 2 кг/га находилось в пределах естественной вариации данных показателей. Проходящие эффекты или их отсутствие при внесении малых доз глифосата отмечались во многих работах (Nguyen et al., 2016). Однако при длительном воздействии (до 7 месяцев) наблюдалось изменение как структуры метаболически активной части сообщества, так и его функционирования.

Функциональная характеристика прокариотного сообщества дерново-подзолистой почвы с помощью измерения эмиссии CO₂ и методом

мультисубстратного тестирования показала значимое влияние длительного воздействия глифосата. Выявлена стимуляция дыхательной активности в лабораторном эксперименте с внесением большого количества глифосата (10 ПДК) в почву, ранее подвергавшейся воздействию глифосата. Наблюдаемый эффект был ранее замечен другими исследователями (Araújo, Monteiro, Abarkeli, 2003; Lane et al., 2012) и может быть объяснен использованием глифосата или его метаболитов в качестве питательного субстрата, так как в случае инициации микробной сукцессии в лабораторных условиях исключается увеличение эмиссии вследствие разложения отмершей биомассы растений.

При сравнении двух видов сельскохозяйственных обработок были выявлены различия в дыхательной активности. На площадках под минимальной обработкой наблюдалась более высокая суточная эмиссия CO_2 в сукцессии без добавления субстрата, чем на площадках под вспашкой, что может быть связано с повышенным содержанием доступного органического вещества в почве. Показатель метаболической работы микробного сообщества, полученный методом мультисубстратного тестирования, также был выше для почв под минимальной обработкой по сравнению с почвой под вспашкой. Та же закономерность отмечена для показателей общей численности прокариот, определенных методом люминесцентной микроскопии. Полученные с помощью разных методов результаты свидетельствуют о большей биологической активности почвы под минимальной обработкой, что согласуется с данными других исследователей (Simmons, Coleman, 2008; Солдатова, 2011; van Capelle, Schrader, Brunotte, 2012).

Микробное сообщество почвы, находящейся под минимальной обработкой, показало негативную реакцию на внесение глифосата как в условиях обработки в поле (доза внесения – 2 кг/га), так и при лабораторном внесении в концентрации 10 ПДК. Было выявлено снижение метаболической работы, характеризующей интенсивность потребления разных субстратов, и уменьшение устойчивости сообщества. В почве, отобранной с полос под вспашкой, наблюдалась обратная тенденция: при внесении глифосата в лабораторных условиях (10 ПДК) выявлено увеличение устойчивости сообщества (уменьшение коэффициента d). Уменьшение коэффициента d также наблюдалось в образцах, подвергшихся длительному воздействию глифосата. Это может быть обусловлено использованием гербицида в качестве питательного субстрата. Аналогичный стимулирующий эффект внесения глифосата был замечен ранее (Горленко и др., 2012).

Результаты кластерного анализа данных мультисубстратного тестирования показали сходство между функционированием микробных сообществ, подвергшихся длительному воздействию глифосата, в то время как при краткосрочном воздействии не было обнаружено подобной закономерности. Это может быть обусловлено не только длительностью воздействия гербицида, но также и сезонной разницей в функциональном разнообразии и устойчивости микробного сообщества изученной почвы.

Показатели общей численности прокариот значимо не изменялись в результате воздействия глифосата, что свидетельствует об устойчивости прокариотного сообщества в целом к данному гербициду. Однако выявлены структурные изменения метаболически активной части прокариотного сообщества: уменьшение численности метаболически активных представителей бактериального филума *Acidobacteria* и представителей домена Archaea, увеличение численности *Actinobacteria* при длительном воздействии глифосата. В лабораторном эксперименте с дерново-подзолистой и слаборазвитой почвой, где глифосат вносили в количестве 10 ПДК, подтверждено влияние гербицида на численность метаболически активных представителей домена Archaea и, в частности, филума *Crenarchaeota*. Таким образом, можно предположить измерение количества метаболически активных представителей бактериального филума *Acidobacteria* и архейного филума *Crenarchaeota* для биоиндикации воздействия гербицидов на прокариотный комплекс дерново-подзолистой почвы.

Деградация глифосата в почве зависит от его адсорбции. Внесение биочара в почву изменяло её адсорбционные характеристики по отношению к глифосату, что приводило к уменьшению периода полураспада гербицида. Можно предположить использование биочара в качестве почвоулучшителя для биоремедиации почв после применения гербицида.

ВЫВОДЫ

- 1) Впервые установлено изменение структуры метаболически активного прокариотного сообщества в почве, связанное с внесением глифосата, по сравнению с вариантом без гербицида. Выявлено снижение численности метаболически активных представителей домена Archaea и филума *Crenarchaeota*. Среди домена Bacteria численность метаболически активных представителей филума *Actinobacteria* увеличилась, а филума *Acidobacteria* – уменьшалась.
- 2) Общая численность прокариот, оцененная люминесцентно-микроскопическим методом, не изменялась на разных сроках после попадания глифосата в почву.
- 3) Методом мультисубстратного тестирования показаны различия в функционировании микробных сообществ фоновой почвы и почвы под воздействием глифосата. Наблюдалось возрастание потребления рамнозы, маннитозы, сахарозы, гистидина и валина, а также уменьшение потребления цитрата, октаноата, некоторых полимеров, пролина и тимидина в образцах с глифосатом.
- 4) Деградация глифосата в почве связана с адсорбционными характеристиками, которые изменяются при внесении биочара; в почве, исторически обогащенной биочаром, происходило наиболее быстрое разложение глифосата (за 17 дней).
- 5) Выявлена стимуляция эмиссии CO₂ при повторном внесении глифосата в почву, ранее подвергавшуюся воздействию гербицида.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI

1. A. Zhelezova, H. Cederlund, J. Stenström Effect of biochar amendment and ageing on adsorption and degradation of two herbicides // *Water, Air, & Soil Pollution*, 2017, №6, v.228
2. Железова А. Д., Тхакахова А. К., Ярославцева Н. В. и др. Микробиологические показатели агрегатов типичных черноземов в многолетних полевых опытах // *Почвоведение*, 2017, № 6 – с. 711-717
3. Чернов Т. И., Железова А. Д., Манучарова Н. А., Звягинцев Д. Г. Мониторинг хитинолитического микробного комплекса филопланы // *Известия РАН. Серия биологическая*, 2013, № 6 – с. 682–688
4. Железова А. Д., Манучарова Н. А., Горленко М. В. Структурные и функциональные характеристики прокариотного комплекса дерново-подзолистой почвы под воздействием гербицида глифосата // *Вестник МГУ, серия Почвоведение*, 2018, №2, с. 1-20

Прочие публикации

5. Железова А. Д., Кутовая О. В., Дмитренко В. Н. и др. Оценка количества ДНК разных групп микроорганизмов в генетических горизонтах темно-серой почвы // *Бюллетень Почвенного института имени В.В.Докучаева*, 2015, № 78, с. 87–98.
6. Чернов Т. И., Тхакахова А. К., Железова А. Д., Кутовая О. В. Метагеном генетических горизонтов почвенного профиля // *Основные достижения и перспективы почвенной метагеномики. Монография*, под ред. Е.В. Першиной, О.В. Кутовой, Б.М. Когута, Е.Е. Андропова – Информ-Навигатор СПб, 2017, с. 68–87.
7. Железова А.Д. Оценка влияния гербицида глифосата на микробный комплекс дерново-подзолистой почвы // сборник «Ломоносов-2014: XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Почвоведение», подсекция «Биология почв». Тезисы докладов» – М.: МАКС Пресс, 2014.
8. Железова А.Д. Влияние гербицида глифосата на гидролитический микробный комплекс дерново-подзолистой почвы // *Материалы Международной научной конференции XVII Докучаевские молодежные чтения «Новые вехи в развитии почвоведения: современные технологии как средства познания» / Под ред. Б.Ф. Апарина. – СПб.: Издательский дом СПбГУ, 2014.*
9. Железова А.Д. Изменение структурно-функциональных характеристик микробного комплекса дерново-подзолистой почвы под влиянием гербицида глифосата // *Биология – наука XXI века: 18-я Международная Пуштинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. – Пушкино.*
10. Железова А.Д. Микробный комплекс дерново-подзолистой почвы под воздействием гербицида глифосата // сборник «Ломоносов-2015: XXII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Почвоведение», подсекция «Биология почв». Тезисы докладов» - М.: МАКС Пресс.