

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ
ПРОБЛЕМ ПОЧВОВЕДЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЖУРАВЛЕВА Анна Ивановна

ПРОЯВЛЕНИЕ ЗАТРАВОЧНОГО ЭФФЕКТА В РАЗЛОЖЕНИИ
ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА СОВРЕМЕННЫХ И ПОГРЕБЕННЫХ
ПОЧВ ЛЕСНОЙ ЗОНЫ

Специальность 03.02.13 – Почвоведение

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Е.В. Благодатская

Москва-2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 Обзор литературы	12
1.1. Органическое вещество почв - общие представления	12
1.2. Затравочный эффект	17
1.2.1. Механизмы возникновения затравочного эффекта в почве	17
1.2.2. Количество поступающего субстрата, микробная биомасса и затравочный эффект	23
1.2.3. Источники биофильных элементов, выделяющихся в ходе затравочного эффекта	25
1.2.4. Количественное определение затравочного эффекта	27
1.3. Роль ферментативной активности в проявлении затравочного эффекта	30
1.3.1. Ферментный пул в почвах	30
1.3.2. Методы определения ферментативной активности в почвах	35
1.3.3. Механизмы реального ЗЭ и активность ферментов	37
1.4. Зависимость затравочного эффекта от ростовых характеристик почвенных микроорганизмов и структуры почвенного микробного сообщества	38
1.5. Качество поступающего в почву субстрата и величина затравочного эффекта	43
1.6. Влияние растительных остатков и пирогенно-трансформированного материала на ускорение минерализации почвенного органического вещества	45
ГЛАВА 2. Объекты и методы исследований	48
2.1. Описание объектов	48
2.2. Определение затравочного эффекта и ферментативной активности в почвах	51

2.3. Определение функциональных особенностей микроорганизмов кинетическим методом	53
2.4. Выявление особенностей химической структуры ОВ современного и погребенного горизонта подзолистой почвы	57
ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение	59
3.1. Влияние содержания органического углерода и микробной биомассы на проявление затравочного эффекта в серых лесных почвах	59
3.1.1. Сравнение интенсивности минерализационных процессов современных и погребенных горизонтов подзолистой почвы	59
3.1.2. Влияние исходной трофической обстановки на функциональные особенности микроорганизмов современных и погребенных подзолистых почв	61
3.1.3. Микробиологические свойства современных и погребенных горизонтов подзолистой почвы	62
3.1.4. Проявление затравочного эффекта в современных и погребенных горизонтах подзолистой почвы	65
3.2. Роль микрорельефа в проявлении затравочного эффекта в серой лесной почве	71
3.2.1. Оценка интенсивности минерализационной активности в современных и погребенных почвах на блоке и в межблочье	71
3.2.2. Проявление затравочного эффекта в современных и погребенных горизонтах подзолистой почвы	72
3.3. Интенсивность затравочного эффекта в зависимости от типа почв	74
3.4. Изменения свойств микробных сообществ в зависимости от качества субстрата	77
3.4.1. Влияние внесенных субстратов на минерализационные процессы в почве	77

3.4.2. Изменение функциональной структуры микробного сообщества и содержания микробной биомассы почв в процессе разложения растительных остатков и пирогенно-трансформированного материала.	82
3.4.3. Содержание общей и активной микробной биомассы и интенсивность продуцирования CO ₂	88
3.4.4. Затравочный эффект (ЗЭ) в почвах с растительными остатками и пирогенно-трансформированным растительным материалом.	92
3.5. Сравнение ИК-спектров органического вещества современной и погребенной подзолистой почвы.	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	101
ПРИЛОЖЕНИЯ	122

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПОВ – почвенное органическое вещество

ОВ – органическое вещество

РО – растительные остатки

Сорг – углерод в составе органических соединений

С-СО₂ – углерод, выделяющийся из почвы в составе углекислого газа

ЗЭ – затравочный эффект

ОЗЭ- относительный затравочный эффект (выраженный в % от внесенного С или по отношению к контролю)

МПВ- микроповышение

МПН- микропонижение

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В наземных экосистемах почва является одним из главных резервуаров углерода, содержание которого в почвенном органическом веществе втрое выше, чем в атмосфере (Batjes, 1996). Основные запасы С сосредоточены в верхней части почвенного профиля, а с учетом минеральных горизонтов, содержание углерода в 3-м слое увеличивается до 2.3 Гт. Несмотря на то, что химическая структура органического вещества (**ОВ**) в верхней и нижней части почвенного профиля зачастую имеет сходный характер (Fontaine et. al., 2007), органическое вещество минеральных горизонтов обновляется очень медленно, и его возраст по радиоуглеродному датированию (^{14}C) может достигать нескольких тысяч лет, т.е. «древний» стабильный гумус представляет собой долговременный резервуар углерода, и в то же время является потенциальным источником CO_2 (Богатырев, 2007; Моргун, 2008; Семенов, 2015; Ковда, 2016; Меняйло, 2016).

Стабильность **ОВ** минеральных почвенных горизонтов может быть обусловлена дефицитом свежего субстрата для почвенных микроорганизмов, т.е. биотическим фактором (Гузов, 1980; Манучарова, 2017). Внесение в почву доступного субстрата активирует микроорганизмы и инициирует синтез ферментов (Крамарева, 2003), принимающих участие в разложении почвенного органического вещества (**ПОВ**), т.е. приводит к возникновению затравочного эффекта (**ЗЭ**), а именно - к усилению минерализации **ПОВ** (Кудеяров, 2005). Микробные сообщества корнеобитаемого слоя формируются в условиях регулярного поступления органического субстрата (благоприятствующего развитию копиотрофных микроорганизмов), тогда как на глубине, в условиях недостатка поступления органического вещества относительно доминируют олиготрофы (Лысак, 2008; Семенов, 2013). Насколько различается способность микроорганизмов инициировать затравочный эффект в органогенной и минеральной части почвенного профиля - остается невыясненным. В

погребенных почвах микроорганизмы, ранее существовавшие в условиях притока свежего субстрата, вынуждены адаптироваться к недостатку элементов питания и энергии. В данном случае погребенные горизонты представляют собой модельные объекты с резко контрастными трофическими условиями по сравнению с современными обогащенными ОВ горизонтами. Актуальным остается вопрос: что определяет ЗЭ при долговременном изменении трофической ситуации, вызванной, например, погребением верхних почвенных горизонтов – отсутствие притока субстрата или свойства исходного микробного сообщества?

Положение почвы в ландшафте определяет комплекс гидротермических и трофических условий (Kovda, 2016), влияющих на деятельность микроорганизмов, в том числе и на уровне элементов микрорельефа (Алифанов, 2010; Добровольская, 2017). Исследование влияния микрорельефа на активность почвенных микроорганизмов представляет особенный интерес, поскольку почвы, сформировавшиеся в микропонижениях, относительно обогащены органическим веществом и обеспечены влагой по сравнению с почвами микроповышений (Алифанов, 2010). Это позволяет предположить различия микробного отклика на поступление доступного субстрата в почвах разных элементов микрорельефа. Помимо воздействия естественного фактора (микрорельефа) на реакцию почвенных микроорганизмов при поступлении свежего субстрата, существенное влияние оказывает негативная антропогенная деятельность (Кожевин и др., 1989; Селивановская, 2006), а именно - пирогенное воздействие (Девятова, 2012; Милановский, 2018). Увеличение площадей неконтролируемых палов растительности приводит к поступлению в почву продуктов неполного сгорания растительных остатков, способных изменять ростовые характеристики микроорганизмов, инициирующих ЗЭ. Известно, что микроорганизмы с доминирующей r-стратегией характеризуются высокой скоростью роста в условиях избытка субстрата и менее эффективной способностью усваивать субстрат, чем K-стратеги, отличающиеся высокой конкурентной способностью, меньшей скоростью роста, доминирующие при

разложении труднодоступных субстратов (Паников, 1992). В связи с этим, исследования функциональных особенностей почвенных микроорганизмов на различных стадиях преобразования пирогенно-измененного растительного материала лесного и лугового ценозов представляются актуальными.

Цель работы заключалась в выявлении роли доступного субстрата в проявлении затравочного эффекта в современных и погребенных почвах.

Задачи исследования включали:

- Определение интенсивности затравочного эффекта в зависимости от:
 - величины микробной биомассы;
 - содержания органического углерода в почве;
 - трофической обстановки в органогенных и минеральных горизонтах;
 - смены трофических условий в современных и погребенных горизонтах почв;
 - микрорельефа;
- Сравнение величины ЗЭ в подзолистых и серых лесных почвах.
- Выявление изменений ростовых характеристик почвенных микроорганизмов в зависимости от качества субстрата.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследований. Выявлено, что стабильность органического вещества глуболежащих минеральных и погребенных почвенных горизонтов в значительной мере является результатом недостатка доступа свежего субстрата. Продемонстрировано сохранение функциональных особенностей в погребенных горизонтах почв лесной зоны, присущих копиотрофным микроорганизмам. Впервые выявлено влияние почвы на высоком (типовом) таксономическом уровне для лесной климатической зоны на интенсивность проявления затравочных взаимодействий. Выявлена прямая взаимосвязь величины ЗЭ с содержанием $C_{орг}$ и микробной биомассы. Установлено, что в горизонтах почв, лимитированных по источнику энергии и питательным элементам, относительное доминирование получали микроорганизмы - К-стратеги. Проведена оценка влияния микрорельефа на проявление затравочного эффекта в

гумусовых горизонтах серой лесной почвы, кроме того, выявлены и механизмы развития ЗЭ. Так, в ходе долговременной минерализации органического вещества увеличение величин ЗЭ сопровождалось усилением активности ферментов, минерализующих труднодоступные соединения. Показано, что качество вносимых в почву субстратов влияло на состояние микробных сообществ, обуславливая доминирование медленно растущих микроорганизмов, способных вызывать затравочный эффект, в вариантах с пирогенно-трансформированным растительным материалом. Выявлены функциональные изменения в структуре микробного сообщества почвы, инициированные поступлением пирогенного материала, которые создают угрозу запасам органического вещества почвы.

Материалы диссертации могут быть использованы в курсах лекций по почвенной микробиологии, экологии, биогеохимии и химии гумуса, а также для создания математических моделей цикла С в почве и наземных экосистемах.

Основные защищаемые положения.

1. Стабильность органического вещества почв в значительной мере определяется дефицитом свежего субстрата для почвенных микроорганизмов.
2. Интенсивность проявления затравочного эффекта контролируется величиной микробной биомассы и активностью гидролитических ферментов.
3. Величина затравочного эффекта зависит от микроклиматических особенностей, обусловленных положением почвы в микроландшафте.
4. Качество поступающего в почву субстрата определяет изменение ростовых характеристик микроорганизмов почв.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на российских конференциях: «Экология и почвы. Роль абиотических факторов в почвообразовании» (г. Пущино, 2009), Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука XXI века" (г. Пущино, 2009, 2015), «География продуктивности и биогеохимического круговорота наземных ландшафтов. К 100-летию Н.И. Базилевич» (г. Пущино, 2010), на Съезде Общества почвоведов им. В.В. Докучаева (Белгород, 2016). Кроме того, результаты диссертации были

апробированы на Международных симпозиумах и конференциях: Eurosoil (г. Бари, Италия, 2012), Симпозиум по органическому веществу почв (г. Харпенден, Великобритания, 2017), Микробиологический Конгресс (г. Пущино, 2017), на Ежегодной сессии Европейского союза наук о Земле (г. Вена, Австрия, 2010, 2017).

Личный вклад соискателя. В ходе работы над диссертацией автор принимал непосредственное участие в полевых исследованиях, планировании и проведении лабораторных экспериментов, компьютерной обработке и анализе данных, обсуждении и публикации результатов.

Организация исследований. Основная часть лабораторных исследований выполнена в Институте физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (г. Пущино, Московская обл.). Полевые наблюдения осуществлялись на территории Опытной-полевой станции ИФХиБПП РАН. Часть почвенных образцов были предоставлены д.б.н., профессором В.М. Алифановым и научным сотрудником к.г.н. Института криосферы Земли СО РАН А.С. Якимовым. Эксперименты с использованием ^{14}C проводились на базе изотопного блока Института фундаментальных проблем биологии РАН (г. Пущино).

Участие в проектах. Настоящее диссертационное исследование на разных этапах его выполнения поддерживалось РФФИ (06-04-48756), Грантом Европейских комиссий (MICROSOM), РФФИ (14-14-00625).

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, 3 из них входят в международные базы WoS, Scopus и RSCI.

Объем и структура диссертации. Диссертация включает введение, 3 главы, заключение, выводы, список литературы и приложения. Материалы диссертации изложены на 129 страницах, содержат 8 таблиц, 25 рисунков. Список литературы включает 178 наименования, в том числе 114 англоязычных.

Благодарности. Автор выражает благодарности научному руководителю к.б.н., в.н.с. Е.В. Благодатской за всестороннюю помощь и поддержку. Автор глубоко признателен за ценную консультационную помощь в описании погребенных почв и поддержку проф., д.б.н., В.А. Демкину. Особую благодарность автор выражает к.б.н., в.н.с. Т.С. Демкиной за участие в обсуждении полученных результатов. Соискатель благодарен за содействие в ходе анализа данных к.б.н., в.н.с. Т.Э. Хомутовой, к.б.н. с.н.с. лаборатории математического моделирования экосистем Т.Н. Мякшиной за помощь в подготовке образцов для исследований и планировании лабораторных опытов. Автор глубоко благодарен всем сотрудникам лаборатории археологического почвоведения и коллективу лаборатории почвенных циклов азота и углерода ИФХиБПП РАН за внимательное и дружественное участие на всех этапах подготовки данной работы. Автор благодарит зав. лабораторией, д.б.н., профессора, чл.-корреспондента РАН В.Н. Кудярова за помощь и всестороннюю поддержку.

.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Органическое вещество почв - общие представления

Почвенное органическое вещество представляет собой «совокупность всех органических соединений, находящихся в почве, но не входящих в состав живых организмов или образований, сохраняющих анатомическое строение» (Орлов, 1992). Органическое вещество на экосистемном уровне представляет собой результат совокупного взаимодействия факторов почвообразования – климата, рельефа, материнской породы, растений и других живых организмов, времени. Почвенное органическое вещество, являясь важным компонентом почв, выполняет целый ряд функций: ОВ является источником углерода и энергии для микроорганизмов, содержит ферменты и физиологически активные соединения, содержит элементы питания растений, является средой обитания и поддерживает биоразнообразие (Добровольский, 2000), служит *источником и стоком* «парниковых» газов, поддерживает равновесное состояние в системе «почва-растение». Кроме того, ОВ способствует улучшению водно-физических свойств, осуществляет терморегуляторную функцию, обеспечивает буферность почвы к изменению условий среды, иммобилизует тяжелые металлы и радионуклиды. Такая полифункциональность органического вещества почв обусловлена его строением.

В состав почвенного органического вещества входят как неспецифические соединения – лигнин, целлюлоза, полифенолы, белки, углеводороды и проч., так и собственно гуминовые вещества – полидисперсные, гетерогенные азотсодержащие соединения фенольной природы, являющиеся продуктом почвообразования (Александрова, 1982; Ганжара, 1985; Shirshova, 2009). Высокомолекулярная структура и нерегулярное строение гуминовых веществ приводит к их накоплению в составе почвенного гумуса (Ванюшина, 2003). Развитие и применение гранулометрических, денсиметрических, грануло-

денсиметрических, биокинетических методов исследования почвенного органического вещества в совокупности с изотопными (^{13}C , ^{14}C , ^{15}N) и методами ядерно-магнитного резонанса, а также использование математических моделей показало, что разные компоненты почвенного ОВ отличаются по минерализационной способности, природе и прочности связей с минеральными частицами, возрасту и времени оборачиваемости углерода (Paul et al., 1999, 2001; Paustian et al., 2000; Bernoux et al., 1998; Милановский, 2015). Вновь образованная микробная биомасса и исходные компоненты синтезируемых гумусовых веществ разлагаются быстрее по сравнению с защищенной биомассой, остатками микробных клеток и продуктами гумификации, а новообразованные гумусовые вещества более лабильны по сравнению со старыми, частично или полностью стабилизированными (Mueller et al., 1998). Основываясь на этих фактах, почвенное органическое вещество можно подразделить на три пула: **активный** с периодом полураспада ($T_{0.5}$) меньше 2 лет и временем пребывания в почве (MRT) меньше 3 лет; **медленный** ($T_{0.5} > 10$ лет, MRT > 14 лет) и **пассивный** ($kT_{0.5} > 750$ лет, MRT > 1000 лет) пулы, между которыми происходит обмен соединениями, имеющими промежуточные значения кинетических параметров (Семенов и др., 2004; Jenkinson, Rayner, 1977;). С биологически минерализуемым **активным пулом** почвенного органического вещества сопряжены кратковременные процессы круговорота углерода, поддерживающие микробную деятельность, питательный режим почвы, эмиссию и сток биогенных газов, другие динамические характеристики почвы (Paustian et al., 2000; Nicolardot et al., 1994). **Медленный пул** органического вещества определяется в выделенной фракции С орг, и состоит преимущественно из «мобильных» гуминовых кислот, которые выделяются в образце без предварительной кислотной обработки. Выделенные таким образом гуминовые кислоты отличались меньшей способностью к разложению по сравнению с гуминовыми кислотами, выделенными из образца, подвергшегося обработке кислотой. Образование гидрофобных структур, окклюзии в микроагрегатах или образование нерастворимых комплексов с ионами металлов

или минералами способствует переходу гуминовых веществ в *пассивный пул*. Пассивный пул составляют старые химически связанные, углеподобные минерально-гуминовые компоненты с низкой скоростью минерализации. Причинами особой прочности гуминовых веществ называют химический состав из преимущественно ароматических и алифатических соединений и молекулярную неоднородность (Семенов, Когут, 2015). Под термином ***стабильность органического вещества*** подразумевают способность почвенного органического вещества сохранять свои функции и свойства во времени (Семенов, Когут, 2015).

Органическое вещество органогенных и минеральных горизонтов с разной интенсивностью поддается процессам биodeградации. ОВ верхних органогенных горизонтов постоянно вовлекается в биогеохимические циклы элементов, благодаря чему быстро обновляется. Существует множество факторов, способствующих консервации органического вещества в почве. Среди абиотических факторов выделяют физическое связывание органического вещества внутри почвенных агрегатов или в поровом пространстве, а также химическую связь ОВ с глинистыми минералами, снижающую биодоступность органического вещества для разложения почвенными микроорганизмами и ферментами (von Lützow et. al., 2006). Избирательная консервация некоторых устойчивых органических соединений может приводить к стабилизации почвенного органического вещества. Французскими исследователями (Fontaine et. al., 2007) были получены данные ЯМР – спектроскопии, продемонстрировавшие сходную химическую структуру органического вещества органогенных и минеральных горизонтов, то есть химическая структура почвенного гумуса верхних и глуболежащих почвенных горизонтов не влияла на стабильность почвенного органического вещества (рис.1.1).

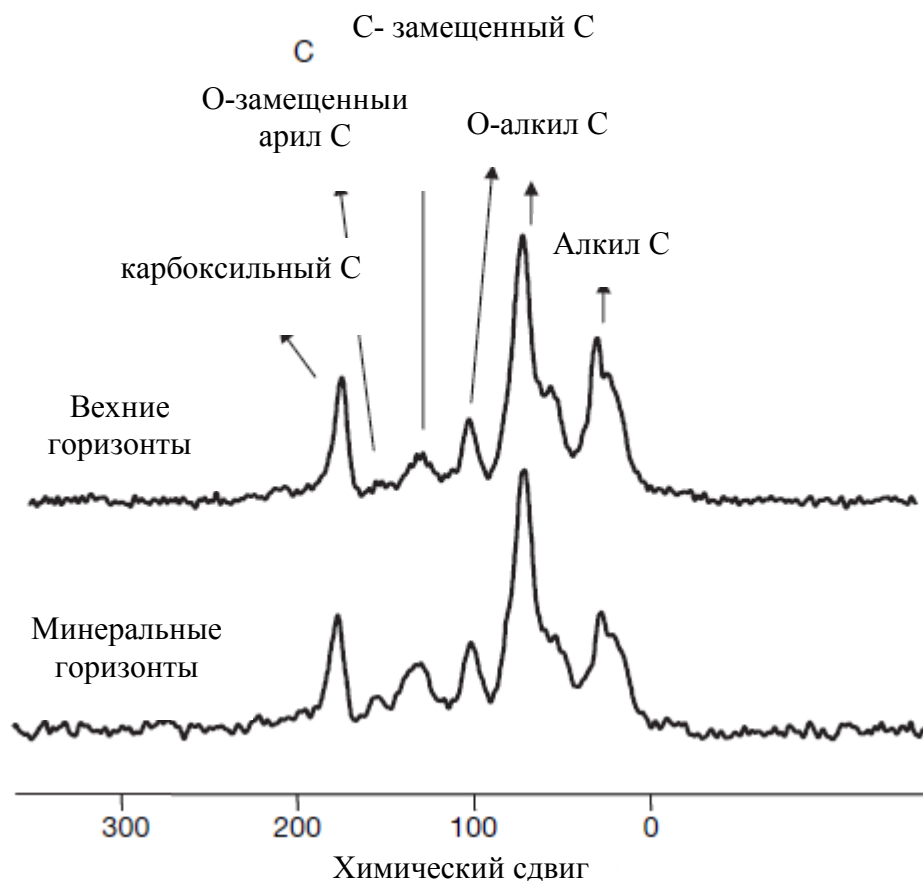


Рисунок 1.1. ИК-спектры органического вещества (ГК) органогенных (0-0,02 м) и минеральных (0,6-0,8 м) почвенных горизонтов, (Fontaine et. al., 2007).

В палеопочвенных исследованиях особенности строения органического вещества погребенных почв являются инструментом палеоклиматических реконструкций, и представляют интерес для изучения генезиса и эволюции почв (Заварзина, 2010; Rusakov, 2019). Дергачева отмечает (Дергачева, 1997), что содержание и распределение в профилях погребенных и ископаемых почв и в разновозрастных отложениях археологических объектов органического углерода (гумуса) характеризуют процесс гумусонакопления, изменение его интенсивности в ходе формирования толщи отложений, степень аккумуляции гумуса в периоды наибольшей интенсивности почвообразования. Сравнение свойств гумуса погребенных почв с органическим веществом современных почв позволяет сделать выводы о диагенетических преобразованиях, произошедших за время погребения, и выявить наиболее устойчивые к диагенезу свойства. Особое значение уделяется как абсолютным

величинам накопления гумуса, его содержания в том или ином горизонте, так и характеру изменения внутри толщи отложений выделенных профилей почв (там же). Содержание общего углерода (гумуса) в ископаемых почвах, по литературным данным, среднем в 10 и более раз ниже, чем в современных почвах (Дергачева, Зыкина, 1988). Показано, что несмотря на очень низкое валовое содержание этого компонента во всех горизонтах палеопочв, изменение его по профилю не зависит от абсолютного их возраста, является специфичным для почв разного генезиса и соответствует в целом современным аналогам. Согласно Тюрину процессы минерализации гумуса продолжаются даже в условиях консервации, вызванных погребением почв; при этом разложение легкогидролизуемых составляющих происходит интенсивнее, в результате чего наблюдается общее снижение содержания гумуса в погребенных горизонтах и относительное повышение содержания гуминовых кислот и гумина..

Помимо абиотических факторов стабильности органического вещества, выделяют **биотический фактор** (Fontaine et. al., 2007), связанный с активностью почвенных микроорганизмов. Процессы синтеза и минерализации ОВ осуществляются благодаря деятельности почвенных микроорганизмов. Палеопочвы археологических памятников, в зависимости от степени консервации, сохраняют ряд свойств с момента погребения (Демкина и др., 2010), что отражается и в состоянии микробного сообщества (Демкина и др., 2007). В минеральных и погребенных почвах микроорганизмы существуют в условиях дефицита доступного субстрата. При условии поступления доступного субстрата активизация микроорганизмов может привести к минерализации собственно почвенного органического вещества, то есть к возникновению **затравочного эффекта**.

1.2. Затравочный эффект

1.2.1. Механизмы возникновения затравочного эффекта

Интерес к процессу усиления минерализации или дестабилизации органического вещества при внесении в почву различных субстратов сформировался у исследователей достаточно давно. Так, было отмечено, что на фоне минерализации внесенных в почву субстратов наблюдается дополнительная эмиссия биогенных элементов. В 1926 г. Лонис обнаружил усиление минерализации почвенного азота (экстра-N) при внесении зеленых удобрений в почву (Семенов, Когут, 2015). Дальнейшие исследования затравочного эффекта, возобновились только в конце 40-х и начале 50-х (Broadbent, 1947, 1956; Broadbent and Bartholomew, 1948). В эксперименте с внесением в почву меченых по ^{13}C растительных остатков было обнаружено 4- и 11- кратное увеличение продуцирования почвенного CO_2 . В 1985 г. был опубликован обзор литературных данных о проявлении затравочного эффекта в почвах с описанием возможных механизмов выделения почвенного углерода или азота при внесении в почву различных субстратов (Jenkinson, 1985). В России исследованиям затравочного эффекта был посвящен ряд работ по оценке пулов экстра-азота (Cabrera, 1993) и экстра-углерода (Кудеяров, 1988; Кудеяров, 1999; Кудеяров, 2005; Кузнецова, 2006; Семенов, 1999; Ларионова, 2005, 2010).

Под термином «затравочный эффект» принято понимать усиление (изменение) минерализации почвенного органического вещества при внесении легкодоступного субстрата. Однако в ряде случаев экспериментальные исследования демонстрировали противоположную ситуацию: при внесении свежего субстрата наблюдалось снижение минерализации почвенного органического вещества, что обусловило необходимость разделения затравочных эффектов на *кажущиеся* и *реальные*. Согласно классическому определению Дженкинсона (Jenkinson, 1985), *реальный ЗЭ* представляет собой ускоренное разложение труднодоступного почвенного органического вещества, инициированное внесением доступного

субстрата, тогда как *кажущийся* ЗЭ связан с замедлением минерализации собственно почвенного органического вещества и проявляется вследствие ряда иных механизмов, таких как, например, ускорения оборачиваемости микробной биомассы (Кузьяков et al., 2000). Вновь возникший интерес к явлению затравочного эффекта привел к накоплению знаний о потенциальных источниках дополнительно выделяющихся биофильных элементов, о сложности самих механизмов проявления затравочного эффекта, которые требовали должного осмысления. Для обобщения представлений о явлении затравочного эффекта, Кузьяковым была предложена следующая схема (рис.1. 2).

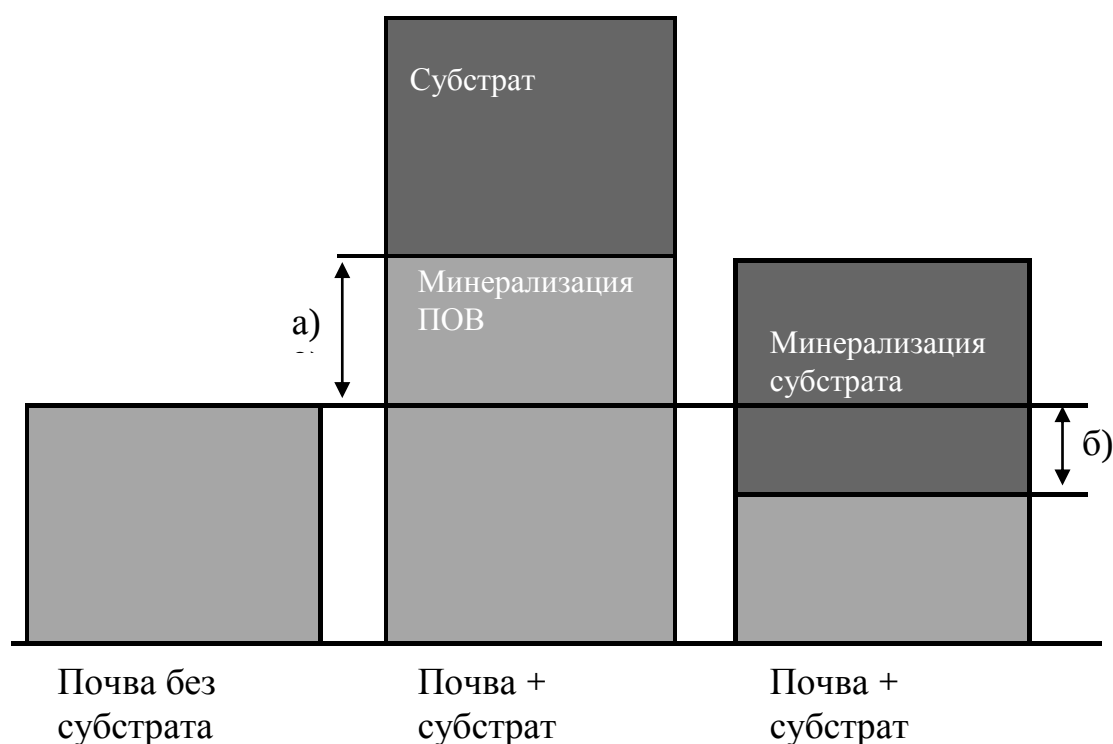


Рисунок 1.2. Схема проявления затравочного эффекта на фоне внесения доступного органического субстрата: а)- ускорение минерализации органического вещества почв — положительный затравочный эффект, б)- замедление скорости минерализации собственно почвенного органического вещества, и усиление минерализации внесенного субстрата — отрицательный затравочный эффект. (Кузьяков, 2010).

Следует отметить, что затравочный эффект наблюдается не только для азота и углерода, но также для фосфора (Fokin, Radzhabova, 1996; Helal, 1984, Kaal, 1986), серы (O'Donnell et al., 1994; Lefroy et al., 1994) и некоторых других биофильных элементов. Внесение доступного субстрата в почву инициирует не только усиление минерализации почвенного ОВ (**положительный ЗЭ**), но и вызывает противоположное явление – замедление разложения органического вещества почв, или иммобилизацию внесенных азота или углерода, т.е. **отрицательный ЗЭ** (рис. 1.2. б).

Итак, в зависимости от источника происхождения экстра-азота или углерода в почве, затравочные эффекты принято разделять на *кажущиеся* и *реальные*, а в зависимости от механизмов возникновения – на положительные или отрицательные ЗЭ. Исследователи выделяют, по крайней мере, 2 класса механизмов, приводящих к возникновению того или иного ЗЭ. Первый класс включает механизмы, вызывающие положительный **реальный** затравочный эффект. В этот класс входят процессы, связанные с активацией минерализационной активности микроорганизмов на фоне внесения легкодоступных органических субстратов, корневых выделений и минеральных удобрений (при низком соотношении углерода к азоту), приводящих к разложению собственно почвенного органического вещества. Другой механизм связан с ко-метаболизмом, в результате которого микроорганизмы продуцируют ферменты, минерализующие почвенное органическое вещество. Де Нобили с соавт. (Denobili et al., 2001) предположили, что некоторые микроорганизмы запасают небольшое количество энергии для поддержания клетки в состоянии «метаболической готовности», таким образом позволяя прореагировать максимально быстро к поступающим субстратам чем неактивные клетки. Отмечено, что даже наименьшее количество легко доступных субстратов активируют деятельность микроорганизмов. В отличие от теории, разработанной Фонтейном с соавт. (Fontaine et. al., 2003), предполагается, что добавление легкодоступных, богатых энергией субстратов только способствует росту микроорганизмов - г-стратегов, которые быстро растут на внесенном

субстрате, но не способны использовать больше сложные органические соединения, характерные для почвенного органического вещества.

Механизмы, инициирующие возникновение *реального* отрицательного ЗЭ – относятся ко второму классу процессов. Отрицательный *реальный* затравочный эффект вызывается потреблением внесенных легкодоступных элементов. Возможные механизмы возникновения отрицательного реального эффекта приведены в таблице 1. 1.

Таблица 1.1. Затравочный эффект в отношении биофильных элементов и возможные причины его проявления.

ЗЭ в отношении элементов С и N	Внесенный субстрат	Возможные причины возникновения ЗЭ	Ссылки на литературу
	Легкодоступные С, N- субстраты Живые корни растений Токсичные соединения Минеральные азотные удобрения	Сдвиг внутри микробной биомассы, разлагающей ПОВ, в сторону минерализации доступного субстрата Конкуренция живых корней растений и ризосферных микроорганизмов за лимитированные питательные элементы Ингибирование активности микроорганизмов и их ферментов Избирательное потребление обогащенных углеродом субстратов микроорганизмами	(Sparling et al., 1982) (Reid, Gross 1983) (Cheng, 1996) (Cheng, 1999), (Wang, Bakken, 1997) (Sharkov, 1986)
Только для С	Органические субстраты с соотношением С:N<16 Минеральные азотные удобрения	Снижение соотношения С:N, иммобилизация углерода в микроорганизмах Иммобилизация азота в микроорганизмах вследствие достаточного количества легкодоступного С	(Kuzyakov et al., 1997a, 1999) (Cheng and Kurtz, 1963) (Stewart et al., 1963)(Nielsen, Jensen 1986) (Jawson, Elliot 1986) (Jackson et al. (1989)
Только для N	Минеральные азотные удобрения Органические субстраты с соотношением С:N>16	Снижение фиксации молекулярного азота Иммобилизация азота почвенными микроорганизмами	(Yin et al., 1997) (Blagodatsky, Yevdokimov, 1998) (Blagodatsky et al., 1998)

Под термином «кажущийся» подразумевается экстра-углерод, высвобождающийся из микробной биомассы (Bell et al., 2003; De Nobili et al., 2001; Fontaine et al., 2003; Gioacchini et al., 2002; Hamer, Marschner 2005; 2006; Mondini et al., 2006). Процессы, инициирующие возникновение *кажущихся* затравочных эффектов, связаны с замещением пулов, триггерным эффектом (ускорением внутреннего метаболизма). Случаи, обусловленные неравномерным мечением субстратов и экспериментальными ошибками, неколичественным улавливанием CO₂, добавлением избыточного количества субстрата (Conde et al., 2005), или увеличением разложения ПОВ после увлажнения почвы (Niklaus, Falloon, 2006), не должны рассматриваться в качестве затравочных эффектов.

В большинстве случаев изменения скорости минерализации азота, при внесении азотных удобрений в почву, являются *кажущимися ЗЭ*, инициированными реакциями замещения (при фиксации азота или в микробной биомассе) или замещением пулов. *Реальный* затравочный эффект зависит от состава добавленного субстрата, который потребляется микроорганизмами. Недостаток элементов питания, например, N, может быть восполнен в ходе ускоренного разложения почвенного органического вещества, приводящего к *реальному ЗЭ*. В ходе минерализации сложных органических субстратов почвенные микроорганизмы могут использовать энергию из более доступных соединений для продуцирования ферментов, гидролизующих почвенный гумус.

Основываясь на вышесказанном можно заключить, что *реальный ЗЭ* может быть обусловлен:

1. минерализацией почвенного органического N для восполнения запасов доступного N;
2. кометаболизмом ПОВ.

Трудность в разделении кажущегося и реального затравочного эффекта заключается в том, что оба этих эффекта проявляются одновременно. Достоверное разделение наблюдающихся затравочных эффектов на кажущиеся и реальные возможны только при равномерном «мечении» обоих пулов

выделяющегося экстра С- ПОВ и микробной биомассы. В остальных случаях разделение источников ЗЭ сильно затруднено.

В масштабе экосистем, проявление отрицательного затравочного эффекта имеет большее значение по сравнению с проявлением положительного ЗЭ. Положительный ЗЭ может приводить к сокращению запасов гумуса и дополнительному поступлению в атмосферу парниковых газов (прежде всего, CO_2), тогда как отрицательный затравочный эффект приводит к восполнению почвенных запасов.

Способность субстратов вызывать процесс иммобилизации или минерализации азота в основном зависит от соотношения C:N во внесенном субстрате (Nicolardot et al., 1986; Billes, 1988; Blagodatsky, 1998). Так, субстраты с широким соотношением $\text{C:N} > 10$, инициируют отрицательный ЗЭ в отношении к азоту, тогда как вещества с $\text{C:N} < 8$ – положительный затравочный эффект. Таким образом, зная величину соотношения углерода к азоту во вносимом субстрате, можно прогнозировать минерализацию или иммобилизацию азота в почве.

1.2.2. Количество поступающего субстрата, микробная биомасса и затравочный эффект

Поступающие в почву доступные субстраты являются источником углерода и энергии для почвенных микроорганизмов. В естественных условиях характер распределения субстрата определяется комплексом абиотических и биотических факторов, в микромасштабе, в пределах одного типа почвы, фактором распределения количества свежего субстрата выступает микрорельеф (Алифанов, 1979; Алифанов, 2010). В исследованиях других авторов (Мамаева, 2012) не было обнаружено влияние крутизны склонов 10-15 на биологическую активность почв, то есть комплекс агрохимических и микробиологических параметров почв равнинных территорий и склонов оказался сходным. В связи с этим, изучение микрорельефа как фактора, определяющего биологическую активность почв

представляется актуальным. Количество внесенного субстрата влияет на изменения внутри микробных сообществ, поэтому особое значение имеет соотношение между С в микробной биомассе почвенных микроорганизмов и поступающим углеродсодержащим субстратом. Содержание микробной биомассы в разных почвах довольно сильно различается, поэтому количество внесенного углерода целесообразно выражать в процентах от внесенного.

При внесении углеродсодержащего субстрата, превышающего содержание углерода в микробной биомассе, происходит усиление микробного роста и изменение состояния микробных сообществ (Заварзин, 2004; Blagodatskaya, Kuzyakov, 2008). При добавлении в почву количества С меньше, чем содержится в микробной биомассе (или аналогичного количества) происходит ускорение оборачиваемости биомассы активных микроорганизмов, однако этого количества внесенного С недостаточно для увеличения роста микроорганизмов. Количество углерода во внесенном субстрате намного меньше, чем содержание углерода в микробной биомассе ускорения оборачиваемости микробной биомассы не происходит. В этом случае может наблюдаться ускорение внутреннего метаболизма с быстрым увеличением респираторной активности. При оценке интенсивности ЗЭ в зависимости от количества внесенного углерода по отношению к С микробной биомассы были выявлены следующие взаимосвязи (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2008). Внесение субстрата, составляющего менее 15% от величины микробной биомассы, вызывало линейное увеличение затравочного эффекта. Микроорганизмы способны потреблять такие субстраты в течение нескольких часов или меньше, и таким образом, внесение малых доз легко доступных субстратов представляет собой импульс, вызывающий переход микроорганизмов в активное состояние. При внесении количества углерода, составляющего 50% и более от количества С в микробной биомассе, интенсивность затравочного эффекта экспоненциально снижается (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2008). Поступление в почву легкодоступного субстрата в достаточных количествах приводит к

росту микроорганизмов в течение 4 - 10 часов (Blagodatskaya, et al., 2007), и заканчивающемся в течение 3 дней, в зависимости от потребляемого субстрата и обогащенности почвы элементами питания. Именно в интервале 1-3 сут наблюдается максимальное проявление ЗЭ, что, вероятно, связано с изменениями микробных сообществ. При внесении количества углерода, в 2-5 раз превышающего содержание С микробной биомассы, величина затравочного эффекта приближается к 0, а в некоторых случаях – к отрицательным значениям. Обычно это связывают с механизмом избирательного потребления внесенного субстрата (*preferential substrate utilization*) (Cheng, Kuzyakov 2005; Kuzyakov, 2002), которое наблюдается при таком уровне внесения доступного субстрата, когда микроорганизмы «переключаются» с минерализации труднодоступного ПОВ на легкодоступный субстрат.

Аналогичные взаимосвязи между проявлением ЗЭ и количеством внесенного субстрата обнаруживаются при внесении растительных остатков (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2008). Наиболее интенсивный ЗЭ наблюдается при внесении растительных остатков, составляющих 4-9% от микробной биомассы (Bell et al. 2003), а экспоненциальное снижение величин ЗЭ происходит с увеличением количества внесенного субстрата. Таким образом, в исследованиях, сравнивающих ЗЭ в разных почвах или горизонтах, должны учитываться величины микробной биомассы, которые могут варьировать в зависимости как от почвенного горизонта, так и от типа почвы.

1.2.3. Источники биофильных элементов, выделяющихся в ходе затравочного эффекта

Одним из главных источников дополнительного выделения питательных элементов при поступлении в почву энергетически обогащенных субстратов является собственно почвенное органическое вещество. Внесенный субстрат активизирует микроорганизмы, способные в ходе разложения внесенного субстрата минерализовать почвенное органическое вещество, тогда как в стерильной почве подобное явление не

обнаруживается (Fiore et al., 1990; Asmar et al., 1994; Jansson, 1958). Вероятно, между ростом и активностью микроорганизмов и возникновением реального затравочного эффекта существует взаимосвязь. Существование тесной положительной корреляции было выявлено между продуцированием экстра-азота или углерода органического вещества почв и увеличением активности ферментов (Asmar et al., 1994). После внесения в почву глюкозы обнаруживается тесная корреляция между азотом, выделяющимся при разложении ПОВ, и внеклеточной активностью ферментов, особенно растворимой протеазы (Asmar et al., 1994). В почвах, достаточно обеспеченных азотом, увеличивалась активность дегидрогеназы, количества протеолитических и аммонифицирующих бактерий на фоне снижения общего содержания почвенного органического вещества. Таким образом, увеличение доступности поступающих субстратов для микробного разложения индуцирует синтез или усиление активности ферментов в ходе ко-метаболизма.

Исследования с применением меченых субстратов способны выявить источник выделяющихся элементов в ходе затравочного эффекта, которым является лабильная (или активная) фракция почвенного гумуса (Sparling et al., 1982; Asmar et al., 1994; Vanlauwe et al., 1994). Однако органическое вещество почв является не единственным источником выделения дополнительного углерода или азота. Применение радиоактивного мечения разных пулов углерода (микробной биомассы, компонентов почвенного органического вещества) позволило выявить, что с внесением растительных остатков и других органических субстратов, дополнительный углерод может выделяться из микробной биомассы (Dalenberg, Jager, 1981).

В возникновении затравочного эффекта участвуют не только почвенные микроорганизмы (Clarholm, 1985a; Griffiths, 1994). Взаимодействие между почвенными микроорганизмами, почвенной фауной и растениями, вероятно, является одним из ключевых моментов в

понимании механизмов ЗЭ. Вещества, выделяющиеся в ходе жизнедеятельности почвенной фауны, могут стимулировать минерализационную активность. Дождевые черви продуцируют муцигели, вызывающие мгновенный ЗЭ (Lavelle, Gilot, 1994; Lavelle et al., 1995). Кроме вышеупомянутого, широко известна и роль растений, увеличивающих активность ризосферных микроорганизмов посредством корневых выделений (Kuikmann et al., 1991; Zagal, 1994; Kuzyakov et al., 2000).

1.2.4. Количественное определение затравочного эффекта

Определение затравочного эффекта основано на исследовании выделяющегося из почвы CO_2 . Количественное определение затравочного эффекта подразумевает использование в экспериментах радиоактивно-меченых субстратов. Изотоп ^{14}C распадается, излучая отрицательно заряженные β - частицы; радиоактивный распад определяют в аликвоте щелочи, внесенной в сцинтилляционную жидкость, используя счетчики ионизирующего излучения. β - частицы, излучаемые образцом, взаимодействуют с молекулами флуоресцирующего вещества, испуская фотоны, которые регистрируются парными фотоумножительными трубками, расположенными напротив друг друга в жидкостном сцинтиляционном счетчике. Впервые количественное определение *реального* затравочного эффекта с использованием ^{14}C меченых субстратов было предложено Shen, Bartha в 1996-1997г (Shen, Bartha, 1997) (уравнение 1. 1), с введением индекса затравочного эффекта (PI):

$$\text{PI}(t) = {}^{14}\text{CO}_2 / \text{net CO}_2 \quad , \quad (1. 1.)$$

где $^{14}\text{CO}_2$ – количество выделившегося $^{14}\text{CO}_2$ в процентах от внесенного, net CO_2 - количество общего CO_2 , выделившегося из почвы (в % от внесенного углерода), рассчитанное по формуле (1.2.4.2):

$$\text{net CO}_2 = (\text{SSR} - \text{BR})/\text{C}_s \times 100\% \quad (1.2),$$

где SSR- общее количество углекислого газа, выделившегося из почвы с субстратом, BR- общее количество углекислого газа выделившегося из почвы без добавления субстрата, C_s - количество углерода во внесенном субстрате.

Этот индекс показывает минерализацию или иммобилизацию углерода и других элементов почвенного органического вещества в пересчете на количество внесенного субстрата, минерализуемого в каждый период времени. Недостаток использования индекса затравочного эффекта заключается в том, что индекс очень чувствителен к начальным стадиям минерализации, в ходе которых выделяется очень мало углерода. С другой стороны, «затравочный индекс» нечувствителен к концу инкубации, когда происходит сдвиг в выделении общего количества CO_2 и $^{14}CO_2$, а общее выделение углекислого газа из почвы превышает 100% относительно внесенного углерода.

Другой способ количественного определения ЗЭ подразумевает расчет разности между общим количеством CO_2 , выделившимся из почв, и количеством меченого $^{14}CO_2$:

$$CO_2^{ПОВ} = (CO_2^{общ} - ^{14}CO_2) - CO_2^{контр} \quad , \quad (1.3.)$$

где $CO_2^{общ}$ – общее количество выделившегося углерода из почвы с субстратом, $^{14}CO_2$ - количество выделившегося меченого углерода субстрата, $CO_2^{контр}$ - количество выделившегося углерода из почвы без внесения субстрата.

Применение меченых субстратов необходимо для разделения в общем выделившемся потоке CO_2 , углерода субстрата и экстра-углерода.

Активизация почвенных микроорганизмов внесением легкодоступных субстратов может инициировать сукцессию процессов, поэтому интерпретацию результатов исследований ЗЭ необходимо производить с учетом интенсивности затравочного эффекта, продолжительности и времени его возникновения, особенностей микроорганизмов, инициирующих ЗЭ,

источников дополнительного поступления элементов. В ходе затравочного эффекта могут протекать следующие процессы:

1. Внесение субстрата, более доступного по сравнению с почвенным органическим веществом, стимулирует наиболее активную часть почвенных микроорганизмов (r-стратегов). Эти микроорганизмы могут пролонгировать свою активность при потреблении естественных субстратов по мере полного использования внесенного субстрата (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2008). Эта фаза зависит от содержания углерода микробной биомассы и от количества внесенного субстрата. В общем случае возможны 3 ситуации:

- а) если количество углерода во внесенном субстрате значительно меньше содержания углерода в микробной биомассе, будет наблюдаться кратковременное увеличение выделения CO_2 из почвенных микроорганизмов, но без изменения самой структуры микробных сообществ и увеличения ферментативной активности;

- б) если количество внесенного углерода меньше, но сравнимо с содержанием углерода микробной биомассы, в почве будет наблюдаться замещение пулов, в отсутствие минерализации почвенного органического вещества;

- в) количество углерода во внесенном субстрате намного превышает содержание углерода в микробной биомассе; в этом случае микроорганизмы будут потреблять внесенный субстрат (избирательное потребление), и минерализация не затронет ПОВ (Billes et al., 1988; Cheng, 1999; Sparling et al., 1982).

Первые два случая зачастую приводят к возникновению *кажущегося* ЗЭ, не связанного с дестабилизацией почвенного органического вещества. Эти 2 ситуации возможны в интервале 1-5 сут, тогда как в третьем случае могут возникать следующие процессы:

2. Наиболее активная часть микробного сообщества будет использовать внесенный субстрат, увеличивая свою активность и рост. Эта фаза получила название «микробная активация» (Cheng, Coleman 1990; De

Nobili et al., 2001; Helal, Sauerbeck 1984; Sallih 1988). В ходе этой фазы происходят изменения в составе микробных сообществ, например, развитие грибных популяций. Минерализация почвенного органического вещества в этой фазе осуществляется благодаря увеличившейся микробной активности.

3. По мере истощения доступного субстрата, микроорганизмы в ходе кометаболизма путем синтеза внеклеточных ферментов будут потреблять труднодоступные соединения (Kuzuakov, Bol, 2006), то есть на этом этапе будет наблюдаться реальный затравочный эффект.
4. В итоге, активность и величина микробной биомассы будут снижаться до исходного состояния таким образом, что равновесие между доступным пулом ПОВ и микробным сообществом, его минерализующим, будет восстанавливаться в течение нескольких дней или недель (Stenstrom et al., 2001; Kuzuakov, Bol, 2006).

Альтернативным способом определения затравочного эффекта является применение «обратного мечения». Почти все исследования ЗЭ основываются на добавлении к немеченому ПОВ радиоактивно меченого субстрата. Внесение немеченого субстрата к ^{14}C - ПОВ позволит значительно снизить ошибки, поскольку выявление ЗЭ будет осуществляться буквально в одно действие (Kuzuakov, 2010). Кроме того, применение обратного подхода поможет идентифицировать пулы органического вещества.

1.3. Роль ферментативной активности в проявлении затравочного эффекта

1.3.1. Ферментный пул в почвах

Биохимическое превращение гумусовых веществ протекает с участием внеклеточных ферментов почвенных микроорганизмов. Ферменты поступают в почву из микроорганизмов, растений и почвенной фауны в виде прижизненных выделений и после отмирания организмов при разрушении тканей и лизисе клеток. Часть этих ферментов подвергается протеолизу, а

другая часть связывается с почвенными минералами, образуя иммобилизованный ферментный пул в почве. Общий ферментный пул состоит из сложного комплекса источников по локализации и состоянию ферментов. Принято выделять следующие составляющие ферментного пула (Хазиев, 2005):

1. Ферменты, функционирующие внутри живых клеток.
2. Ферменты, локализованные в периплазматическом пространстве живых клеток.
3. Ферменты, прикрепленные к внешней поверхности клеток, активные центры которых свободны и направлены наружу.
4. Ферменты, синтезируемые микроорганизмами в ходе жизнедеятельности.
5. Ферменты внутри неделящихся клеток.
6. Ферменты, локализованные внутри мертвых клеток.
7. Ферменты, выделяющиеся из функционирующих или лизирующихся клеток.
8. Ферменты, временно связанные в нерастворимые или растворимые субстрат-ферментные комплексы.
9. Ферменты, адсорбированные на поверхности глинистых минералов.
10. Ферменты, связанные с гумусовыми коллоидами.

Группы ферментов в категориях 9 - 10 относят к иммобилизованному в почве ферментному пулу. Ферменты, объединенные в категориях 5 - 10, относят к накопленным ферментам. При исследовании проявления затравочного эффекта наибольший интерес представляет активность внеклеточных ферментов, продуцируемых микроорганизмами в ходе жизнедеятельности. Вследствие сложной структуры почвенного органического вещества его разложение может осуществляться процессами, инициированными внеклеточным гидролизом и завершенными внутриклеточно (Хазиев, 2005; Blagodatskaya, 2008; Якушев, 2014). Внеклеточное и внутриклеточное разложение органического вещества включает ферментативный гидролиз, поэтому микробный ферментативный

отклик может быть важным признаком при выявлении механизмов проявления затравочного эффекта.

Активность внеклеточных ферментов класса гидролаз (глюкозидазы, пептидазы) и оксидоредуктаз играют важную роль в разложении органического вещества почв и возникновении реального затравочного эффекта (Fontaine, 2004).

Высокая активность целлюлолитических ферментов, таких как β -глюкозидаза, отражает конечные стадии разложения органического вещества, тогда как увеличение активности лигнолитических ферментов (фенолоксидазы, фенолпероксидазы), вероятно, характерно для начальных стадий разложения органического вещества (Carreiro et. al., 2000). В таблице 1.2. приведены сведения об активности ферментов класса гидролаз в ходе затравочного эффекта и возможные продуценты внеклеточных ферментов. Увеличение внутриклеточной активности в отсутствие усиления внеклеточной ферментативной активности может наблюдаться в ходе проявления кажущегося ЗЭ, вызывая усиление собственного метаболизма (Рис.1.3) (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2008). Таким образом, тип ферментов, активированных внесением субстрата в ходе выделения экстра азота и углерода может применяться для разделения *кажущегося* и *реального* затравочных эффектов.

Таблица 1.2. Особенности активности ферментов класса гидролаз в ходе затравочного эффекта (Кузяков, 2011).

Название фермента	Функции	Продуценты фермента	Ферментативная активность в ходе ЗЭ	Ссылки на источник
β -D- глюкозидаза КФ 3.2.1.21	Отщепление глюкана от целлюлозных цепочек	грибы, бактерии	Увеличивалась или была без изменений. Проявлялась на начальных стадиях разложения ПОВ	(Carreiro et. al., 2000) (Mondini et al., 2006)
Хитиназа КФ 3.2.1.14	Гидролиз хитина до хитоолигосахаридов	грибы, бактерии, растения	В ходе <i>реального</i> ЗЭ активность увеличивалась, характерна для начальных стадий разложения труднодоступного субстрата	(Parcham, Deng, 2000)
Целлобиогидролаза КФ 3.2.1. 91	Гидролиз 1,4- β -D-глюкозидных связей целлюлозы с образованием целлобиозы	Грибы, бактерии и простейшие	Увеличивалась. Активность проявлялась на конечных стадиях разложения труднодоступного ПОВ	(Carreiro et. al., 2000)
Ксиланаза КФ 3.2.1. 8	Гидролиз линейных полисахаридов (гемицеллюлозы) с образованием ксилана	Травоядные микроорганизмы грибы	Активность увеличивалась. Проявлялась на конечных стадиях разложения ПОВ	(Kandeler et al., 1999)

Несмотря на несомненные успехи в последние десятилетия, проблема разделения активности внутри- и внеклеточных ферментов все еще остается нерешенной (Хазиев 2005, Sowerby 2005). Изменения в активности ферментов в ходе сукцессии микроорганизмов, вызванной внесением свежего субстрата, могут служить объяснением наблюдаемых затравочных эффектов (Conde et al., 2005; Degens, Sparling 1996; Hamer, Marschner 2005). Однако, некоторые исследователи полагают, что внеклеточные ферменты в почве находятся в стабилизированном состоянии и не принимают участия в возникновении затравочного эффекта (De Nobili et al., 2001). Производство свободных внеклеточных ферментов осуществляют активные почвенные микроорганизмы. Свободные внеклеточные ферменты кратковременно могут пребывать в свободном состоянии они могут сорбироваться на поверхности или связываться с почвенными минералами (Nannipieri et al., 2002; Renella et al., 2005).

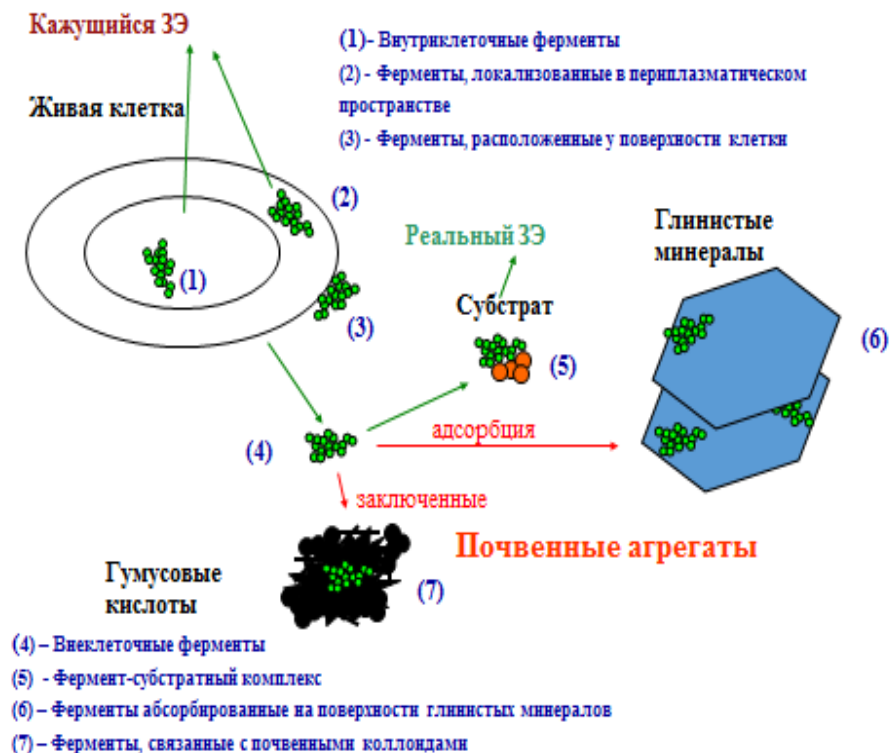


Рисунок 1.3. Локализация ферментов в почвах и затравочный эффект.

Увеличение активности ксиланазы, протеазы и щелочной фосфатазы в ходе реального затравочного эффекта связано с деятельностью грибов (Kandeler et al., 1999). Кроме того, разделение кажущегося и реального затравочного эффекта можно проводить по типу продуцента ферментов. В связи с этим было предложено применять активность β -глюкозидазы в качестве индикатора грибной активности, поскольку именно этот фермент сильно коррелировал с грибной биомассой (Miller et al., 1998; Parham, Deng, 2000). Характерной особенностью активности β -глюкозидазы является ее широкий спектр специфичности и множество источников просихождения фермента в почве. Поэтому активность β -глюкозидазы и ряда ферментов, продуцируемых широким спектром микроорганизмов, не может служить индикатором преобладания той или иной биомассы в почве (Carreiro et al., 2000; Six, Jastrow, 2002).

1.3.2. Методы определения ферментативной активности в почвах

Современные методы определения потенциальной ферментативной активности почвенных микроорганизмов основаны на учете количества продуктов ферментативной реакции или количества преобразованного субстрата в оптимальных условиях среды: температуры, влажности, реакции среды, количества субстрата, навески почвы и времени инкубации. Существует ряд методов, позволяющих определить концентрацию продуктов реакции: фотометрические, химические, колориметрические, полярометрические и прочие (Хазиев, 2005).

Многие субстраты и продукты ферментативных реакций способны поглощать свет либо в видимой, либо в ультрафиолетовой области спектра. Наиболее широко применяются методы, основанные на анализе высвобожденного продукта. Ферменты, участвующие в цикле С (ксиланаза, целлюлаза, инвертаза и трегалаза), измеряются на основе высвобождения сахаров после инкубации почв с буферным раствором (рН 5,5), содержащим соответствующие субстраты (ксилан, карбоксиметилцеллюлоза, сахароза или трегалоз). Инкубационный период

зависит от используемого субстрата: высокомолекулярные субстраты инкубируют в течение 24 ч, тогда как низкомолекулярные субстраты инкубируют в течение 1-3 ч (Kandeler, 2015).

Флюорогенные субстраты используются для определения активности внеклеточных ферментов. Эти субстраты содержат искусственную флуоресцентную молекулу и одну или несколько естественных молекул (например, глюкозу, аминокислоты), и они связаны определенным типом связи. Используемые субстраты представляют собой конъюгаты высокофлуоресцентных соединений 4-метилумбеллиферона (MUF) и 7-амино-4-метил кумарина (АМС). Маркс с соавт. (Marx et al., 2001) использовали этот метод для измерения активности ферментов, участвующих в цикле С (β -D-глюкозидаза, β -D-галактозидаза, β -целлобиаза, β -ксилозидаза), азотном цикле (лейцин-аминопептидаза, аланинаминопептидаза, лизин-аланин-аминопептидаза), цикле фосфора (кислая фосфатаза) и серы (арилсульфатаза). Флуорогенные субстраты не токсичны и поступают в почвенные суспензии в больших или увеличивающихся количествах для измерения максимальной скорости гидролиза (v_{max}). Флуоресценция наблюдается после ферментативного расщепления сложных молекул (рис. 1.4.).

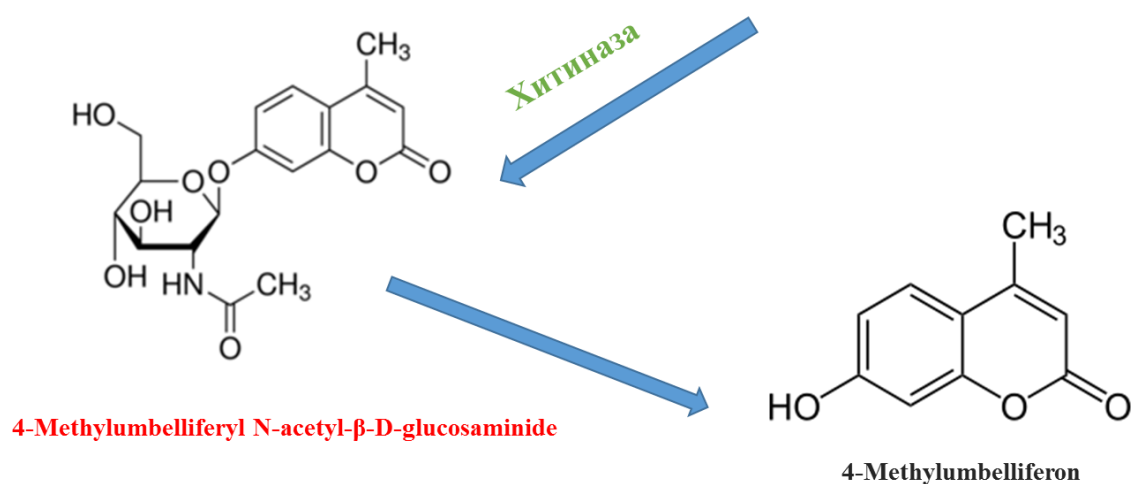


Рисунок 1.4. Ферментативная реакция разложения субстрата (справа на рисунке) с высвобождением флуоресцирующего соединения (левая часть рисунка).

Сравнение флуорометрического и стандартного колориметрического метода определения энзимной активности, основанное на использовании *p*-нитрофенильных субстратах, позволило получить схожие значения максимальной скорости для фосфатазы и β -глюкозидазы ($v_{\max}$), но сродство к соответствующим субстратам (как показано значениями K_m) было на два порядка выше для 4-метилумбеллиферильных субстратов по сравнению с *p*-нитрофенильными субстратами (Marx et al., 2001). Высокая чувствительность флуорометрического определения ферментативной активности дает возможность обнаружить активность ферментов при небольших количествах образцов (например, микроагрегаты и образцы ризосферы) или в образцах с низкой активностью (почвенные растворы).

1.3.3. Механизмы реального затравочного эффекта и активность ферментов

Причинно-следственные взаимосвязи между активностью ферментов и разложением органического вещества почв до сих пор остаются не выявленными (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2008). Вероятно, это связано с измерением потенциальной, а не реальной ферментативной активности в почвах. Усиление или подавление активности внеклеточных ферментов в ходе минерализации органического вещества необходимо учитывать для понимания взаимосвязи между активностью внеклеточных ферментов, направленностью и степенью выраженности затравочного эффекта. В литературе встречаются данные о двух механизмах активности внеклеточных ферментов в ходе минерализации почвенного органического вещества. Первый механизм заключается в том, что внесение доступного субстрата в почву активирует микробный синтез внутри- и внеклеточных ферментов дегидрогеназы, протеазы и кислой фосфатазы (Marinari et al., 2000). Сущность второго механизма состоит в том, что свежий субстрат, инициирующий возникновение затравочного эффекта, может служить энергетическим источником для продуцирования внеклеточных ферментов с последующим усилением разложения ПОВ (Schimel, Weintraub, 2003). Реальный прайминг-эффект зависит от качества добавленного субстрата, который

используют микроорганизмы. Дефицит некоторых элементов питания (азота) может быть восполнен ускоренным разложением почвенного органического вещества, приводящим к реальному затравочному эффекту. Таким образом, активность внеклеточных ферментов является или источником, или следствием затравочного эффекта. Для проверки первой гипотезы исследователи (Shackle et al., 2006) вносили в почву ферменты и наблюдали усиление биodeградации органического вещества. Таким образом, интерпретация механизмов ЗЭ должна основываться на усилении ферментативной активности, изменениях микробной биомассы и дыхания микроорганизмов при разложении почвенного органического вещества.

1.4. Зависимость затравочного эффекта от ростовых характеристик микроорганизмов и структуры почвенного микробного сообщества

Внесение свежего доступного субстрата активизирует рост ранее неактивных микроорганизмов, способных минерализовать легкодоступный субстрат и увеличивать рост активных популяций микроорганизмов. Экологическая структура микробного сообщества согласно Д.Г.Звягинцеву с соавторами (Звягинцев, 1981; Полянская, 1988), определяется различным отношением микроорганизмов к экологическим факторам. В процессе адаптации к внешним воздействиям перестройки, происходящие в микробном сообществе почв, могут приводить к изменению доминирующей экологической стратегии. Благодатской с соавт. дано следующее определение понятия «стратегия роста» относительно почвенного микробного сообщества – «комбинация ростовых характеристик, обеспечивающих микробной популяции преимущество в конкуренции в изменяющихся условиях окружающей среды» (Благодатская и др., 2016).

Выделяют две основные первичные стратегии, которые эволюционно закрепились у микроорганизмов в результате естественного отбора (табл. 1.3.). К r-стратегам относятся микроорганизмы, приспособленные к росту, не ограниченному емкостью среды. Такая ситуация характерна для почвы или ее отдельных микронизон, в которые поступающий избыток субстрата создаёт условия

неограниченного роста для голодающей популяции (Благодатский, 1994; Благодатская, 2001).

Таблица 1.3. Характеристики, определяющие доминирующую стратегию микроорганизмов

Измеряемая экспериментально характеристика	r-стратегии	K-стратегии
Константа сродства к субстрату, K_s	высокая	низкая
Удельная скорость роста микроорганизмов, μ_m	высокая	низкая
% растущей биомассы в условиях недостатка субстрата, $(r_0)*100\%$	очень низкая	низкая
Эффективность потребления субстрата	низкая	высокая

И наоборот, когда в результате экологических катаклизмов происходит отмирание большей части популяции и субстрат оказывается в избытке в расчете на единицу биомассы микроорганизмов. В таких условиях преимущество получают микроорганизмы с более высокой скоростью роста. Эти виды сформировались в процессе эволюции в достаточно изменчивой среде, в которой постоянно или периодически действует стресс-факторы (Jones et al. 2001). Конкуренция за ресурсы в таких местообитаниях ослаблена, и, в результате, естественный отбор способствует максимальному вкладу вещества и энергии в размножение с целью продуцирования как можно большего числа потомков. В случаях, когда рост микроорганизмов ограничен вследствие дефицита ресурсов, в более выгодных условиях оказываются K-стратегии, ферментные транспортные системы которых обладают высоким сродством к субстрату и позволяют таким микроорганизмам расти при низкой концентрации субстрата в среде. Высокая эффективность роста и меньшие траты на поддержание также дают K-стратегам преимущество при конкуренции в условиях повышенной популяционной

плотности. Микроорганизмы r-стратегии, отличающиеся более высокой скоростью отмирания в таких условиях, проигрывают в конкурентной борьбе, и их численность снижается до минимальных величин.

Микроорганизмы, специализирующиеся на разложении легкодоступного субстрата, характеризуются быстрым ростом и относительным доминированием микроорганизмов с r-стратегией (Paul, Clark 1989; Fontaine et. al 2007). Таким образом, при внесении доступного субстрата активными становятся микроорганизмы r-стратегии, которые и потребляют этот субстрат, при этом скорость минерализации собственно почвенного органического вещества остается относительно постоянной. Увеличение скорости разложения почвенного органического вещества происходит в случае активизации микроорганизмов с K-стратегией, медленно растущих, наиболее эффективно потребляющих субстрат и специализирующихся на минерализации почвенного гумуса. В этом случае микробная конкуренция будет определять величину затравочного эффекта. Внесенный легкодоступный субстрат частично может потребляться микроорганизмами с K-стратегией, которые при этом увеличивают свою активность и рост популяции, и таким образом, усиливают минерализацию почвенного органического вещества (Fontaine et. al., 2003). Активация той или иной группы микроорганизмов - деструкторов зависит от обогащенности почвы элементами питания. Так, некоторыми исследователями показано, что при избыточном содержании питательных элементов в почве с внесением субстрата относительное доминирование получают микроорганизмы с r-стратегией, тогда как при дефиците элементов питания в почве эти микроорганизмы развиваются медленнее, и преимущество получают K-стратегии (Fontaine et. al., 2007).

Для характеристики ростовых стратегий микроорганизмов принято использовать величину константы насыщения K_s , определяющую сродство ферментных систем микроорганизмов к субстрату. Высокое сродство (при низких значениях K_s) присуще микроорганизмам с K-стратегией, а низкое сродство - r-стратегам. При выявлении особенностей функционирования микробного компонента часто применяют кинетический подход. Например, по скорости

разложения вносимой в почву глюкозы (или иного субстрата) можно определить величину максимальной удельной скорости роста, то есть параметра, определяющего доминирующую стратегию (Panikov, 1996). Для К-стратегов характерны более низкие величины удельной скорости роста по сравнению с г-стратегами.

Поступление субстрата способно вызывать качественные изменения в структуре микробных сообществ (Blagodatskaya et al., 2007). В зависимости от качества и количества внесенного субстрата, активируются определенные виды почвенных микроорганизмов (Bell et al., 2003; Blagodatskaya et al., 2007; Falchini et al., 2003; Kramer, Gleixner 2006; Landi et al., 2006). Состав почвенного микробного сообщества может изменяться, что приводит к затравочному эффекту. Однако изменения в структуре микробных сообществ незначительно влияют на скорость минерализации почвенных азота и углерода, поскольку большинство обитающих в почве микроорганизмов способны участвовать в процессе разложения С- и N-содержащих соединений в почве и, таким образом, высвобождения этих элементов (Nannipieri et al., 2003). Вопрос о том, какие группы микроорганизмов участвуют в ЗЭ, остается открытым. Некоторые результаты исследований с применением профилей жирных кислот фосфолипидов (PLFA) показали, что первыми улавливают и метаболизируют поступающий в почву легкодоступный субстрат бактерии (Paterson et al., 2007). Это приводит к ускорению оборачиваемости микробной биомассы и возникновению *кажущегося* ЗЭ. По мере использования доступного субстрата, дальнейшую минерализацию ОВ, вероятно, осуществляют другие группы микроорганизмов. Одной из таких групп могут быть грибы К-стратеги, специализирующиеся на использовании труднодоступного субстрата, который практически не поддается бактериальному разложению. Однако постулирование того, что реальный ЗЭ инициируют исключительно грибы, неверно. Исследованиями с применением ¹³C-PLFA доказано, что в возникновении реального ЗЭ участвуют грамотрицательные бактерии (Nottingham et al., 2009). Следовательно, обе группы микроорганизмов

способны преобразовывать субстраты с разной степенью доступности и приводить к возникновению ЗЭ.

По характеру изменений в структуре микробных сообществ можно прогнозировать проявление *кажущегося* или *реального* затравочного эффекта на разных уровнях внесения субстрата. Так, можно полагать, что при внесении глюкозы в количестве намного меньше содержания углерода в микробной биомассе никаких изменений в структуре микробных сообществ не произойдет, при этом будет наблюдаться внутренняя активация быстрорастущих микроорганизмов r-стратегов, инициирующих проявление кажущегося затравочного эффекта (Blagodatskaya et al., 2008). После внесения малых доз глюкозы, наблюдаемый затравочный эффект является результатом активации неспецифической физиологически активной на момент внесения микрофлоры. Внесение других легкодоступных субстратов может активировать специализирующихся на минерализации внесенного субстрата микроорганизмов, которые также могут принимать участие в возникновении затравочного эффекта. В почве после внесения глютаминовой кислоты обнаруживались группы глутамат-потребляющих бактерий, тогда как внесение такого же количества глюкозы (вызывающей положительный ЗЭ) не приводило к изменению внутри структуры микробных сообществ (Falchini et al., 2003).

Внесение труднодоступных органических субстратов (например, щавелевой кислоты) должно активировать микроорганизмы, осуществляющие разложение таких субстратов, находящихся в почве преимущественно в покое состоянии. Микроорганизмы, активированные внесением труднодоступного субстрата, способны расти и доминировать при разложении почвенного органического вещества в ходе ко-метаболизма, то есть вызывать реальный затравочный эффект (Falchini et al., 2003; Liu, 1998).

Если количество внесенного сложного субстрата (труднодоступного) является достаточным для роста микроорганизмов, конечная сукцессия микробных популяций может вызывать различные виды затравочного эффекта (Щапова, 2004). В ходе минерализации субстрата изменяется как специфическая

скорость роста разных микробных групп, так и доминирование той или иной группы микроорганизмов (Baudoin et al., 2003). Рост быстрорастущих видов, осуществляющих разложение легкодоступных соединений, наблюдается в виде мгновенного отклика на внесенный субстрат (Blagodatskaya et al., 2007) и, как правило, является результатом активации микроорганизмов, способных разлагать труднодоступные субстраты (Chaves et al., 2006; Landi et al., 2006) или активации медленно растущих микроорганизмов К-стратегов - деструкторов почвенного органического вещества (Fontaine et al., 2003), которые ответственны за возникновение реального затравочного эффекта.

Долговременное существование микроорганизмов в условиях субстратного лимитирования вызывает снижение активности, несмотря на разнообразие микробного сообщества. Значительное увеличение в продуцировании CO_2 наблюдается в почвах, долгое время существовавших при дефиците поступления свежего субстрата, например, в минеральных или погребенных горизонтах почв (Fontaine et al., 2007; Hamer, Marschner, 2005). В таких почвах развиваются олиготрофные микроорганизмы, приспособившиеся к дефициту доступного субстрата в результате наличия соответствующего набора метаболических путей. Внесение свежего углерода в виде корневых выделений, растительных остатков или низкомолекулярных соединений может активировать покоящиеся микроорганизмы, способные синтезировать ферменты, разлагающие почвенное органическое вещество.

1.5. Качество поступающего в почву субстрата и затравочный эффект

В качестве затравочного агента в почву вносят различные субстраты. Например, легкодоступные сахара, внесенные почву, могут имитировать корневые выделения, в состав которых они входят. Качество субстрата определяет направленность и степень выраженности затравочного эффекта. Разложение легкодоступных углеродных источников (глюкозы, аланина, фруктозы) приводит к большему затравочному эффекту по сравнению с внесением низкомолекулярных труднодоступных соединений, таких как катехол,

щавелевая кислота, растительные остатки и навоз (Conde et al., 2005; Hamer, Marschner, 2005; Jones, 1998). Среди легкодоступных субстратов - глюкоза инициировала меньший ЗЭ, чем глютаминовая кислота (Mondini et al., 2006). Новейшие исследования показали, что в зависимости от химического состава растительных остатков (труднодоступного субстрата), вносимых в почву, наблюдается или стимулирование, или ингибирование разложения устойчивого почвенного органического вещества (Chao et al., 2019; Шарков, 2004). Например, на ранней стадии минерализации подстилки при высоком содержании гемицеллюлоз и низком содержании танинов во внесенном субстрате происходило усиление ЗЭ. При внесении полуразложившейся подстилки стимулирование ЗЭ происходило за счет повышенного содержания в подстилке кальция, калия и магния, а ингибирование ЗЭ при наблюдалось при высокой концентрации лигнина.

Количество экстра-углерода зависит и от содержания доступного азота в почве. При внесении доступного азота с органическим углеродом в почву наблюдалось снижение интенсивности затравочного эффекта (Blagodatskaya et al., 2007; Martin-Olmedo et al., 2002). Это снижение было связано с механизмом избирательного потребления субстрата (микроорганизмы использовали внесенный субстрат) в присутствии достаточного количества азота. В случае внесения обогащенного углеродом субстрата без азота активизировались микроорганизмы, минерализующие почвенный гумус, извлекая недостающий азот из ПОВ в ходе *реального ЗЭ*. Однако было показано, что совместное внесение глюкозы, растительных остатков и доступного азота тоже инициировало *реальный ЗЭ* (Conde et al., 2005; Hamer, Marschner, 2005). Продукция ферментов, участвующих в оборачиваемости азота и углерода, контролируется внесением доступных С и N (Carreiro et al., 2000; Chander et al., 1997). Так, внесение азота стимулировало активность целлюлазы, тогда как активность фенолоксидазы (важного лигнинолитического фермента) значительно снижалась на фоне увеличения доступности азота (Carreiro et al., 2000). Аналогичное влияние на активности амидогидролаз (Deng, Tabatabai, 1996) и других ферментов,

участвующих в минерализации азота, оказывало содержание углерода в почвах. Таким образом, внесение малых доз легкодоступных соединений приводило к кратковременному «сигнальному эффекту», тогда как обогащение почв доступным субстратом (без внесения других питательных элементов) – к возникновению реального затравочного эффекта в почвах. Для возникновения ЗЭ в почвах не только качество и количество субстрата имеет значение. Такие свойства почв как аэрация, агрегатный состав, pH так же важны в возникновении ЗЭ. Например, отмечено, что при постоянном доступе кислорода 72% ^{14}C -глюкозы встраивалось в микробную биомассу (Santrukova, 2004). Продemonстрировано, что время оборачиваемости углерода в макроагрегатах короче по сравнению с микроагрегатами (Degens, 1996).

Основная масса расчетов ЗЭ, основанных на выделении CO_2 из почвы, может приводить к значительным погрешностям, если пренебречь влиянием pH на растворимость CO_2 в почвенном растворе. Равновесное соотношение между формами, образующимися при растворении CO_2 (H_2CO_3 , CO_3^{2-} и HCO_3^-) зависит от pH, что приводит к необходимости учитывать кислотность почвы при интерпретации количеств выделившегося CO_2 .

1.6. Влияние растительных остатков и пирогенно-трансформированного растительного материала на ускорение минерализации почвенного органического вещества (ЗЭ)

Основная часть углерода поступает в почву с растительными остатками (Блгодатский, 1993; Благодатский, 2004), которые на фоне увеличения площади и количества неконтролируемых пожаров подвергаются пирогенной трансформации, и в виде пирогенного материала также поступают в почву. В большинстве регионов России, несмотря на действующее законодательство о запрете (КоАП РФ ст. 8.32, ст. 20.4), проводят сезонные травяные палы с целью избавления от прошлогодней стерни на пашнях и стимулирования роста растений на пастбищах. Сезон массовых палов растительности начинается ранней весной после схода снега и длится три –четыре недели до начала вегетации растений. В

течение ранневесеннего сезона травяные палы охватывают большие площади, чем торфяные или лесные пожары, и распространяются намного быстрее. Исследователями показано, что почвы пасечных участков вырубок и лесные почвы, пройденные беглыми низовыми пожарами, возвращаются к близкому к исходному состоянию в течение десятилетий. Возврат к исходному состоянию при наличии механических нарушений при рубках, сельскохозяйственном освоении и пожарах высокой интенсивности в ходе первого столетия не наблюдается (Старцев В. В., 2017; Дымов, 2018).

В связи с тем, что наибольшие изменения микробных сообществ отмечаются после пожаров высокой и средней интенсивности (Fernandez et. Al., 1999; Сорокин, 1993), исследованиям последствий палов травянистой растительности, в результате которых почва не подвергается термическому воздействию, частично выгорают растительный покров, растительный опад и подстилка и в почву попадает пироженно-преобразованный растительный материал, уделяется мало внимания. Вместе с тем, последствие пожаров низкой интенсивности, выражающееся в изменении содержания элементов минерального питания в верхних почвенных горизонтах, может оказаться значительным. Показано, что независимо от интенсивности и продолжительности палов, в первый год последствия выражаются в негативном влиянии на структуру, биохимическую и функциональную активность микробных сообществ почв (Богородская и др., 2009). Активность почвенных микроорганизмов, минерализующих углерод органического вещества почвы, является одним из основных факторов, определяющих баланс улекислого газа в атмосфере (Ананьева, 2002; Blagodatskaya et al., 2009; Fontaine et. al., 2007). Минерализационная активность микроорганизмов, в свою очередь, зависит от количества и качества органических соединений, поступающих в почву с растительным опадом (Ананьева, 2009). Усиление интенсивности микробного дыхания в почвах после пожаров происходит вследствие активной минерализации пироженно-трансформированного органического вещества растительного, животного и микробного происхождения и вымывания продуктов пиролиза в

нижележащие почвенные горизонты (Богородская и др. , 2009). Под действием огня растительный материал подвергается трансформации, изменяются его качество и доступность. Установлено, что при воздействии огня слабой интенсивности происходит усиление ароматичности в структуре соединений погибших от огня, но не сгоревших растений. Исследования других авторов показали, что в составе пирогенного угля (после малоинтенсивных пожаров) при неполном сгорании органического вещества обнаруживаются соединения с функциональными группами, свидетельствующими об их происхождении из полисахаридов, лигнина, алифатических и гетероциклических соединений (Kniker, 2007; Hillsher et. al., 2000).

Поступление в почву продуктов неполного сгорания растительных остатков может усиливать минерализацию почвенного органического вещества, вызывая затравочный эффект. В результате подобной интенсификации процессов минерализации в атмосфере увеличивается содержание углекислого газа. Возможным результатом затравочных взаимодействий является формирование отрицательного углеродного баланса в почве (Blagodatskaya et al., 2009) и омоложение почвенного гумуса (Kuzuakov, Bol, 2006).

Зачастую травяные палы охватывают и прилегающие лесные участки, при этом выгорает лесная подстилка. Пирогенно-преобразованный материал лесной растительности отличается от послепожарного материала луговых растений. Различия в качестве пирогенных субстратов могут обусловить различия в трансформации не полностью сгоревших растительных остатков леса и луга почвенными микроорганизмами. Поступление пирогенно-измененных субстратов может инициировать перестройки внутри микробных сообществ почв, приводящие к изменению ростовых характеристик.

ГЛАВА 2. Объекты и методы

2.1. Описание объектов

Объектами исследований служили современные и погребенные серые лесные почвы Московской области и подзолистые почвы Тюменской области. Затравочный эффект исследовали при внесении глюкозы в современные и погребенные почвы подзолистые и серые лесные почвы, влияние микрорельефа на ЗЭ определяли в серых лесных почвах; влияние качества субстрата на минерализацию ПОВ исследовали в серых лесных почвах, обогащенных растительными остатками и пирогенно-трансформированным растительным материалом в эксперименте.

Исследовали современные и погребенные подзолистые почвы средневекового поселения IX-X вв н.э. «Вынгаяха 7», (Ямало-Ненецкий АО, Пуровской р-н, рис. 5). В эксперименте использовали современные - верхние органогенные горизонты О (0 - 4) и О к.с. (0 - 2 см) культурного слоя и минеральный горизонт В (45 - 80 см) подзолистой почвы, а также их погребенные аналоги: гор. [О] (23 - 30 см), гор. [В] (55 - 70 см). Сравнение определяемых показателей проводили между фоновыми органогенным (Розанов, 1983) и минеральным горизонтами О (0 - 4 см) и В (45 - 80 см), а также между современными О (0 - 4 см) В (45 - 80 см) и погребенными [О] (23 - 30 см) [В] (55 - 70 см) почвенными горизонтами. (Приложение 1, фотография 1; таблица 1 Приложение 1).

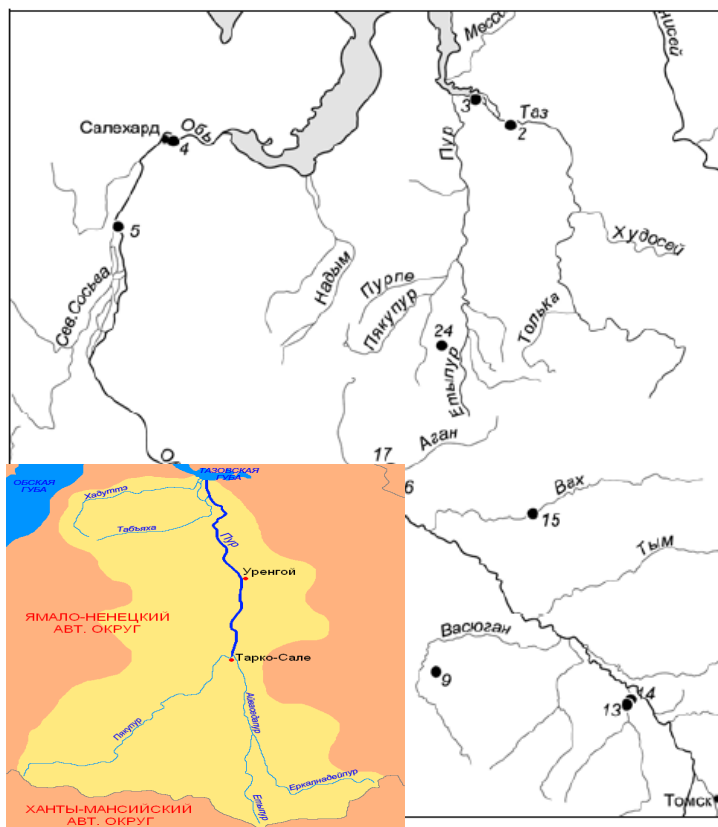


Рисунок. 2.1. Схема расположения объектов исследования.

Проявление затравочного эффекта в зависимости от микрорельефа изучали на образцах серых лесных современных и погребенных почв микроповышения (блока) и микропонижения (межблочья), Московской области, Серпуховского района, расположенные в 3 км к югу от д. Б. Грызлово. В эксперименте исследовали современные гумусовые горизонты – A1 (1 - 7 см) на блоке и A1 (1 - 8 см) в межблочье, а так же их погребенные аналоги – [A1] (190 - 230 см) блок и [A1] (135 - 180 см) межблочье. Сравнение проводили между A1 горизонтами фоновых серых лесных почв, а также между погребенными аналогами. Реликтовый полигонально-блочный микрорельеф (Приложение 2, фотография 1), образовавшийся в позднеплейстоценовое время 14 – 16 тыс.л.н., сохранился до настоящего времени в виде округлых почвенных блоков со средней высотой в 60 см и разделяющих их межблочных понижений (Алифанов, 1998).

Климатические условия в зоне распространения подзолистых почв.

Главная особенность климата зоны распространения подзолистых почв заключается в преобладании количества осадков над их испарением. Количество осадков в разных частях территории непостоянно: в Европейской части их выпадает около 600 мм в год, в Западной Сибири — 425 – 565 мм. Среднегодовые температуры изменяются от +4°C в Европейской части, до -10°C в Якутии. Продолжительность теплого периода со среднесуточной температурой выше 10° — от 40 до 155 дней. Сумма температур выше 10° также различна — от 400° до 2400°C. Исследуемые современные и погребенные подзолистые почвы расположены в Западной Сибири, которая в отношении рельефа представляет собой обширную, слабодренированную равнину. Западно-Сибирская равнина в северной части покрыта ледниковыми наносами, которые сменяются южнее (к югу от широтного течения р. Оби) древними озерно-аллювиальными наносами. Растительность представлена формациями: древесной — лесной и травянистой — луговой и болотной. Среднетаежные леса представлены густыми ельниками и пихтарниками, встречаются также чистые насаждения из сосны, с наземным покровом из зеленых мхов. Морфологическая характеристика серой лесной почвы приведена в таблице 1 «Приложений».

Климатические условия в зоне распространения серых лесных почв.

Климат в зоне исследований умеренно-континентальный с прохладным влажным летом и холодной зимой, а также достаточным увлажнением. Характерной особенностью является непостоянство погоды на протяжении года. Средняя температура самого холодного месяца января -10°C, самого теплого июля +18,8°C. Период с температурой выше +10° длится 140 - 146 дней, выше +5° - 180 дней. Сумма температур выше +10° равна 2200°. Коэффициент увлажнения за май – сентябрь равен 1,3, показатель увлажнения – около 0,45. Средняя годовая сумма осадков 550 - 570 мм. Водный режим периодически промывного, а местами - промывного типа. Максимальное и минимальное количество осадков в экстремальные годы составляет соответственно 770 мм и 380 мм. Резко засушливые годы повторяются примерно каждые 3 - 4 года. С 20 апреля

начинается период вегетации. Характерной чертой Южного Подмосковья являются заморозки, которые обычно начинаются 22 сентября, а прекращаются 19 мая. Почвы промерзают до 60 см и глубже. В последние годы глубокое промерзание почвы - достаточно редкое явление. Как правило, преобладают северные и северо-западные ветры. Устойчивый снежный покров высотой до 40 см образуется в конце ноября.

Окрестности г. Пущино расположены на Средне-Русской возвышенности. Территория Опытной-полевой станции характеризуется значительным расчленением рельефа и комплексностью почвенного покрова, измененного в результате антропогенной деятельности (Алифанов, 1979). Основные компоненты – водораздельные участки, овражно-балочная сеть, террасно-долинный комплекс р. Оки и ее притоков. В морфоструктурном плане территория Пущинского района относится к северному своду Воронежской антеклизы у границы с Московской синеклизой. Абсолютные отметки 200 - 250 м. Овражно-балочная сеть сильно разветвлена. Чаще всего встречаются овраги, относящиеся к слабо развивающимся овражным формам. Склоны падают под углом естественного откоса (35 - 40°) и подвергаются оплыванию и плоскостному смыву (Макушина, 1990).

Почвообразующие породы разнообразные: карбонатные и бескарбонатные лессовидные суглинки и глины, моренные суглинки и глины. Серые лесные почвы развиваются без влияния грунтовых вод, залегающих глубже 8 - 12 м. Суглинки залегают на флювиогляциальных и моренных отложениях. Цвет суглинков чаще всего палевый с пятнами и разводами светло-охристого цвета. Лёссовидные суглинки имеют очень плотное сложение в сухом состоянии, они тонко и сильно пористые, в них встречаются трещины (Алифанов, 1995). Морфологическая характеристика серой лесной почвы приведена в таблице 2 «Приложений». По составу растительности территория относится к широколиственной ботанической провинции (Ермолаев, 2000). Окрестности г. Пущино относятся к району широколиственных лесов, для которого характерно господство дуба (*Quercus robur* L.) с участием липы (*Tilia cordata* Mil.l), клена (*Acer platanoides*), ясеня

(*Fraxinus excelsior*). Основными лесообразующими породами являются сосна с липой (*Pinetum tiliosum*), образующие фоновый тип. В состав травянистого покрова входят: осока волосистая (*Carex pilosa* L. , *C. silvatica*)- являлась преобладающим растением под кроной, мятлик (*Poa nemoralis*), сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria*), копытень (*Asarum europaeum* L.), ландыш (*Convallaria majalis*), звездчатка ланцетовидная (*Stellaria holostea* L.), колокольчик крапиволистный (*Campanula trachelium*), живучка ползучая (*Ajuga reptans* L.), костяника (*Rubus saxatilis*), щитовник мужской (*Dryopteris filix-mas* (L.) Shott).

2.2. Определение затравочного эффекта и ферментативной активности в почвах

Для разделения источников углерода в выделившемся CO_2 на углерод внесенного субстрата и С почвы, в почву добавляли раствор равномерно меченой ^{14}C -глюкозы, выделившийся углекислый газ улавливали 1 н раствором щелочи (последующее определение общего CO_2 проводили титриметрическим методом), радиоактивность ^{14}C определяли в аликвоте щелочи, смешанной со сцинтилляционной жидкостью на жидкостном сцинтилляционном счетчике Beckman coulter (Beckman, США), полученные результаты сравнивали с контролем. Навеску почвы 2,5 г подзолистой почвы помещали во флакон объемом 20 мл, увлажняли до 50% от полной влагоемкости и предынкубировали при 22°C в течение 2 сут. Исходя из величины микробной биомассы, для разделения источников углерода в выделившемся CO_2 на углерод внесенного субстрата и почвы, в почву добавляли раствор равномерно меченой глюкозы, с конечной активностью 0,095 и 0,084 μCi (D-[U- ^{14}C] glucose high specific activity Amersham, UK) в современные и погребенные почвы так, чтобы результирующая влажность составляла 60% ПВ по следующей схеме: в современные горизонты – 0,9 мг С /г почвы, в погребенные и минеральный горизонт – 0,2 мг С /г почвы и инкубировали при 22°C в течение 50 сут. Общее количество выделившегося (меченого и немеченого) углекислого газа в ходе минерализации определяли титриметрически. Для этого во флаконы с почвой помещали емкости с 2 мл 1н

NaOH, которые регулярно заменяли в ходе эксперимента. В аликвоте 100 мкл оттитровывали непрореагировавший объем щелочи с помощью 0,01 н HCl. Одновременно смешивали аликвоту щелочи объемом 200 мкл с 5 мл сцинтилляционной жидкости «Ready Gel™» (Beckman, США) для определения радиоактивности ^{14}C с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Beckman coulter (Beckman, США). Определение ЗЭ аналогично проводили в современных и погребенных серых лесных почвах.

Величину затравочного эффекта рассчитывали, вычитая из общего количества выделившегося CO_2 ($\text{CO}_2^{\text{общ}}$) - количество меченого CO_2 ($^{14}\text{CO}_2$) и количество CO_2 , выделившегося из контрольной почвы без добавления глюкозы ($\text{CO}_2^{\text{контр}}$):

$$\text{CO}_2^{\text{ОВП}} = \underbrace{(\text{CO}_2^{\text{общ}} - ^{14}\text{CO}_2)}_{\text{почва с глюкозой}} - \underbrace{\text{CO}_2^{\text{контр}}}_{\text{почва с водой}} \quad (2.1.)$$

Величину общей микробной биомассы определяли физиологическим методом (Anderson, Domsch, 1978), ферментативную активность методом флуорогенно-меченных субстратов (Marx et al., 2001).

В ходе инкубации во время деструктивных разборов определяли активность ферментов класса гидролаз (КФ 3.2.1.21) методом флуорогенно-меченых субстратов (Pritch et al., 2004; Sowerby et al., 2005). Мы применили функциональный подход, позволяющий не просто охарактеризовать ферментативную активность почв в целом, как это принято в большинстве исследований, но оценить активность ферментов, участвующих в разных стадиях разложения субстрата.

Для расчета *ферментативной активности* использовали формулу (Marx, 2001): $(\text{Акт}2 - \text{Акт}1) \times K/50 \times 50000/1000/N/T$ ($\mu\text{M} \times \text{г}^{-1} \text{ч}^{-1}$),

где $(\text{Акт}2 - \text{Акт}1)$ – это разница активностей двух последующих измерений; K – коэффициент пересчета, который определяли отдельно для каждой почвы; 50 – количество суспензии почвы в каждой лунке, мкл; 50 000 – объем почвенной суспензии, мкл; 1000 – коэффициент для пересчета

нанолитров в микролитры; N – навеска почвы с учетом влажности; T – период инкубации, ч.

Исследования проводили на почвенных образцах в 5 повторностях. Вариабельность исследованных показателей оценивали с помощью стандартной ошибки.

2.3. Определение функциональных особенностей микроорганизмов серой лесной почвы кинетическим методом

Образцы серой лесной почвы отбирали методом средней пробы из слоя 0 - 5 см, просеивали через сито 3 мм, освобождали от корней и крупных растительных остатков, увлажняли до 60% от полной влагоемкости и хранили в холодильнике при температуре 4 - 6°C в течение 1 месяца. Перед началом экспериментов почву предынкубировали при комнатной температуре в течение 3 сут. В качестве субстратов с контрольных участков ценозов были собраны прошлогодние растительные остатки лугового и лесного опада; с участков, подвергшихся палу, были отобраны пироженно-преобразованные растительные остатки (растительный пепел). Растительные остатки (луговую травянистую растительность, а также грубый лесной опад в виде иголок, семян, веточек, плодов) перед внесением во флаконы с почвой измельчали до размеров 1-5 мм. Навеску почвы (25 г воздушно-сухой почвы) помещали во флаконы объемом 250 мл, добавляли растительные остатки в количестве 120 мг/г, пироженный материал – 40 мг/г. Поступление углерода с растительными остатками составляло 58,6 мг и 65,4 мг C/г, а с растительным пеплом - 12,2 и 19,0 мг/г для леса и луга соответственно. Инкубацию проводили в течение 40 сут. при температуре 22°C. В эксперименте использовали следующие обработки и обозначения: внесение в почву растительных остатков («лес РО», «луг РО») и растительного пепла («лес П», «луг П»), контроль без внесения субстратов («лес К», «луг К»).

Для определения минерализационной активности почвенных микроорганизмов в ходе инкубации проводили отбор газовых проб и определяли количество выделявшегося углекислого газа с помощью газового хроматографа.

Об изменениях в функциональной структуре микробных сообществ на различных стадиях преобразования растительных субстратов судили по **кинетическим характеристикам роста микроорганизмов**. Для этого 10 г почвы перемешивали миксером со смесью талька и глюкозы ($4 \text{ мг С г почвы}^{-1}$) с добавлением минеральных солей (мг/г): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,9, K_2HPO_4 – 2,25 и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 3,8, и измеряли скорость выделения CO_2 на проточном инфракрасном газоанализаторе ADC-2250 Gas analyzer («BioScientific LTD»), Германия.

Максимальную удельную скорость роста микроорганизмов (μ_m , ч^{-1}) определяли, аппроксимируя экспериментально полученные значения скорости выделения CO_2 (v мкг С г почвы $^{-1}$ ч $^{-1}$) по следующему уравнению (Panikov, Sizova, 1996):

$$v = v_0^{\text{пр}} \times \exp(\mu_m t) + v_0^{\text{хол}}, \quad (2.2.)$$

где $v_0^{\text{пр}}$ - начальная скорость продуктивного окисления субстрата, сопряженного с синтезом АТФ, $v_0^{\text{хол}}$ - начальная скорость холостого окисления субстрата до CO_2 , t – время. Подбор параметров уравнения (1), при которых расчетная кривая наилучшим образом описывает экспериментальные данные, осуществляли с помощью программы Model Maker 3.1 («Cherwell Scintific Publishing Ltd») по методу наименьших квадратов. Для аппроксимации использовали только ту часть кривой роста микроорганизмов, которая обеспечивала максимальные значения для статистических критериев Q и г.

Расчет общей микробной биомассы. На основе значений величин интенсивности начального дыхательного отклика ($v_0^{\text{хол}} + v_0^{\text{пр}}$), полученных путем подбора параметров уравнения (1) и выраженных в мкг С/г почвы в час, рассчитывали общую микробную биомассу методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД) - $\text{С}_{\text{микро}}$ (мкг / г почвы) $^{-1}$, используя, согласно (Anderson, Domsch, 1978; Ананьева, 1993) соотношение:

$$\text{С}_{\text{микро}} = 1,89 \times 40,04 \times (v_0^{\text{хол}} + v_0^{\text{пр}}). \quad (2.3)$$

Для расчета доли активной биомассы почвенных микроорганизмов, способных к росту на внесенной глюкозе, использовали параметры, найденные для уравнения (1). Коэффициент физиологического состояния микроорганизмов (r_0) рассчитывали из соотношения скоростей холостого и продуктивного дыхания:

$$r_0 = v_0^{\text{пр}} \times 0,1 / (v_0^{\text{хол}} + v_0^{\text{пр}} \times 0,1). \quad (2.4)$$

При этом доля активных микроорганизмов (в процентах) равна $r_0 \times 100$. Подробный вывод и обоснование приведенных расчетов опубликованы ранее (Anderson, Domsch, 1978; Blagodatsky et al., 2000).

Длительность лаг-периода (t_{lag} , ч) в дыхательном отклике характеризует промежуток времени, когда увеличившаяся после внесения глюкозы интенсивность дыхания остается на постоянном уровне, т.е. не происходит активного роста микроорганизмов. Началом роста (окончанием лаг-периода) считали момент времени, когда возрастающая интенсивность ростового (продуктивного) дыхания $v_0^{\text{пр}}$ становилась равной интенсивности холостого дыхания $v_0^{\text{хол}}$ (1), согласно (Panikov et. al., 1992)

$$t_{\text{lag}} = \ln (v_0^{\text{хол}} / v_0^{\text{пр}}) / \mu_m \quad (2.5)$$

Расчет времени генерации активных микроорганизмов (T_g^a , ч) как периода удвоения активной биомассы проводили на основании величин максимальной удельной скорости роста микроорганизмов:

$$T_g^a = \ln(2) / \mu_m. \quad (2.6)$$

Для расчета **времени генерации общей микробной биомассы (T_g^{total} , сут)** использовали время генерации активных микроорганизмов и коэффициент физиологического состояния (r_0):

$$T_g^{\text{total}} = T_g^a / r_0 / 24. \quad (2.7)$$

Величину времени оборачиваемости микробной биомассы в почве (**МТТ**, T_t) как промежутка времени, в течение которого биомасса почвенных микроорганизмов полностью обновляется, рассчитывали для периода завершения минерализационных процессов, характеризующегося стабильными значениями дыхания и биомассы микроорганизмов (steady-state conditions), что является необходимым условием для определения **МТТ**. Расчет **МТТ** и T_t производили двумя способами:

1) с использованием величин микробной биомассы ($MБ$) и дыхания (R_s) (Cheng et al., , 2003) принимая экономический коэффициент потребления субстрата $Y = 0,45$ и коэффициент поддержания микробного дыхания $R_m = 0.08\%$ биомассы в день:

$$MTT = (MБ \times (1 - Y) / Y) / (R_s - MБ \times R_m), \quad (2.8)$$

2) с учетом величин времени генерации общей микробной биомассы (T_g^{total}), исходя из соотношений для времени оборачиваемости активной биомассы: $T_g^a = \ln(2) / \mu$; $T_t^a = 1 / \mu$:

$$T_t = T_g^{\text{total}} / \ln(2) \quad (2.9).$$

Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа (Two Way ANOVA, One Way ANOVA). В качестве независимых факторов были выбраны: 1) «ценоз» (лес, луг) и 2) «субстрат» (растительные остатки, пепел). В качестве результативных признаков рассматривали кумулятивную эмиссию CO_2 из почв и максимальную удельную скорость роста микроорганизмов. Оценку достоверности обнаруженных различий производили по критерию Дункана.

2.4. Выявление особенностей химической структуры ОБ современного и погребенного горизонта подзолистей почвы

Для исследования структуры органического вещества из современного О (0 - 4 см) и погребенного [О] (23 - 30 см) были выделены гуминовые кислоты. ГК были выделяли раствором 0,1 м пиродифосфата натрия и 0,1 м NaOH, pH 13,0 с последующим осаждением соляной кислотой (pH 2,0). Осадок суспендировали в минимальном объеме дистиллированной воды и ставили на диализ против дистиллированной воды при 4°C в течение 7 сут с 2-кратной сменой воды в сут. Методом инфракрасной (ИК) спектроскопии можно установить присутствие важнейших атомных групп и типов связей в гуминовых веществах, идентифицировать индивидуальные соединения, изучить механизм органоминерального взаимодействия, адсорбцию и десорбцию влаги и др. Происхождение полос поглощения в ИК области связано с колебаниями отдельных атомных групп или вращением молекулы в целом, поэтому ИК-спектры часто называют молекулярными спектрами в отличие от электронных спектров поглощения, обусловленных электронными переходами и проявляющихся в видимой и ультрафиолетовой областях. ИК-спектры специфических гуминовых веществ имеют характерный облик и постоянный набор полос поглощения, позволяющий отличить ГК от соединений других классов. ИК-спектры снимали на ИК-спектрофотометре «Спекорд 80» в таблетках с KBr. Образцы ГК и KBr высушивали при 40°C в течение 2 сут. Затем навеску образца 1 мг растирали со 199 мг KBr в агатовой ступке и формовали таблетку в пресс-форме при давлении 10 атм при одновременном откачивании воздуха форвакуумным насосом.

ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение

3.1. Влияние содержания органического углерода и микробной биомассы на затравочный эффект

3.1.1. Сравнение интенсивности минерализационных процессов современных и погребенных горизонтов подзолистой почвы

Процесс минерализации глюкозы характеризовался 2 периодами с различной интенсивностью минерализации. Период первичного потребления наблюдался в первые 3 сут после внесения глюкозы и характеризовался максимальной интенсивностью минерализации. Во второй период (в последующие 50 сут) происходило замедление скорости минерализации (рис. 3.1). В период интенсивной минерализации эмиссия CO_2 из почв органогенных горизонтов в 16 и 10 раз превышала таковую из контрольных почв для культурного слоя О и фонового горизонта О, соответственно (рис. 3.1). Вероятно, большее выделение CO_2 из органогенного горизонта культурного слоя было связано с большим содержанием $\text{C}_{\text{орг}}$ и микробной биомассы в этом горизонте по сравнению с О фоновым горизонтом.

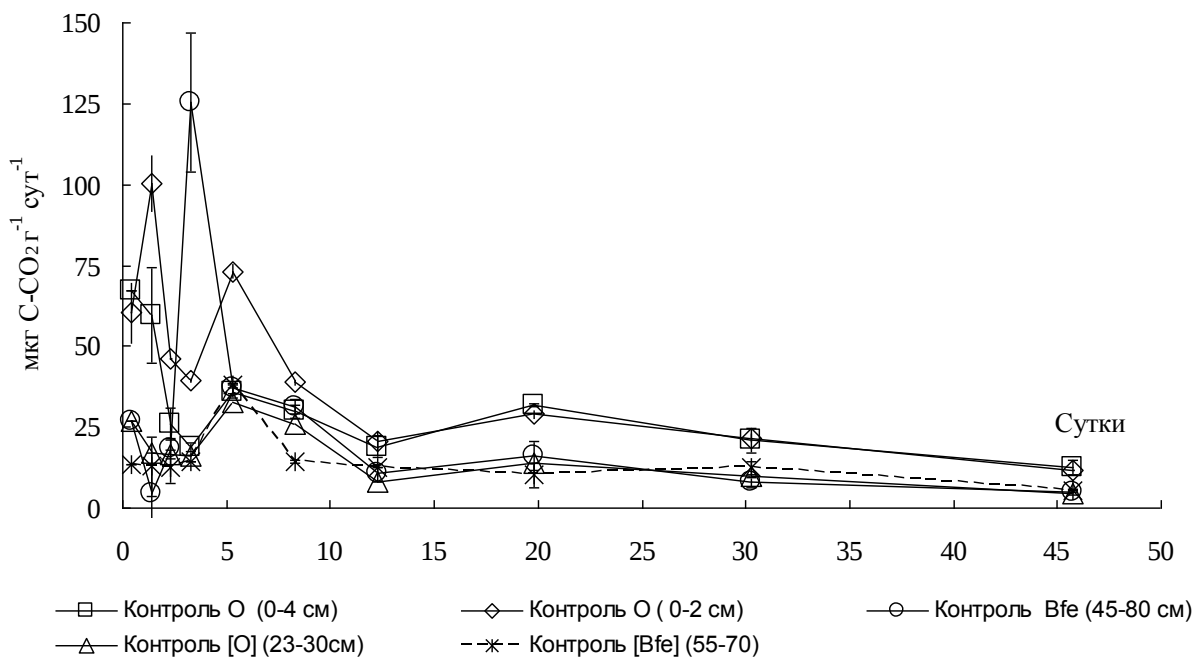


Рисунок 3.1. Скорость продуцирования CO_2 в современных и погребенных подзолистых почвах без внесения субстрата.

Скорость продуцирования CO_2 из современного фонового горизонта О в 3 раза превышала эмиссию углекислоты из погребенного горизонта [О] (рис. 3.2).

Скорость выделения общего CO_2 , в первые 3 сут инкубации из современного минерального горизонта В в 4 раза превышала продуцирование углекислого газа почвой погребенного В (рис. 3.2). Интенсивность минерализации глюкозы в современном В и погребенном [В] иллювиальных горизонтах превышала контроля в 2 и 4 раза, соответственно. Таким образом, в противоположность тенденции, выявленной для органогенных горизонтов, в минеральных горизонтах минерализационная активность по отношению к контролю оказалась выше в погребенном, чем в современном минеральном горизонте.

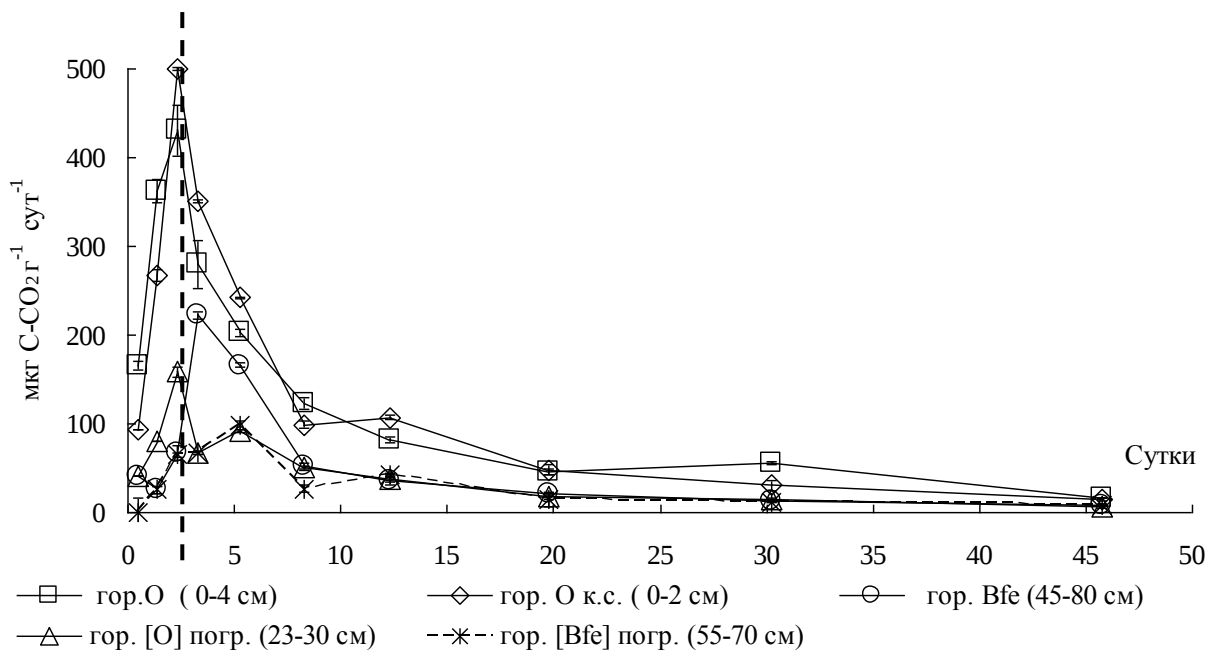


Рисунок 3. 2. Динамика эмиссии CO_2 из современных и погребенных подзолистых почв.

В целом, скорость выделения CO_2 из органогенного горизонта превышала таковую из минеральных В горизонтов в течение всего инкубационного периода. Микроорганизмы органогенного горизонта осуществляли разложение глюкозы непосредственно после её внесения. Аналогично быстро активизировались

микроорганизмы погребенного О горизонта, максимум активности которых наблюдался в тот же срок, что и в современном почвенном горизонте О. Характерно, что микроорганизмам минеральных (современного и погребенного) горизонтов потребовалось около 2 сут для перехода в активное состояние, что привело к сдвигу максимума минерализационной активности по сравнению с органогенными горизонтами.

3.1.2. Влияние исходной трофической обстановки на функциональные особенности микроорганизмов современных и погребенных подзолистых почв

Судя по одинаковому характеру динамики выделения $^{14}\text{CO}_2$ в горизонтах О (рис. 3.3, вставка), можно заключить, что микроорганизмы современных органогенных горизонтов одинаково откликнулись на внесение глюкозы.

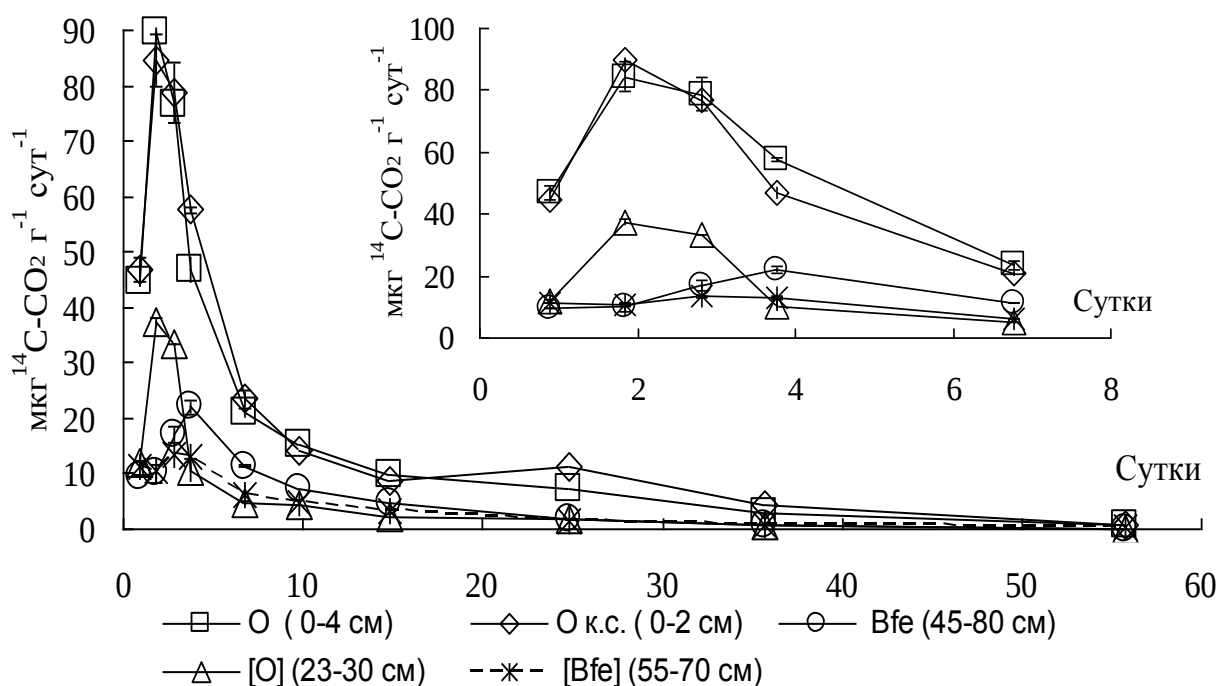


Рисунок 3.3. Скорость выделения $^{14}\text{CO}_2$ в современных и погребенных подзолистых почвах.

Респиаторная реакция микроорганизмов на внесенный субстрат не только в современных горизонтах О, но и в погребенном [О], характеризовалась

одинаковым трендом выделения $^{14}\text{CO}_2$ (рис. 3.3), что говорит о сохранении функциональных особенностей микроорганизмов в течение длительного периода погребения. Так же как и в органогенных горизонтах, сходная респираторная реакция микроорганизмов на внесенную глюкозу была обнаружена в современных и погребенных минеральных горизонтах. Характерным отличием кинетики респираторной реакции микроорганизмов минеральных горизонтов от органогенных являлось наличие 2-сут лаг-периода (рис. 3.3). Именно наличие лаг-фазы обусловило сдвиг максимума минерализационной активности на более поздний срок (3-5 сут) по сравнению с органогенными горизонтами.

3.1.3. Микробиологические свойства современных и погребенных горизонтов подзолистой почвы

Величина общей микробной биомассы закономерно снижалась с увеличением глубины почвенного профиля (рис. 3.4).

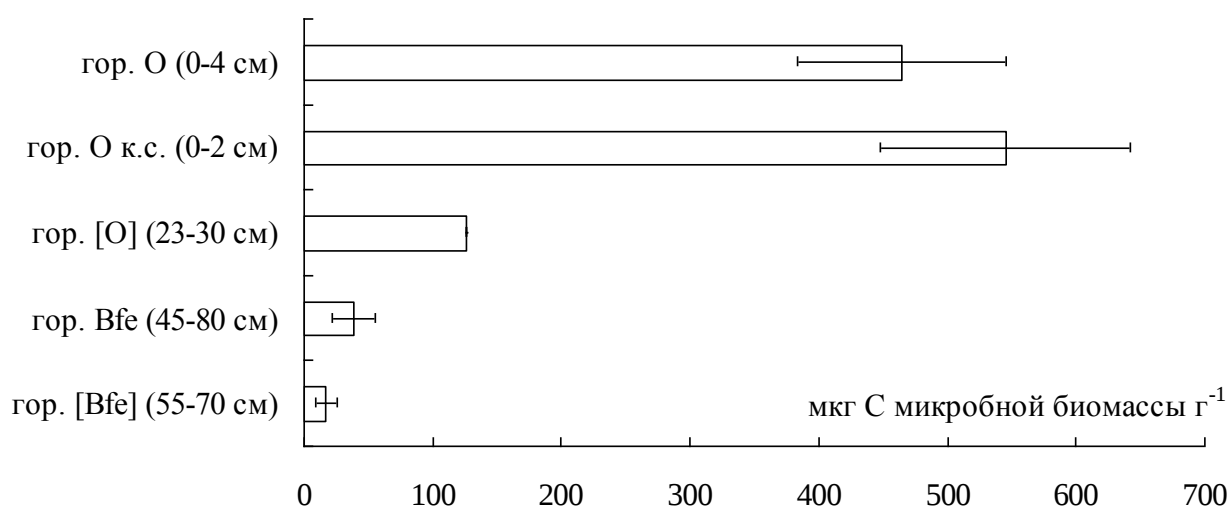


Рисунок 3.4. Содержание микробной биомассы в органогенных и иллювиальных, современных и погребенных почвенных горизонтах.

В органогенных горизонтах величина микробной биомассы была в 5 - 6 раз выше, чем в погребенном О и минеральных горизонтах, при этом эффективность потребления глюкозы Y , характеризующая способность копитрофных и олиготрофных микроорганизмов усваивать субстрат, оказалась выше в

минеральных горизонтах по сравнению с органогенными (табл. 3.1). Аналогично уменьшению величины микробной биомассы вниз по профилю, пропорционально снижалась и активность гидролитических ферментов – β -глюкозидазы и целлюбиогидролазы (рис. 3.5 а). Положительная корреляция с коэффициентами $R^2=0,96$ и $0,6$ была обнаружена между содержанием микробной биомассы и активностью β – целлюбиогидролазы и глюкозидазы соответственно (рис. 3.5 б).

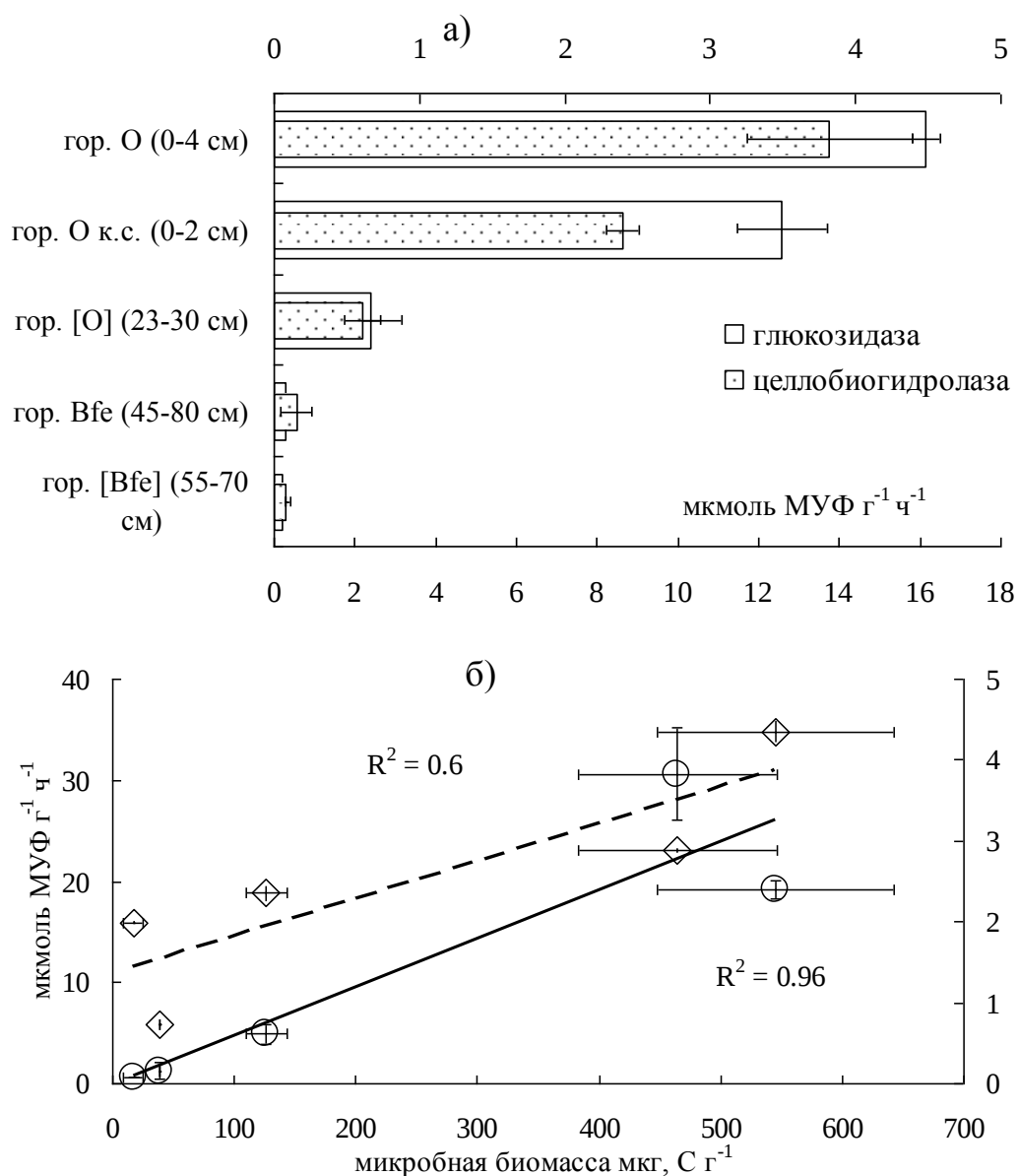


Рисунок 3.5. Активность ферментов, минерализующих ОВП, в современных и погребенных почвах: а) по основной оси X (*низ*) – активность глюкозидазы, по вспомогательной X (*верх*) – целлюбиогидролазы; зависимость ферментативной

активности от величины микробной биомассы: б) основная ось **У (слева)** – глюкозидаза (ромбические символы), вспомогательная (**справа**) **У** – целлюбиогидролаза (окружности).

В среднем активность глюкозидазы и β – целлюбиогидролазы в современных органогенных горизонтах в 6 и 5 раз превышала активности этих ферментов в погребенной почве [О] (рис. 3.5). В минеральных горизонтах различия в активности ферментов оказывались недостоверными. Специфическая ферментативная активность (активность ферментов, приходящаяся на единицу микробной биомассы) снижалась с увеличением глубины почвенных горизонтов в профиле. Абсолютная и удельная активность глюкозидазы превосходила активность β – целлюбиогидролазы в верхних горизонтах в 3 - 4 раза. В минеральных почвенных горизонтах удельная активность глюкозидазы в 80 раз превышала активность целлюбиогидролазы.

Таблица 3.1 Интенсивность затравочного эффекта в зависимости от эффективности потребления глюкозы микроорганизмами, реутилизации углерода глюкозы в микробной биомассе и содержания $C_{орг}$ в современных и погребенных горизонтах подзолистой почвы

Горизонт	У глюк. *	Реутилизация ** CO_2 от внесенного С, %	ЗЭ относительно внесенного С, %	МБ, С мкг*г ⁻¹	С орг. %	Внесено глюкозы мкг С*г- 1
гор. О (0-4 см)	0,79	16,4	119	464	7,29	960
гор. О к.с. (0-2 см)	0,79	16,3	126	545	9,46	960
гор. [О] (23-30 см)	0,61	19,3	198	126	3,1	200
гор. В (45-80 см)	0,83	39,5	286	17,3	<0,5	200
гор. [Bfe] (55- 70 см)	0,83	24,3	178	38,4	<0,5	200

Примечание. *- коэффициент экономического потребления субстрата, рассчитан для первых 3 сут инкубации, принимая допущение, что за трое суток микроорганизмы использовали глюкозу, частично минерализовав её до CO_2

**- реутилизацию С- субстрата рассчитывали для 10-сут интервала, на основании выделившегося суммарного CO_2 .

3.1.4. Проявление затравочного эффекта в современных и погребенных горизонтах подзолистй почвы. Абсолютные величины прайминг-эффекта в почвах органогенных горизонтов оказывались в 2,5 раза выше по сравнению с минеральными почвенными горизонтами и палеопочвой. Интенсивность затравочного эффекта снижалась от верхних органогенных горизонтов к минеральным слоям и погребенному [O] горизонту (рис. 3.6).

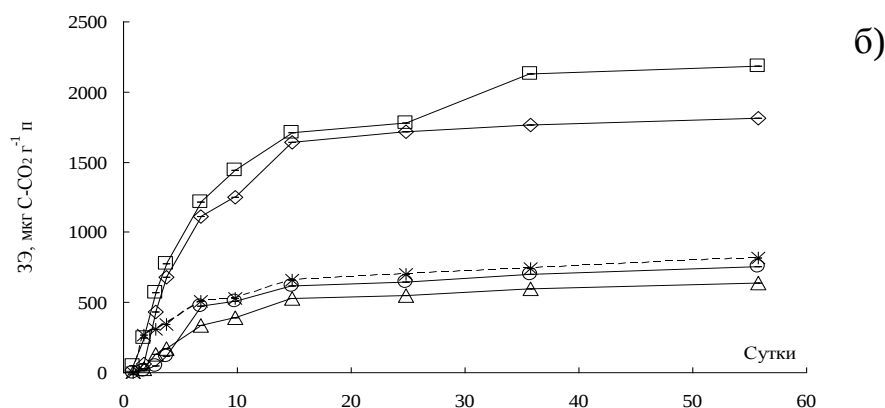
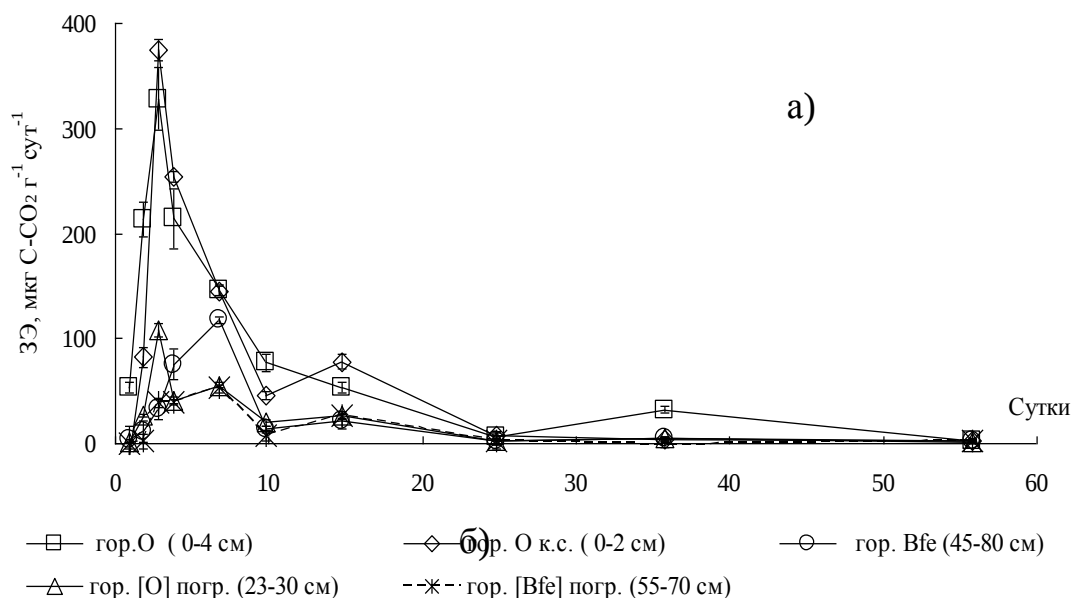


Рисунок 3.6. Интенсивность затравочного эффекта в современных и погребенных горизонтах подзолистой почвы: а) – скорость затравочного эффекта, б) суммарный затравочный эффект.

Минимальным затравочный эффект был в погребенном органогенном горизонте, что также подтверждалось при оценке ЗЭ по отношению к контролю. Относительный затравочный эффект (по отношению к контролю) составил 175% и 98% (рис. 3.7 а) соответственно для современного и погребенного органогенных горизонтов.

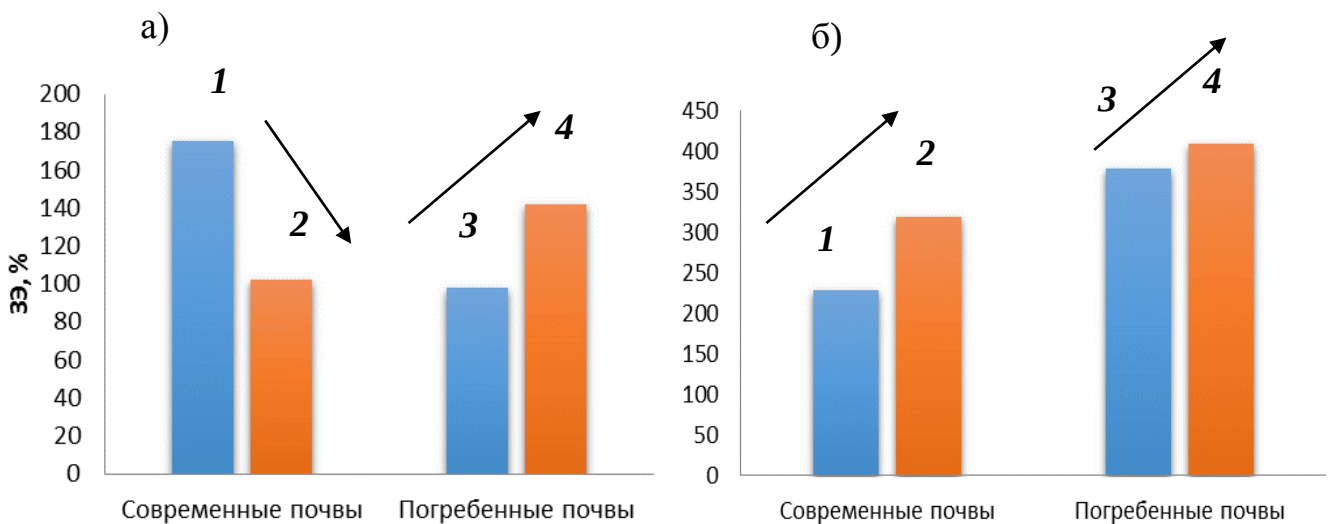


Рисунок 3.7. Величина относительного затравочного эффекта в современных и погребенных горизонтах подзолистой почвы; а) – затравочный эффект по отношению к контролю, б) – по отношению к внесенному углероду: 1- гор. О (0 - 4 см), 2- гор. О к.с. (0 - 2 см), 3- гор. [О] погр. (23 - 30 см), 4- гор. Вfe (45 - 80 см), 5- гор. [Вfe] погр. (55 - 70 см).

Оценка затравочного эффекта по отношению к внесенному С выявила, что ЗЭ в почве погребенного горизонта О в 1,7 раз превышал прайминг эффект в почве современного органогенного горизонта (рис. 3.7 б). Для минеральных почвенных горизонтов была обнаружена обратная тенденция, относительный ЗЭ (по отношению к контролю) в погребенном В горизонте в 1,5 был выше по

сравнению с фоновым аналогом, а по отношению к внесённому С, затравочный эффект в минеральных горизонтах в 2 раза превышал таковой в органогенных. Таким образом, поступление субстрата инициировало усиление относительной активности микроорганизмов погребённых, особенно - минеральных горизонтов.

В целом, величина затравочного эффекта определялась исходным содержанием органического углерода в почве и величиной микробной биомассы (рис. 3.8 а,б).

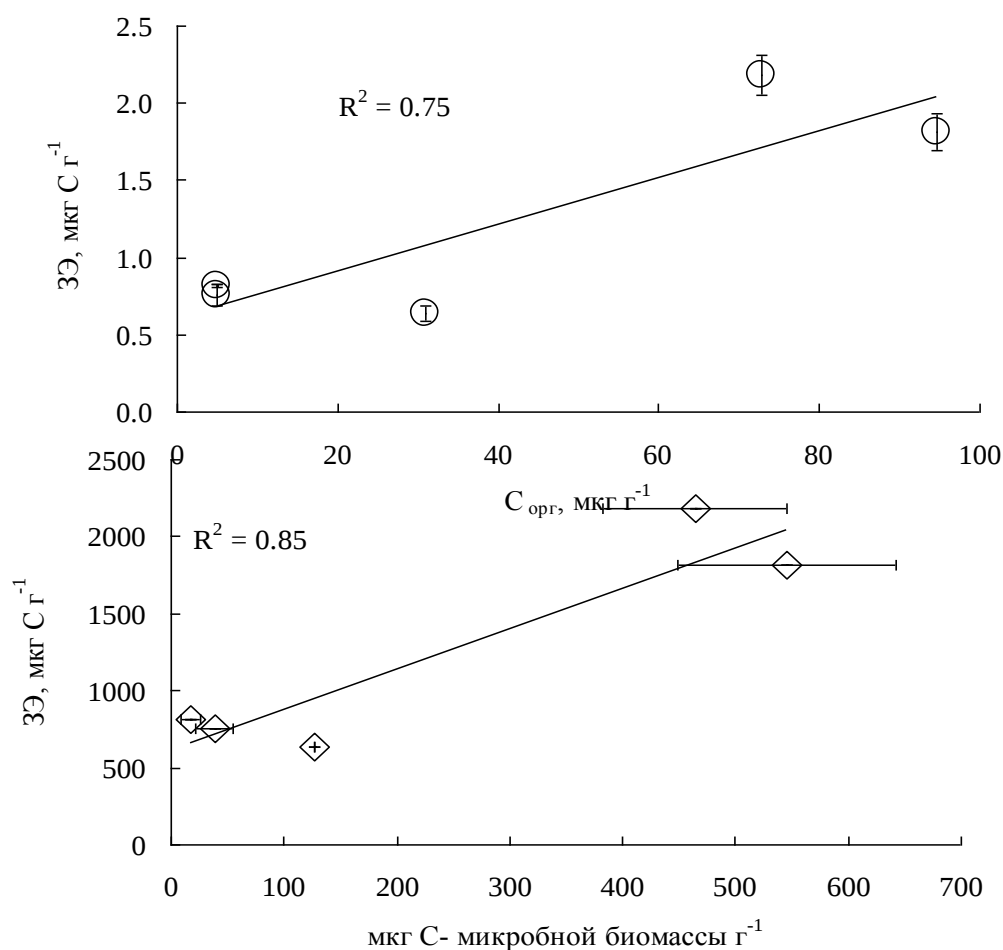


Рисунок 3.8. Взаимосвязь между интенсивностью затравочного эффекта и содержанием органического углерода (а) и углерода микробной биомассы (б) в современных и погребённых подзолистых почвах.

Исследование зависимости скорости затравочного эффекта от ферментативной активности показало наличие статистически значимой

взаимосвязи с коэффициентом $R^2=0,96$ (рис. 3.9), при этом взаимосвязь ЗЭ с активностью глюкозидазы оказалась недостоверной ($R^2=0,27$).

Динамические изменения интенсивности минерализации глюкозы, обнаруженные в нашем эксперименте, можно объяснить 1) быстрым потреблением субстрата и использованием в ходе катаболизма (первые 3 сут) и 2) последующей реутилизацией иммобилизованного в микробной биомассе углерода (Lucas, Jones, 2006). Микробные сообщества горизонтов В, сформировавшиеся в условиях субстратного лимитирования, характеризовались более эффективным потреблением глюкозы, а т.е. относительным преобладанием микроорганизмов с К-стратегией (Fischer et al., 2010; Liu, 1996, 1998).

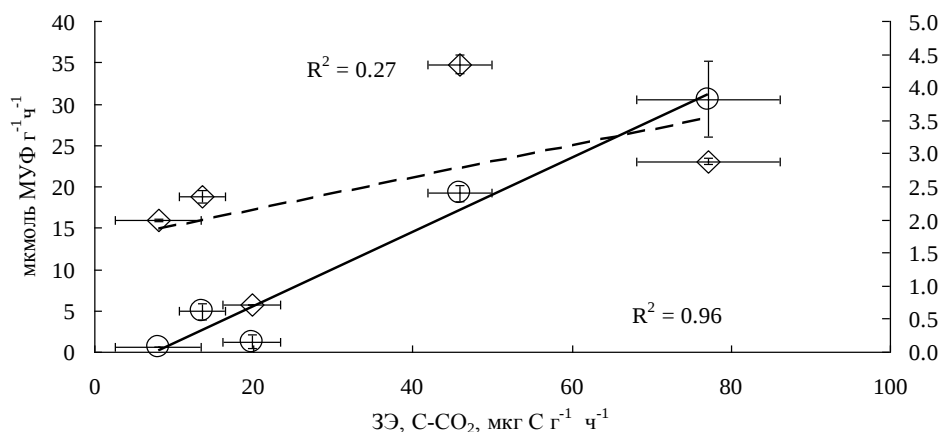


Рисунок 3.9. Регрессионная зависимость скорости затравочного эффекта от активности целлюбиогидролазы – окружности на графике; ромбы- активность глюкозидазы.

Характерно, что в условиях относительной консервации в течение тысячелетия, микроорганизмы погребенных горизонтов сохранили свои функциональные особенности, то есть кинетика респираторной реакции на внесенную глюкозу была одинаковой для современных и погребенных горизонтов, но различалась между органогенными и минеральными горизонтами. Это свидетельствует о том, что микробные сообщества при погребении обладают микробиологической «памятью». Действительно, в ряде работ (Демкина 2009;

Лысак, 2010) показано существование адаптационных механизмов, обеспечивающих в погребенных почвах не только сохранение самих микроорганизмов, но и их функциональных особенностей. Одним из таких адаптационных механизмов является переход клеток в наноформы при неблагоприятной обстановке, что позволяет микроорганизмам сохранять жизнеспособность (Лысак 2010). В исследовании Мондини с соавт. (Mondini et al., 2006) показано, что у почвенных микроорганизмов существуют метаболические и физиологические стратегии, позволяющие им выживать и расти в условиях обедненной доступным субстратом почвенной среды. В качестве адаптационных механизмов могут выступать: изменения в клеточной морфологии, низкая скорость метаболизма, эффективная способность использовать внутренние резервы (Mondini et. al. 2006).

Затравочный эффект в нашем исследовании наблюдался сразу после внесения глюкозы, и совпадал с интенсивной фазой минерализации этого субстрата. За первые четверо суток инкубации дополнительное выделение CO_2 в органогенных горизонтах составило 80% от внесенного С, такие же результаты были получены и западными исследователями (Mondini et al., 2006). Абсолютная величина затравочного эффекта для современных горизонтов подзолистой почвы определялась величиной микробной биомассы в почвенных горизонтах. Наибольшим ЗЭ оказывался в современных органогенных горизонтах, а минимальным – в погребенном органогенном горизонте (а не в минеральном, характеризовавшимся самым низким содержанием $\text{C}_{\text{орг}}$ и $\text{C}_{\text{микро}}$). Такая же тенденция обнаруживалась при оценке ЗЭ по отношению к контролю. Интересно отметить, что ЗЭ, выраженный по отношению к контролю, оказывался максимальным в минеральном погребенном горизонте, в отличие от тенденции, выявленной для органогенных горизонтов подзолистой почвы (максимальный ЗЭ был в современном органогенном О горизонте). Причиной такого несоответствия являлось сохранение активности К-стратегов в минеральном погребенном горизонте в ходе минерализации ПОВ, о чем свидетельствует тесная взаимосвязь скорости ЗЭ с активностью ферментов, разлагающих полимерный субстрат -

целлюлозу. В работе Фонтэна с соавт. (Fontaine et. al., 2003) показано, что внесение целлюлозы инициировало синтез специфических ферментов, разлагающих ПОВ. Таким образом, увеличение внеклеточной активности ферментов, разлагающих целлюлозу, свидетельствует о возникновении *реального* **3Э**, поскольку этот фермент может разлагать ПОВ в процессе ко-метаболизма (Blagodatskaya, Kuzyakov 2010; Fontaine et al., 2003). С помощью анализа профилей PLFA было продемонстрировано, что разложение более «древнего» ОВ преимущественно осуществляют грамположительные бактерии, тогда как минерализацию свежего органического вещества – грамотрицательные (Kramer, Gleixner 2008; Nottingham et. al. 2010). Соотнося эти выводы с нашим исследованием, можно предположить, что в погребенных горизонтах затравочный эффект был вызван увеличением активности грамположительных, а в современных – грамотрицательных микроорганизмов. Однако, наши выводы о роли групп микроорганизмов в утилизации ПОВ являются косвенными и требуют будущих экспериментальных подтверждений.

3.2. Роль микрорельефа в проявлении затравочного эффекта в серой лесной почве

3.2.1. Оценка минерализационной активности в современных и погребенных почвах в зависимости от содержания микробной биомассы и органического углерода

Микробиологические и физико-химические свойства серой лесной почвы микропонижения и микроповышения оказались сходными (табл. 3.2). С увеличением глубины профиля закономерно снижались величины микробной биомассы в 8 раз для почвы микроповышения и 20 раз для микропонижения, органического углерода в 9 и 10 раз, скорости эмиссии углекислого газа в 3 и 3,4 раза в почвах микроповышения и микропонижения, соответственно. Интересно отметить, что после увлажнения, спустя 10 сут инкубации, вдвое увеличилась суммарная продукция CO_2 в почве микроповышения (рис. 3.10.) как в современном гумусовом горизонте, так и в погребенном аналоге по сравнению с интенсивностью выделения углекислого газа микроорганизмами почв микропонижения.

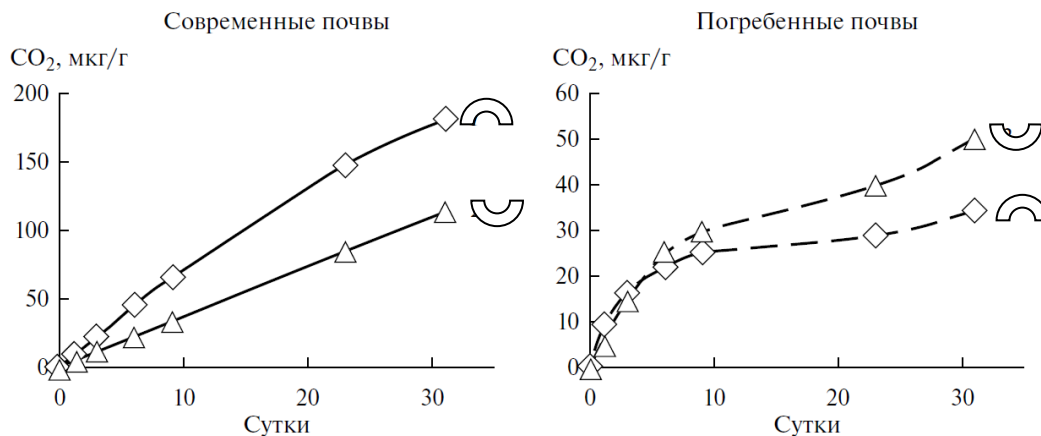


Рисунок 3.10. Суммарное выделение CO_2 из контрольных вариантов современных и погребенных почв: 1- Микроповышение (МПВ) $\curvearrowright$
2- Микропонижение (МПН) $\smile$

Выявлено, что до внесения в почвы легкодоступной глюкозы (только при добавлении воды) максимальная ферментативная активность наблюдалась в

гумусовых горизонтах почв микроповышения (рис. 3.11). В современной почве микроповышения в 2 и 3 раза увеличилась активность ферментов, осуществляющих разложение труднодоступных соединений, ксиланаз и целлобиогидролазы соответственно, по сравнению с активностью этих ферментов в микропонижении.

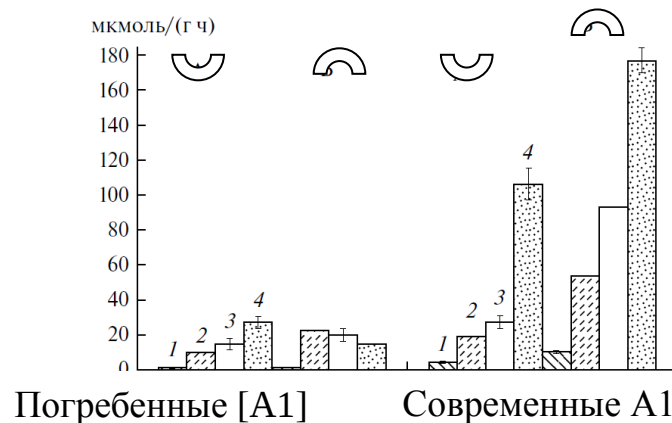


Рисунок 3.11. Скорость ферментативного гидролиза в современных и погребенных горизонтах серой лесной почвы: $\cup$ микропонижение, $\cap$ микроповышение (1-β- глюкозидазы, 2- хитиназы, 3- целлобиогидролазы, 4- ксиланаз).

3.2.2. Проявление затравочного эффекта в современных и погребенных гумусовых горизонтах серой лесной почвы микроповышения и микропонижения

Внесение в почвы глюкозы приводило к нивелированию воздействия микрорельефа, но сохраняло различия в интенсивности выделения CO_2 между современными почвами и погребенными аналогами. Положительные величины затравочного эффекта были характерны для современных горизонтов независимо от микрорельефа, а также для погребенного гумусового горизонта почвы микропонижения. ЗЭ в погребенном горизонте почвы микроповышения был отрицательным (рис. 3.12). Величина затравочного эффекта в современном гумусовом горизонте микропонижения в 6 раз превышала ЗЭ погребенного

аналога (рис. 3.12) и коррелировала с величиной микробной биомассы и содержанием $C_{орг}$ в почвах (табл. 3.2).

Таблица 3.2. Микробиологические и физико-химические свойства современных и погребенных гумусовых горизонтов серых лесных почв в элементах микрорельефа

Горизонт (см)	МБ* мкгС/ г п	$C_{орг}$, %	рНвод
Современный А1 (1-7) 	397 а	2,8 а	5,5
Современный А1 (1-8) 	332 b	3,6 b	5,9
Погребенный [А1]  (215-225)	49,7 с	0,31 с	5,9
Погребенный [А1]  (138-148)	16,3 d	0,35 с	6,3

Таким образом, 10-кратные различия в содержании микробной биомассы и ПОВ между современными и погребенными почвами определяли различия в абсолютных величинах ЗЭ.

Характерно, что небольшие различия в содержании микробного углерода между элементами микрорельефа в современных гумусовых горизонтах (величина $C_{мик}$ на микроповышении всего на 20% превышало соответствующую величину в почве микропонижения) оказались недостаточными, чтобы вызвать различия в ЗЭ. В погребенных почвах величина $C_{мик}$ на микроповышении в 3 раза превышала содержание микробной биомассы микропонижения, что приводило к достоверным различиям в интенсивности ЗЭ.

3.3. Интенсивность проявления затравочного эффекта в зависимости от типа почвы

Величина затравочного эффекта зависела от типа почвы. В современных горизонтах подзолистой почвы величина ЗЭ в 6 - 7 раз превышала таковую в современных горизонтах серой лесной почвы. Это объяснялось большим содержанием органического углерода в верхних органогенных горизонтах подзолистой почвы по сравнению с гумусовыми горизонтами серых лесных почв. Аналогичная ситуация была характерна и для палеогоризонтов почв.

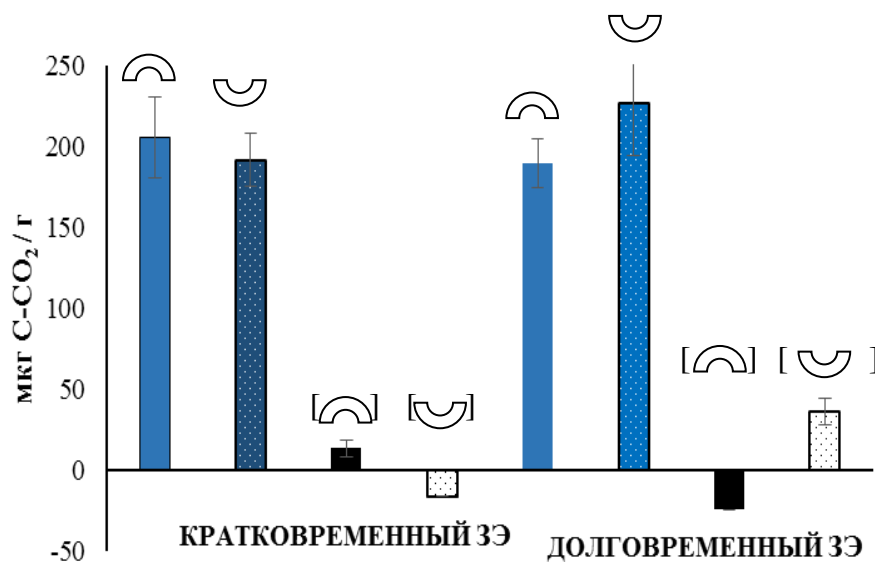


Рисунок 3.12. Суммарный затравочный эффект в современных и погребенных гумусовых горизонтах серых лесных почв. В квадратных скобках – погребенные аналоги.

Наблюдавшиеся затравочные взаимодействия различались по механизмам и по продолжительности ЗЭ в зависимости от микрорельефа. Так, в фазу интенсивной минерализации (2 - 5 сут) положительный затравочный эффект наблюдался в почве микроповышения, в то время как на микропонижении ЗЭ был отрицательным. Интересно отметить, что прирост активности ферментов (β -

глюкозидазы, хитиназы и целлобиогидролазы) во время интенсивной минерализации оказался выше в современной почве микропонижения (рис. 3.13.).

При этом ЗЭ в погребенном горизонте микропонижения был отрицательным или ниже, чем на микроповышении. Наблюдавшееся кратковременное увеличение активности ферментов отражало активацию микробного метаболизма от внесения глюкозы, не связанную напрямую с ЗЭ. Долговременный затравочный эффект наблюдался в интервале 5 -60 сут, и был положительным в почве микропонижения и отрицательным - в погребенной почве микроповышения.

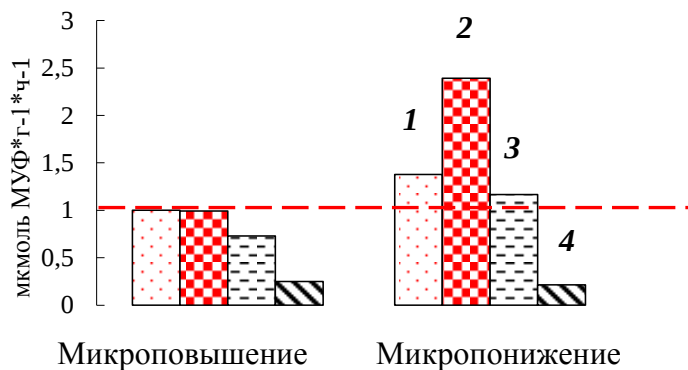


Рисунок 3.13. Изменение активности ферментов (1-β-глюкозидазы, 2-хитиназы, 3- целлобиогидролазы, 4- ксиланазы) в современных горизонтах серой лесной почвы микропонижения и микроповышения в фазу интенсивной минерализации.

Аналогично абсолютному ЗЭ, величина затравочного эффекта по отношению к контролю была выше в современных почвах по сравнению с погребенными (рис. 3.14).

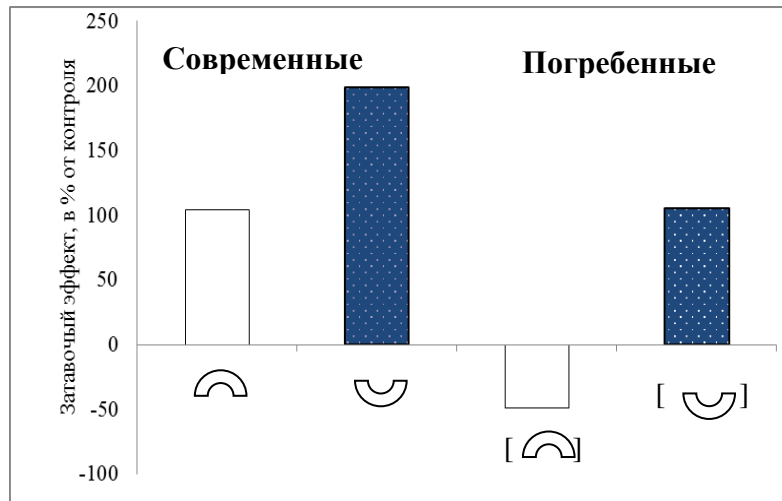


Рисунок 3.14. Затравочный эффект, выраженный по отношению к контролю в современных и погребенных горизонтах серой лесной почвы.

Однако в современных гумусовых горизонтах долговременный ЗЭ был вдвое выше в почве микропонижения, чем на микроповышении. Подобная тенденция наблюдалась и для погребенных аналогов: результирующий ЗЭ также оказался в 2 раза выше в микропонижении. Увеличение относительного затравочного эффекта (по сравнению с контролем) в гумусовых горизонтах почв микропонижений совпадало с максимальным приростом ферментативной активности в этих горизонтах (рис. 3.15).

Таким образом, более высокие величины относительного ЗЭ в гумусовых горизонтах почв микропонижений были связаны с гидролитической активностью ферментов микроорганизмов. Это косвенно подтверждает, что в ходе долговременного затравочного эффекта источником выделяющегося С являлось почвенное органическое вещество (то есть **ЗЭ был реальным**).

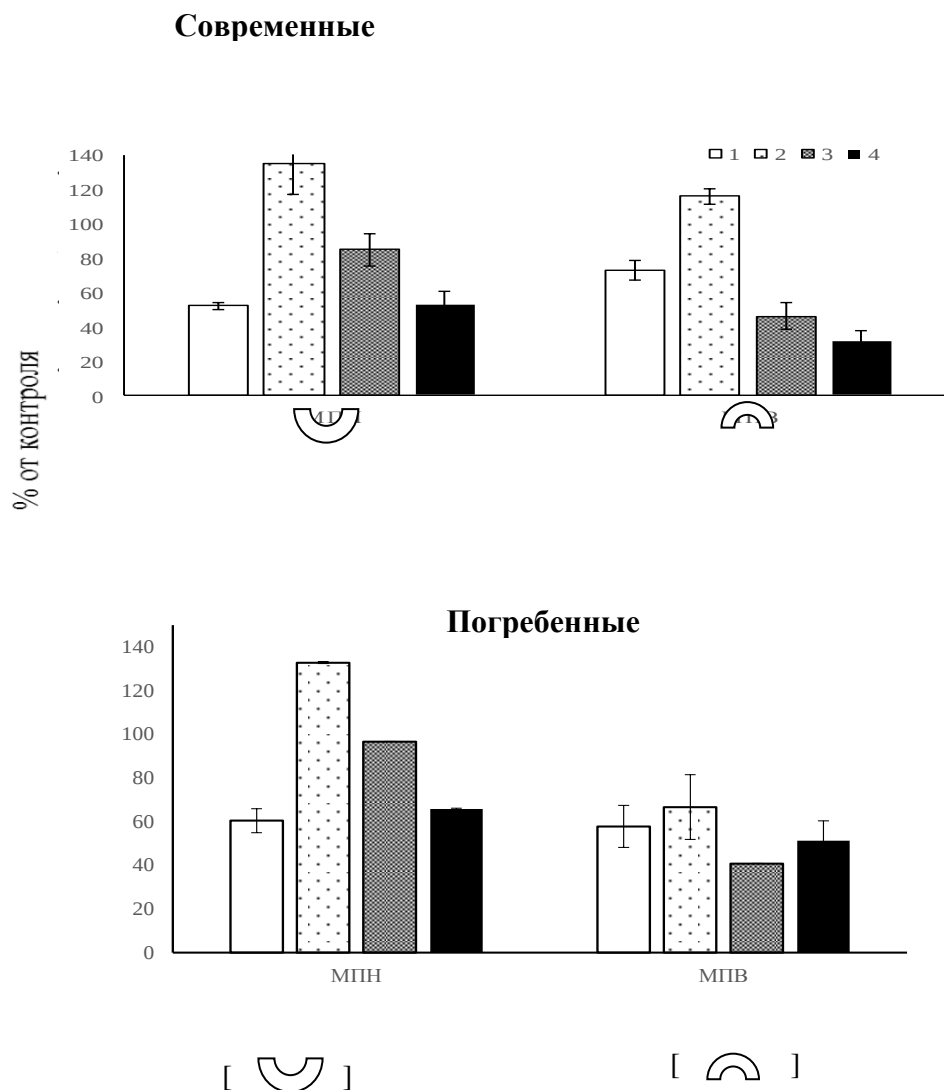


Рисунок 3.15. Ферментативная активность в фазу долговременного затравочного эффекта, выраженного по отношению к контролю, в современных и погребенных горизонтах серой лесной почвы (1-β-глюкозидазы, 2- хитиназы, 3- целлобиогидролазы, 4- ксиланазы).

3.4. Изменения свойств микробных сообществ в зависимости от качества субстратов

3.4.1. Влияние внесенных субстратов на минерализационные процессы в почве

В инкубационных экспериментах исследовали ЗЭ при внесении глюкозы, как компонента корневых выделений. Основная часть углерода поступает в почву с растительными остатками, которые на фоне увеличения количества

неконтролируемых пожаров, подвергаются пирогенной трансформации и в виде пирогенного материала попадают в почву (Фотография 3 Приложение 3). В связи с этим мы расширили круг изучаемых субстратов и исследовали, как изменится функциональная структура микробных сообществ и их влияние на затравочный эффект при внесении в серую лесную почву луговых и лесных растительных остатков и пирогенно-трансформированного растительного материала.

В ходе инкубации почвы с растительными субстратами наблюдали 3 периода, различающихся интенсивностью процессов деструкции органического материала (рис. 3.16): 1) период интенсивной минерализации (0 - 5 сут), 2) период замедления (5 - 25 сут), и 3) период окончания (25 - 40 сут) минерализационных процессов.

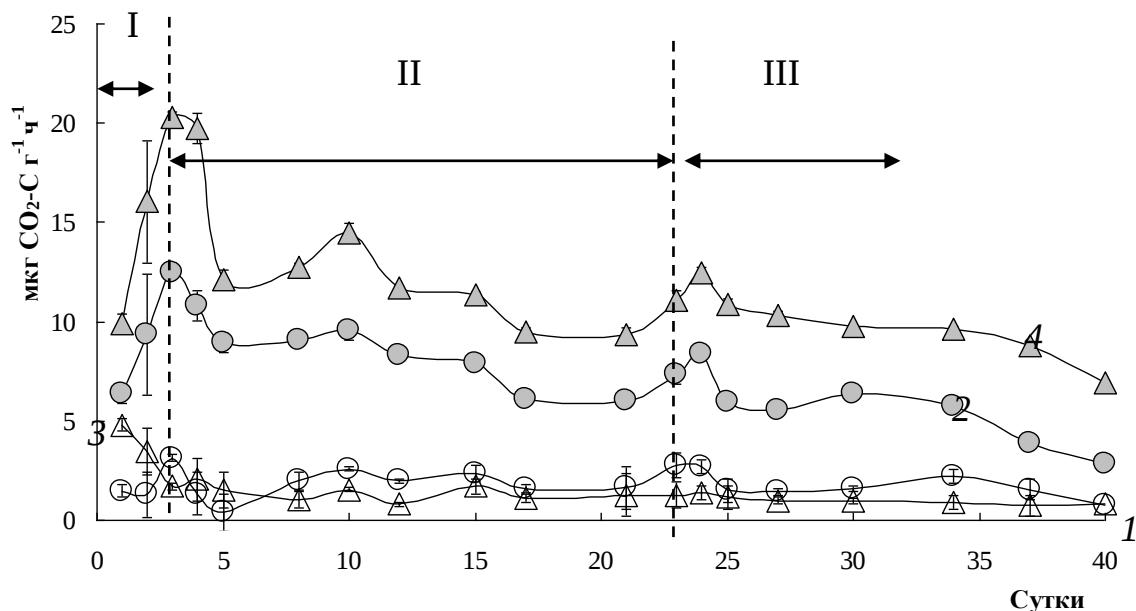


Рисунок 3.16. Скорость эмиссии углекислого газа из почв с растительными субстратами за вычетом контроля: I - интенсивная минерализация, II - замедление минерализации, III - окончание минерализации; 1 - лес П, 2 - лес РО, 3 - луг П, 4 - луг РО.

Во все периоды эмиссия углекислого газа из почв с растительными остатками превышала скорость продуцирования CO₂ в контрольной почве в 5 и 6 раз в почве под лесом и лугом, соответственно. В целом, эмиссия CO₂ в почве с пирогенно-

трансформированным субстратом оказалась в 1,5-2 раза выше, чем в контрольных почвах обоих ценозов (рис. 3.16).

Статистический анализ Two Way ANOVA показал, что различия в суммарной эмиссии CO_2 определялись как типом растительного ценоза, так и качеством внесенных в почву субстратов (табл. 3.3). При этом субстрат оказывал наиболее сильное воздействие на эмиссию CO_2 , составившее 89% от общей вариабельности этого показателя. Это подтверждает, что эмиссия CO_2 отражает, главным образом, физиологическую реакцию микроорганизмов, проявляющуюся в увеличении респираторной активности при разложении субстратов разной доступности.

Таблица 3.3. Оценка влияния факторов на физиологические показатели микробного сообщества в вариантах с растительными остатками и пирогенно-преобразованным материалом в конце инкубации

Кумулятивная эмиссия CO ₂ мг CO ₂ -C г ⁻¹ п			Максимальная удельная скорость роста микроорганизмов, ч ⁻¹		
Фактор	% от общей вариабельности	<i>P</i>	Фактор	% от общей вариабельности	<i>P</i>
Ценоз	0,8	0,0017**	Ценоз	36	0,0014**
Субстрат	89	0,0000***	Субстрат	30	0,0102*
Ценоз+субстрат	10	0,0000***	Ценоз+субстрат	8	0,1886 ns
Остаток	0,3		Остаток	25	

Различия достоверны при уровне значимости:

* 5%

** 1-5%

*** 0, 1-1,0%.

ns - различия недостоверны.

Вне зависимости от периода преобразования растительных остатков, кумулятивная эмиссия CO_2 была выше в почве под лугом по сравнению с почвой под лесом (табл. 3.4).

Таблица 3.4. Кумулятивная эмиссия CO_2 из почв на разных стадиях

Вариант	Интенсивная минерализация (0 - 5 сут)	Замедление минерализации (5 - 25 сут)	Окончание минерализации (25 - 40 сут)	Суммарное выделение за 0 - 40 сут инкубации
Кумулятивная эмиссия, $\text{мкг CO}_2\text{-C г}^{-1}$ п				
Лес РО	1192	3024	2862	7078 ^{b*}
Лес П	178	663	1189	2030 ^c
Луг РО	1911	4561	3487	11870 ^a
Луг П	314	595	630	1539 ^d

интенсивности минерализации растительных субстратов

Очевидно, что прошлогодние луговые остатки представляют собой более доступный субстрат по сравнению с лесным опадом. В вариантах с внесением растительного пепла, наоборот, наибольшее суммарное выделение диоксида углерода оказалось в почве под лесом, что объясняется большей исходной величиной микробной биомассы в почве этого ценоза (см. Главу 2 «Объекты и методы исследований»). Пирогенно-преобразованный материал представляет собой субстрат, содержащий органические соединения не полностью сгоревшего опада и минеральные элементы (см. Приложения табл. 1). В результате горения присутствующие в растительных остатках полисахариды, протеины и гетероциклические азотистые соединения преобразуются в ароматические соединения (Cheng et al., 2003). Более грубый лесной опад минерализуется при слабом пожаре менее интенсивно по сравнению с луговым войлоком. С этой точки зрения органические вещества в составе лесного пепла сохраняют более высокую доступность для микробного разложения по сравнению с пеплом луга. В связи с этим процесс

преобразования лесного пепла протекал более интенсивно, чем минерализация пепла, собранного с лугового участка.

3.4.2. Изменение функциональной структуры микробного сообщества и содержания микробной биомассы почв в процессе разложения растительных остатков и пирогенно-трансформированного материала

В период интенсивной минерализации кривые, характеризующие рост микроорганизмов в почве контролей, располагались ниже кривых, описывающих микробный рост в почвах с внесенными растительными субстратами (рис. 3.17.а).

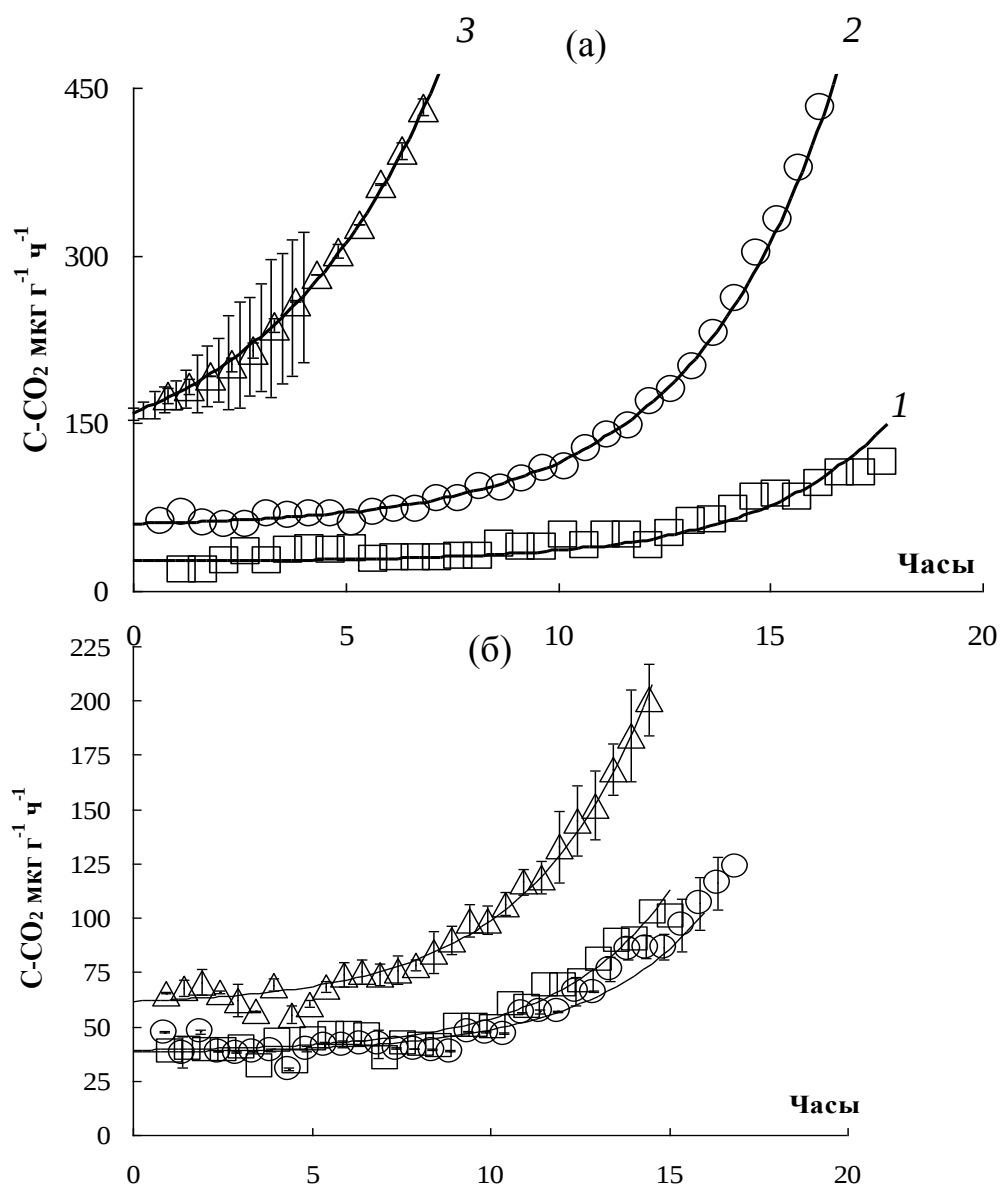


Рисунок 3.17. Кинетика дыхательного отклика микроорганизмов на внесение глюкозы в период интенсивной (а) и замедленной (б) минерализации

растительных остатков и пепла на примере лесного (а) лугового (б) ценозов:
1 - почва с растительными остатками, 2 - почва с пеплом, 3 - контроль.
Экспериментальные значения интенсивности дыхания представлены символами, расчетные значения (уравнение 1) - кривыми.

Длительность периода, необходимого микроорганизмам для перехода к экспоненциальному росту (t_{lag}), сократилась по сравнению с контролем на 9 ч, в варианте «лес РО» и на 4 ч в почве с внесением растительного пепла (табл. 3.5.). В почве лугового ценоза была обнаружена аналогичная тенденция, причем длительность лаг-периода в варианте «луг РО» сократилась на 12 ч по сравнению с контролем.

Таблица 3.5. Влияние минерализации растительных субстратов на длительность лаг-периода (t_{lag}), на время генерации общей (T_g^{total}) и активной (T_g^a) микробной биомассы, и на экономический коэффициент потребления субстрата (Y)

Вариант	Интенсивная минерализация (0 - 5 сут)			Замедление минерализации (5 - 25 сут)			Окончание минерализации (25 - 40 сут)					
	t_{lag} , ч	T_g^a , ч	T_g^{total} , сут.	t_{lag} , ч	T_g^a , ч	T_g^{total} , сут.	t_{lag} , ч	T_g^a , ч	T_g^{total} , сут.	МТТ*, сут.	T_t , сут.	** Y
Лес К	13,9	$2,16 \pm 0,03$	79 ± 2	17,5	$2,3 \pm 0,42$	$191 \pm 1,5$	12,7	$2,1 \pm 0,09$	$56 \pm 1,76$	20	80	0,17
Лес РО	4,4	$2,88 \pm 0,02$	4 ± 3	11,4	$2,5 \pm 0,11$	$25 \pm 2,3$	10,8	$2,3 \pm 0,08$	$24 \pm 2,15$	12	35	0,22
Лес П	9,5	$2,28 \pm 0,21$	$17 \pm 2,12$	13,9	$2,6 \pm 0,17$	$46 \pm 2,2$	12,0	$2,5 \pm 0,05$	$31 \pm 2,3$	23	44	0,30
Луг К	13,0	$2,12 \pm 0,23$	$63 \pm 1,6$	12,9	$2,2 \pm 0,23$	58 ± 2	15,8	$2,5 \pm 0,36$	$87 \pm 1,7$	34	125	0,18
Луг РО	1,6	$2,86 \pm 0,22$	2 ± 3	11,4	$2,4 \pm 0,17$	$29 \pm 2,13$	9,8	$2,5 \pm 0,1$	$17 \pm 2,3$	9	24	0,24
Луг П	10	$2,34 \pm 0,05$	$19 \pm 2,2$	13,7	$2,8 \pm 0,22$	$32 \pm 2,5$	10,3	$2,6 \pm 0,1$	$17 \pm 2,45$	30	24	0,51

* Величины МТТ, рассчитанные на основании экспериментально полученных данных с использованием $Y = 0.45$.

** Величины Y , рассчитанные по формуле 9.

Это означает, что в почве, «активированной» внесением растительных остатков, к моменту внесения глюкозо-минеральной смеси присутствовало достаточное количество активных микроорганизмов, способных к немедленному интенсивному росту, что подтверждается резким увеличением общей и активной микробной биомассы по сравнению с контролем (рис. 3.18, 3.19).

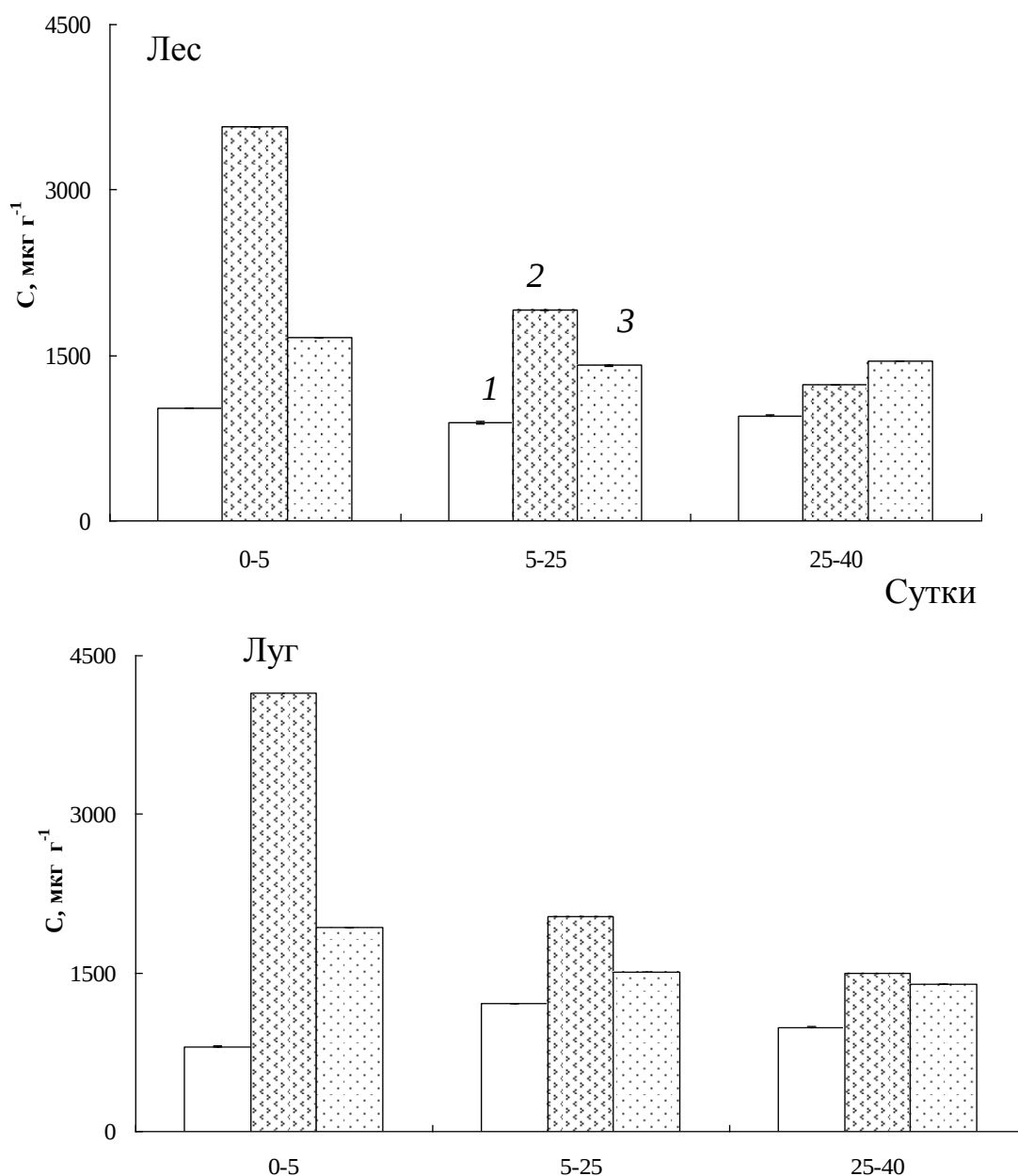


Рисунок 3.18. Содержание общей микробной биомассы в: 1 - контрольной почве, 2 - почве с растительными остатками, 3 - почве с пеплом.

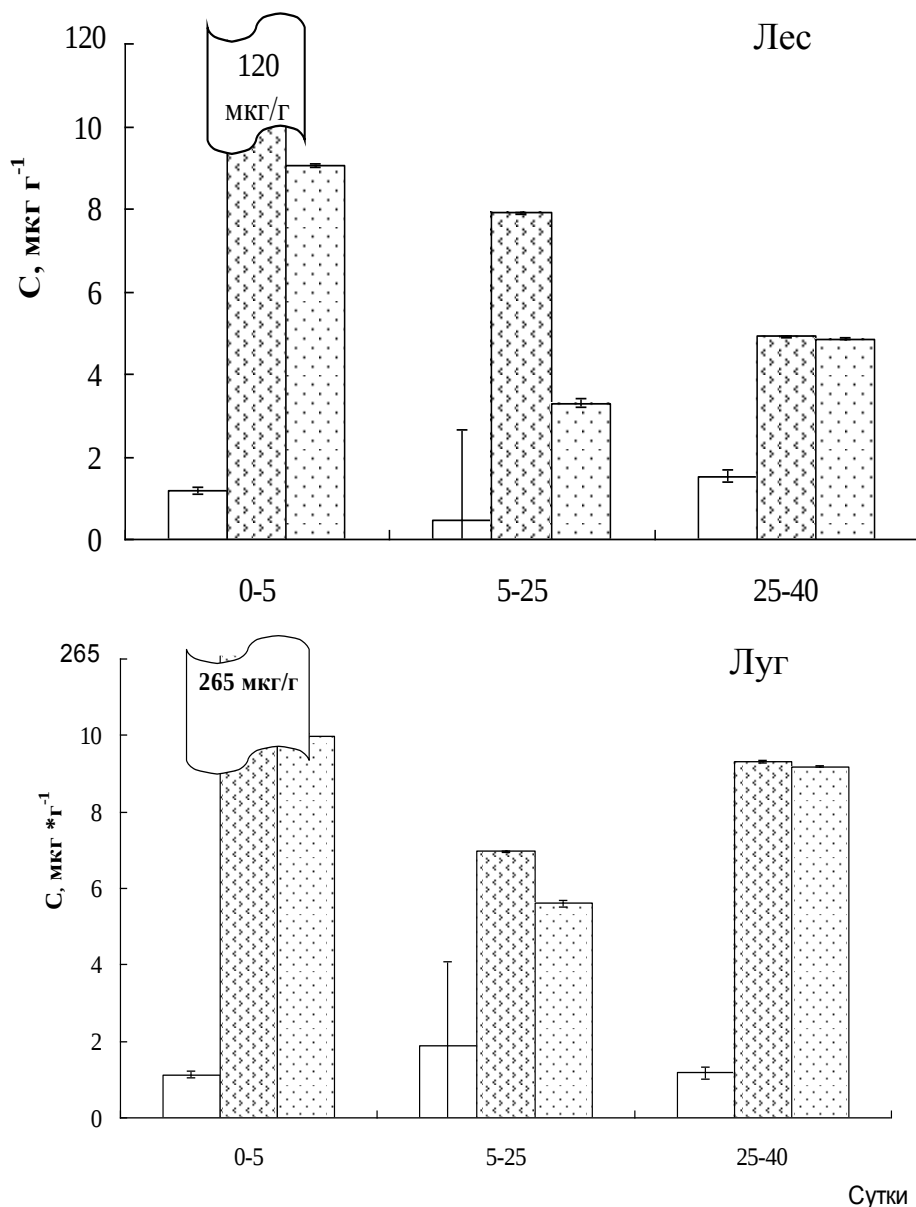


Рисунок 3.19. Содержание активной микробной биомассы в: 1 - контрольной почве, 2 - почве с растительными остатками, 3 - почве с пеплом.

Таким образом, разложение растительных субстратов инициировало переход микроорганизмов в состояние активного роста, поэтому микробное сообщество оказалось способным потреблять внесенную в почву глюкозу практически без лаг-периода. В почве с растительным пеплом наблюдали продолжительный период задержки микробного роста, при этом форма респираторных кривых оказалась более пологой, чем в контрольном варианте. Различия между вариантами с растительными остатками и контролем были наиболее выражены на этапе интенсивной минерализации

(рис. 3.20 а,б), тогда как в почве, обогащенной растительным пеплом - в период замедления минерализационных процессов (рис. 3.20 в). В последующие периоды респираторный отклик в почвах с растительными остатками и пеплом уменьшался, при этом форма кривых оказывалась более пологой (рис. 3.20 г).

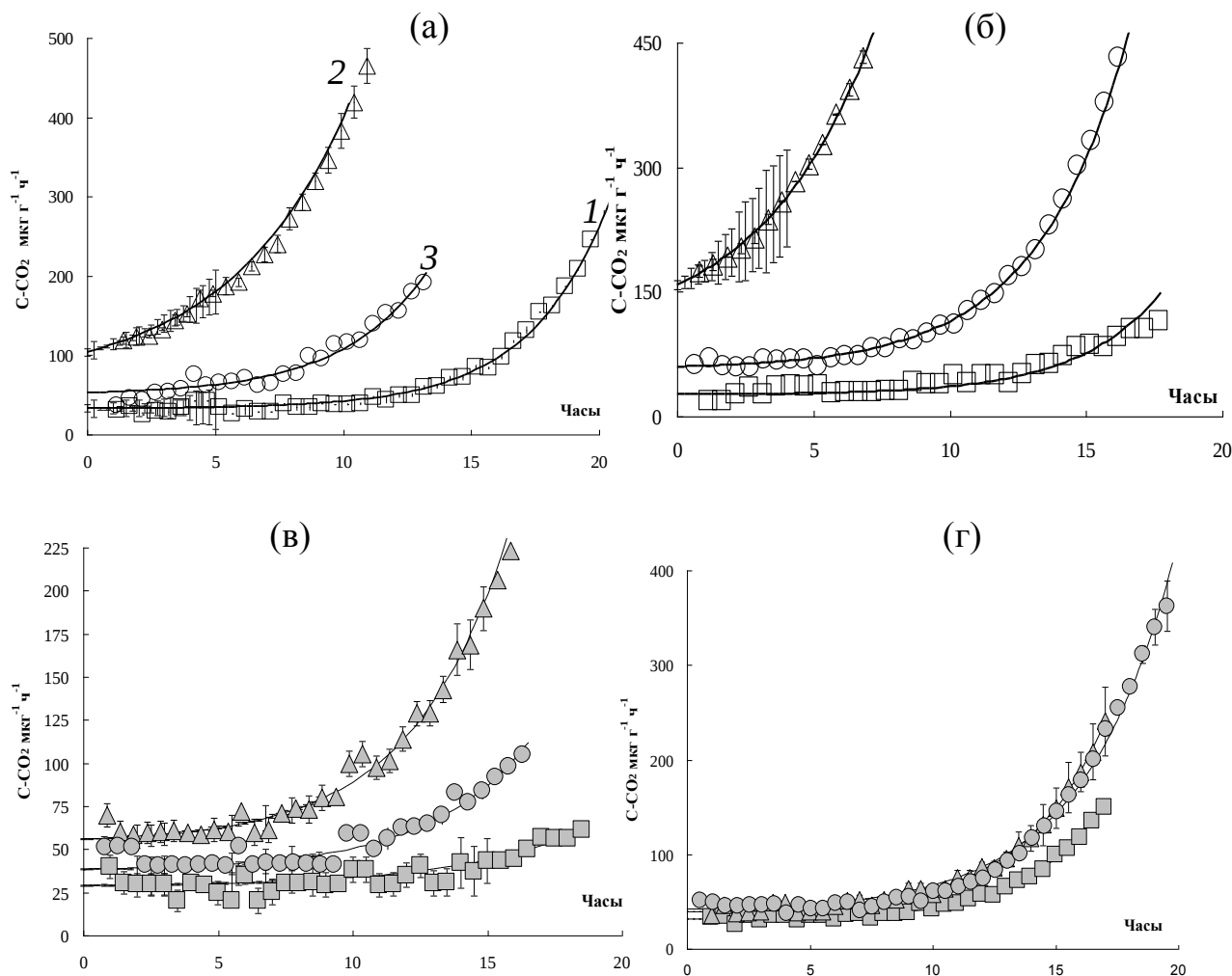


Рисунок 3.20. Динамика респираторного отклика микроорганизмов на внесение глюкозы в почвах, обогащенных растительными остатками и пироженно-трансформированным растительным материалом, в период интенсивной минерализации ((а) - почва под лесом, (б) - почва пол лугом), в период замедления на примере почвы под лесом (в), и в период окончания минерализации на примере почвы луга (г): 1 – почва с растительными остатками, 2 – почва с пироженно-трансформированным материалом и 3 - контроль.

3.4.3. Содержание общей и активной микробной биомассы и интенсивность продуцирования CO₂

Внесение субстратов привело к увеличению микробной биомассы по сравнению с контролем в обоих ценозах: в почвах с растительным пеплом в 1,5 и 2,5 раза, а в почвах, обогащенных растительными остатками - в 3 и 5 раз для леса и луга, соответственно. Биомасса микроорганизмов в почве, инкубировавшейся с пеплом, оказалась в 1,6 - 2 раза ниже, чем в почве с растительными остатками. В почве под лугом наблюдали большее увеличение микробной биомассы, чем в почве под лесом (рис. 24а).

Динамика активной биомассы в нашем эксперименте отражала доступность для преобразования внесенных в почву субстратов: обогащение почвы растительными остатками и пеплом, соответственно, привело к 100-200-кратному и 9 - 10-кратному увеличению доли активной биомассы в почвах обоих ценозов (рис. 3.19 в,г). Это показывает, что в растительных остатках содержание доступных соединений было выше по сравнению с растительным пеплом, и по мере исчерпания этих веществ содержание активных микроорганизмов уменьшалось; однако к концу инкубации оно все еще превышало контроль в 5 - 10 раз, что вполне соответствовало стадии разложения труднодоступных фракций растительных субстратов.

Величина максимальной удельной скорости роста микроорганизмов (μ_m), полученная после аппроксимации респираторных кривых по модели (1), в ходе инкубации контрольной почвы под лесом и под лугом достоверно не менялась, отражая постоянный характер роста почвенных микроорганизмов. Внесение в почву растительных остатков привело к резкому достоверному снижению величины μ_m в период интенсивной минерализации (рис. 3.21), что говорит об активации медленно растущих микроорганизмов-деструкторов с К-стратегией. Изменение доминирующей стратегии в почвах, обогащенных растительными остатками, было резким, но кратковременным: в ходе инкубации разница между скоростями роста в контрольной и обогащенной

субстратами почвах сглаживалась, оставаясь достоверной к концу инкубации только в почвах лесного ценоза.

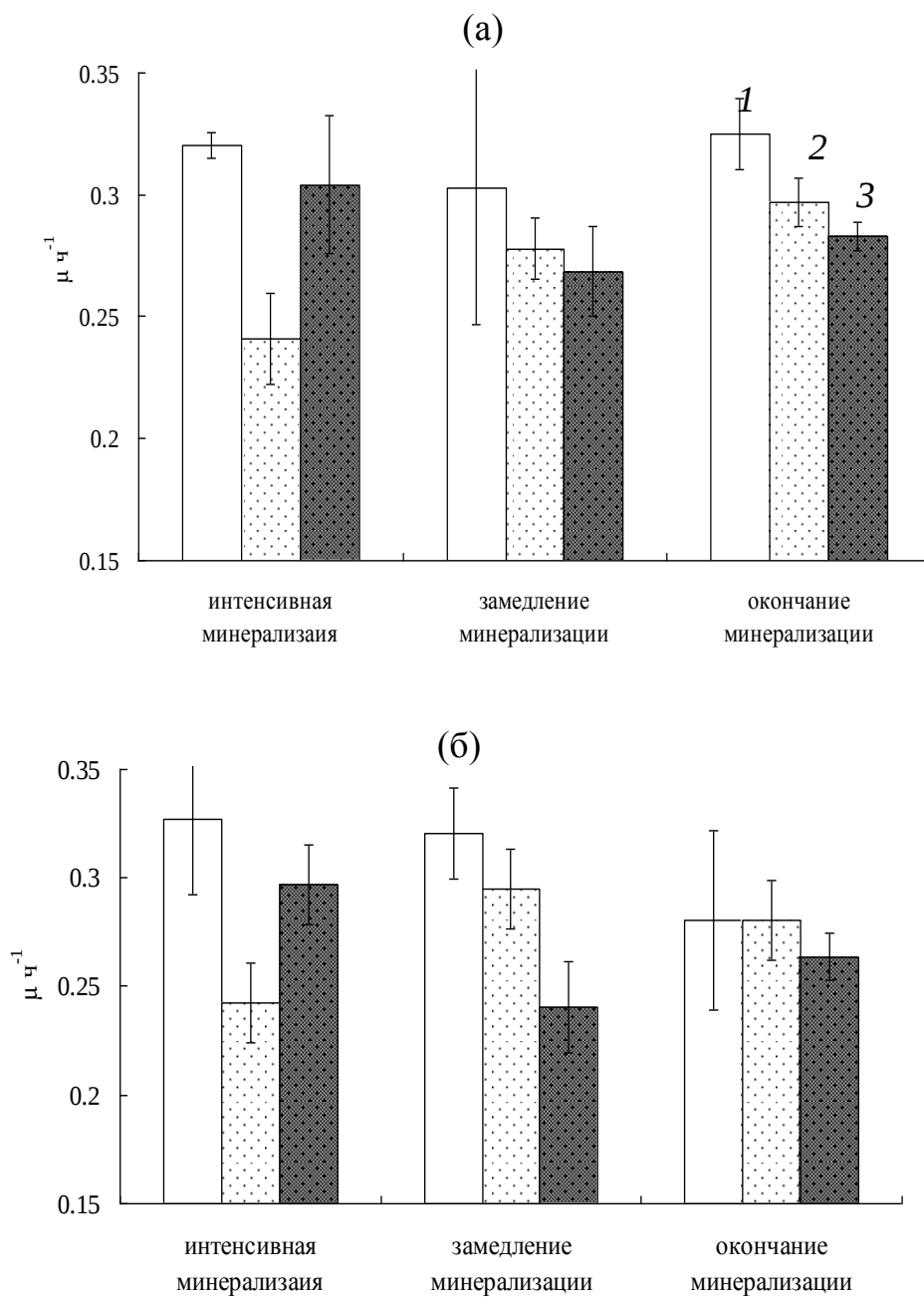


Рисунок 3.21. Динамика максимальной удельной скорости роста в почве под лесом (а) лугом (б): 1 - контрольной почве, 2 - почве с растительными остатками, 3 - почве с пеплом.

В период интенсивной минерализации величина максимальной удельной скорости роста в варианте с растительным пеплом не отличалась достоверно от значений μ в контрольной почве. Однако в период замедления

минерализации произошло снижение максимальной удельной скорости роста (по отношению к контролю), то есть в почве с пеплом микроорганизмы с К-стратегией доминировали только на поздних этапах минерализации. По мере истощения доступных соединений растительного пепла, преимущество получали микроорганизмы, ферментные системы которых позволяют разлагать труднодоступные субстраты и извлекать недостающие соединения из органического вещества почвы, то есть. К-стратеги. Таким образом, смена стратегии роста по мере истощения доступных субстратов позволяет микроорганизмам компенсировать субстратное лимитирование за счет разложения полимерных соединений, содержащихся в пепле и в ПОВ. По сравнению с вариантом с внесением растительных остатков, структурно-функциональные изменения в почве с пеплом происходили медленнее, но отчетливее сохранялась разница по отношению к сообществу контрольной почвы. Двухфакторный дисперсионный анализ подтвердил, что в конце инкубации на максимальную удельную скорость роста оказывали влияние оба фактора: и качество субстрата, и тип растительного ценоза. Вклад типа растительности (луговой и лесной ценозы) составил 36%, а влияние качества субстрата составило 30% от общей вариабельности значений максимальной удельной скорости роста микроорганизмов. Таким образом, величина максимальной удельной скорости роста микроорганизмов является более чувствительным индикатором по сравнению с кумулятивной эмиссией CO_2 , отражая функциональные изменения микробных сообществ.

Микробное сообщество, развивающееся на внесенных субстратах, характеризовалось большей биомассой и более коротким лаг-периодом, однако меньшими скоростями роста микроорганизмов по сравнению с контролем, то есть в наших экспериментах не было обнаружено положительной корреляции продолжительности лаг-периода со скоростью роста микроорганизмов. Таким образом, наше, как и предшествующие исследования (Благодатская, 2006), демонстрирует, что длительность лаг-периода отражает время, необходимое микроорганизмам на перестройку

метаболизма для перехода из состояния покоя к активному росту, и является дополнительной характеристикой микробного сообщества, которое не всегда связано со стратегией роста. Показатель удельной скорости роста микроорганизмов является основным, характеризующим относительное доминирование микроорганизмов с той или иной стратегией выживания для каждой экологической обстановки.

Обогащение почвы растительными субстратами привело к сокращению времени генерации общей микробной биомассы T_g^{total} (по сравнению с контролем) в вариантах с внесением растительных остатков в 19 и 32 раза для леса и луга, соответственно, а в почвах с пеплом - в 4 и 3 раза для леса и луга (табл. 3.5). Очевидно, внесение субстратов привело не только к увеличению общей микробной биомассы, но и к ускорению ее оборачиваемости за счет резкого увеличения доли активных микроорганизмов. Характерно, что сокращение времени генерации общей биомассы сопровождалось увеличением времени генерации активной биомассы (максимально в 1,3 раза по отношению к контролю). Это позволяет заключить, что наиболее активными деструкторами внесенных субстратов оказались медленнорастущие микроорганизмы. К концу инкубации время генерации общей микробной биомассы в вариантах с растительными остатками и пеплом было меньшим, чем в контрольных почвах, что объясняется продолжением минерализации в почвах с субстратами.

Величины МТТ, составившие в нашем исследовании 24 - 125 сут, согласуются со значениями времени оборачиваемости, полученными для почв агроценозов (40 - 80 сут) (Blagodatsky et al., 2000). Экспериментально полученные величины времени оборачиваемости микробной биомассы МТТ и T_t , позволяют сделать вывод об одинаковом характере изменений этих показателей в почвах с внесением растительных остатков и пепла (табл. 3.5). Однако по абсолютным значениям наблюдалось несоответствие МТТ и T_t . Причиной такого несоответствия могло быть некорректное использование теоретических значений экономического коэффициента $Y = 0,45$,

определенных для чистых культур микроорганизмов при вычислениях МТТ. В отличие от МТТ, расчет величин T_t основан только на экспериментально полученных данных без использования теоретических допущений. Исходя из того, что значения МТТ и T_t должны быть одинаковыми, так как характеризуют оборачиваемость микробной биомассы, можно рассчитать истинные значения экономического коэффициента Y :

$$Y = MB / (T_t \times (R_s - MB \times R_m) + MB) \quad (3.1)$$

Расчетные значения (при $MTT = T_t$) приведены в табл. 3.5. Увеличение значений коэффициента Y в ряду: контроль << почва с растительными остатками << почва с пеплом показывает, что наиболее эффективно субстрат использовали микроорганизмы почв, обогащенных растительными остатками и пеплом, по сравнению с микроорганизмами в контрольной почве. Это подтверждает наш вывод о доминировании микроорганизмов с К-стратегией в почвах, обогащенных субстратами (растительными остатками и пеплом).

3.4.4. Затравочный эффект (ЗЭ) в почвах с растительными остатками и пирогенно-трансформированным растительным материалом

В нашем эксперименте использованы 2 вида субстратов: растительные остатки, которые относительно богаты углеродом и бедны минеральными элементами, и пирогенно-трансформированный материал, содержащий труднодоступные соединения органического происхождения и относительно обогащенный минеральными элементами (Schimel, Weintraub, 2003), в частности, азотом (Rumpel et. al., 2007). Растительные остатки и пирогенно-преобразованный субстрат могут инициировать микробное разложение почвенного органического вещества (то есть вызывать затравочный эффект) для восполнения дефицита элементов питания. Однако дизайн нашего эксперимента не позволяет непосредственно оценить затравочный эффект, поскольку внесенные субстраты не были мечеными. Согласно балансовым оценкам, к концу инкубации минерализовалось около 10% CO_2 от внесенного

углерода растительного пепла и около 16% С растительных остатков для леса и луга, соответственно. Как показали наши расчеты, учитывающие потери веса растительного материала при пожаре, в процессе горения растительности в атмосферу улетучилось около 90% углерода от его содержания в растительных остатках. Принимая эффективность использования органического углерода почвенными микроорганизмами (рассчитанного по формуле 3.1) $Y = 0,2-0,5$ можно заключить, что минерализации подверглось не более 20% от внесенных субстратов. Это затрудняет прямую оценку затравочного эффекта. Однако косвенно судить о затравочном эффекте можно по изменению стратегии роста микроорганизмов. Внесенного с растительными остатками и сохранившегося в пирогенно-преобразованном материале количества органического субстрата оказалось достаточно для того, чтобы вызвать структурные изменения микробного сообщества, приводящие к доминированию микроорганизмов с К-стратегией. Известно, что К-стратеги обладают ферментными системами с высоким сродством к труднодоступным субстратам (Blagodatskaya et. al., 2009). Действие экзоферментов, выделяемых такими микроорганизмами, способно распространяться не только на внесенные органические соединения, но и на аналогичные соединения, содержащиеся в органическом веществе почвы (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2008), то есть вызывать затравочный эффект, выражающийся в ускорении разложения почвенного органического вещества.

Вероятность возникновения ЗЭ была наиболее высока, когда удельные скорости роста микроорганизмов максимально отличались от контроля: в почвах с внесением растительных остатков – в период интенсивной минерализации, а в почве, обогащенной пеплом, – в период замедления минерализации. В почве, обогащенной пеплом, затравочные взаимодействия могли быть выражены сильнее, чем в почве с растительными остатками, поскольку структурно функциональные изменения микробного сообщества были более устойчивыми, и микроорганизмы с К-стратегией оставались

активными в течение более длительного периода по сравнению с почвой, обогащенной растительными остатками.

Таким образом, поступление в почву пепла растительных палов влияет на круговорот углерода в системе почва-атмосфера посредством изменения функциональной структуры сообщества почвенных микроорганизмов.

3.5. Сравнение ИК-спектров органического вещества современной и погребенной подзолистой почвы

Известно, что спектры гуминовых кислот (ГК) имеют широкие и интенсивные полосы поглощения около $3500\text{--}3300\text{ см}^{-1}$, обусловленные гидроксильными группами, в той или иной мере связанные водородными связями, и только полоса поглощения 3600 см^{-1} (средняя или слабая) относится к валентным колебаниям несвязанной ОН группы (рис.1 Приложение 4).

Для всех образцов отмечаются линии ОН групп, связанных межмолекулярными водородными связями в интервале интенсивности спектра $3054\text{--}3540\text{ см}^{-1}$. Возможно также наличие в области $3400\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ валентных колебаний NH- групп гумусовых веществ. В частности, для них интенсивность спектра в области $3500\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ усиливается от современного органогенного горизонта подзолистой почвы к погребенному органогенному аналогу и приближается к эталону, что свидетельствует об усилении процесса межмолекулярного взаимодействия по водородным связям (полимеризации). При этом для изученных образцов по сравнению с контролем более четко проявляются линии в интервале $2930 - 2848\text{ см}^{-1}$, относящиеся к валентным колебаниям групп CH_2 , CH_3 и ОН гумусовых веществ.

Полученные данные показывают, в контроле имеется небольшая полоса поглощения при 1744 см^{-1} , указывающая на наличие ГК- COOH , а в изученных образцах кислотная форма ГК отсутствует. Во всех образцах (современном органогенном и погребенном органогенном горизонте) четко

проявляется группа от 1680 до 1650 см^{-1} (переменная в зависимости от образца), указывающая на различную степень замещения водорода карбоксильных групп $-\text{COO}-$. При этом большей способностью к замещению можно отнести ГК погребенного органогенного горизонта подзолистой почвы.

Хорошо проявляющуюся во всех образцах группу 1528 см^{-1} (для ГК1 - 1540 см^{-1}) можно отнести к группе «амид II». Гидроксильной группой и группой $=\text{C}-\text{O}-$ обусловлены также полосы в диапазоне 1230-1250 см^{-1} . Четко выделяются полосы деформационных колебаний ОН-спиртовых групп при 1150-1050 см^{-1} , по которым иногда удается выявить группы первичных и вторичных спиртов.

Слабые полосы 816 и 808 см^{-1} характерны для образца погребенной почвы, соответственно, их можно отнести к СН ароматическим при 2 и более незамещенных атомах водорода..

Таким образом, химическая структура ГК современного и погребенного органогенных горизонтов практически одинакова.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внесение глюкозы инициирует затравочный эффект в органогенных и минеральных горизонтах подзолистой почвы. Способность копитрофных и олиготрофных микроорганизмов вызывать затравочный эффект в органогенных и минеральных горизонтах определяется содержанием $\text{C}_{\text{орг}}$ и величиной микробной биомассы. Величина ЗЭ по абсолютным значениям закономерно снижалась от верхних органогенных к минеральным и погребенным горизонтам и не зависела от положения почвы в микроландшафте. Минимальным затравочный эффект был в погребенном органогенном горизонте, что также подтверждалось при оценке ЗЭ по отношению к контролю (для органогенных горизонтов). Большие величины абсолютного и относительного ЗЭ в минеральных почвенных горизонтах и гумусовом горизонте микропонижения (по сравнению с органогенными и

микроповышением) были связаны с усилением ферментативной активности на единицу микробной биомассы. Высокая эффективность потребления внесенной глюкозы была характерна для олиготрофных микроорганизмов минеральных горизонтов, это свидетельствует о преобладании микроорганизмов с К-стратегией в этих местообитаниях. Таким образом, более высокие величины ЗЭ на единицу внесенного углерода в обедненных энергией горизонтах В связаны с повышенной гидролитической активностью микроорганизмов с К-стратегией, о чем свидетельствует тесная корреляция активности целлюбиогидролазы со скоростью затравочного эффекта. Иначе говоря, в интенсивную фазу минерализации ОВ наблюдался *реальный* затравочный эффект.

Полученные результаты о влиянии микрорельефа на ЗЭ демонстрируют, что воздействие микрорельефа наиболее сильно выражено при дефиците энергии и элементов питания. Поступление воды атмосферных осадков приведет к большей эмиссии CO_2 из почв микроповышений по сравнению с почвами микропонижений. Такая же тенденция характерна при неконтролируемом кратковременном поступлении легкодоступных органических соединений в почвы, локализованные на разных элементах микроландшафта.

Исследование кинетики минерализационных процессов выявило, что в обедненных энергией минеральных горизонтах олиготрофным микроорганизмам потребовался 1-2 сут лаг-период для перехода в активное состояние, тогда как копиотрофные микроорганизмы органогенных горизонтов использовали глюкозу сразу после внесения. Аналогичная тенденция была характерна для погребенных аналогов. Таким образом, при погребении микроорганизмы сохраняют свои функциональные особенности в течение длительного времени. На основании вышесказанного можно заключить, что устойчивость почвенного органического вещества к микробному разложению определяется дефицитом поступления свежего субстрата в минеральные и погребенные почвенные горизонты.

При минерализации растительных остатков и пироженно трансформированного материала, в среднем, микроорганизмы интенсивнее разлагают растительные остатки, суммарная эмиссия из обогащенных растительными остатками вариантов в 2 раза превышала выделение CO_2 из почв с внесенным пеплом. Характерно, что процесс минерализации растительных остатков протекал наиболее интенсивно в почвах лугового ценоза, тогда как разложение пироженного материала оказалось наиболее высоким в почве леса. Пирогенное воздействие по-разному изменяет качество и доступность растительного материала лесного и лугового ценозов. Это приводит к непропорциональным изменениям эмиссии CO_2 из почвы и изменению структуры микробного сообщества.

Изменения в структуре микробных сообществ почв, инкубировавшихся с растительными остатками, были наиболее ярко выражены в период интенсивной минерализации, и проявлялись в уменьшении величины максимальной удельной скорости роста (в 1,3 и 1,4 раза для леса и луга, соответственно) по сравнению с контролем. Это свидетельствует об относительном доминировании микроорганизмов с К-стратегией. Короткая продолжительность лаг-периода, а также малые величины времени генерации для общей и активной биомассы, подтверждают, что микроорганизмы – К-стратеги, разлагающие растительные остатки, находились к моменту определения величины μ в активном состоянии.

В почвах с пироженно-трансформированным материалом доминирование К-стратегов наблюдалось в период замедления минерализационных процессов и сохранялось вплоть до конца наблюдения. Максимальная скорость роста микроорганизмов определялась как типом ценоза, так и качеством внесенного субстрата, и являлась более чувствительным показателем состояния микробного сообщества, чем физиологическая характеристика микроорганизмов (респираторная активность).

Экспериментально определенные величины экономического коэффициента Y в среднем оказались ниже теоретически принятого $Y = 0,45$ и варьировали в диапазоне $Y = 0,17-0,51$. Наиболее высоким значением Y , то есть наиболее эффективным использованием субстрата, характеризовалось микробное сообщество почв с растительным пеплом, что подтверждает доминирование в них микроорганизмов с К-стратегией.

С учетом экспериментально полученных величин эффективности потребления субстрата Y , разложение растительных остатков и пирогенно-преобразованного растительного материала до CO_2 составило не более 20% от внесенного количества. Невозможность разделения источников CO_2 в ходе продолжающейся минерализации субстратов не позволяет непосредственно судить о возникновении затравочных взаимодействий. Однако, косвенно судить о прайминг-эффекте можно по изменению стратегии роста микроорганизмов. Относительное доминирование в структуре микробных сообществ микроорганизмов с К-стратегией указывает на возможность возникновения затравочного эффекта в почвах обоих ценозов. В вариантах с растительным пеплом вероятность затравочных взаимодействий была выше, что подтверждается низкими значениями μ и высокой эффективностью потребления субстрата, сохранявшимися до конца инкубации.

ВЫВОДЫ

1. Изучены характерные особенности возникновения затравочного эффекта, инициированного внесением ^{14}C -глюкозы в органогенные и минеральные горизонты серой лесной и подзолистой почв лесной зоны. Установлено, что интенсивность затравочного эффекта, в основном, определялась содержанием $\text{C}_{\text{орг}}$, и сопряженными с ним параметрами: величиной микробной биомассы и активностью гидролитических ферментов. Величины ЗЭ в подзолистой почве в 7,6 раз превышали таковые в серой лесной почве.
2. Влияние контрастных трофических условий выражалось в более высоких величинах затравочного эффекта, инициированного копиотрофными микробными сообществами органогенных горизонтов, в 3,5 - 4 раза превышавших ЗЭ, вызванный деятельностью олиготрофных микробных сообществ минеральных горизонтов почв. При смене трофических условий, вызванных прекращением доступа свежего субстрата в погребенных почвах, происходило 2-3-кратное снижение величин затравочного эффекта по сравнению с современными почвами.
3. Стандартизированная оценка ЗЭ по отношению к контрольной почве и внесенному углероду выявила в минеральных горизонтах по сравнению с органогенными в два раза более высокую удельную минерализационную активность при более эффективном потреблении субстрата, характерном для микроорганизмов с К-стратегией.
4. При развитии ЗЭ в гумусовых горизонтах серых лесных почв увеличивалась активность внеклеточных ферментов целлюбиогидролазы и ксиланазы, осуществляющих разложение высокомолекулярных соединений растительного происхождения, что подтверждало участие микроорганизмов - К-стратегов в минерализации ПОВ.
5. Влияние микрорельефа проявлялось в верхних гумусовых горизонтах в ходе долговременного ЗЭ, который был в 1,5 раза выше на

микрорасширению по сравнению с микрорасширением, и сопровождался усилением ферментативной активности.

6. Анализ кинетических показателей роста микроорганизмов выявил, что поступление в почву пирогазно-измененных растительных остатков вызывает функциональные изменения в структуре микробного сообщества, приводящие к доминированию медленно растущих микроорганизмов, способных вызывать затравочный эффект. Таким образом, даже кратковременные пожары в перспективе создают условия, приводящие к интенсификации разложения ПОВ, и, как следствие, создают угрозу запасам органического вещества почвы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Л. Н. Органическое вещество почвы и процессы его трансформации. Под ред. И. С. Кауричева. — 3-е изд. — Москва. 1982.
2. Алифанов, В.М. Изменение серых лесных почв при сельскохозяйственном использовании / В.М. Алифанов // Почвоведение.- 1979.- № 1.- С. 37-47.
3. Алифанов В.М. Палеокриогенез и современное почвообразование. ОНТИ. Пушкино: 1995. 320 с.
4. Алифанов В.М., Гугалинская Л.А., Овчинников А.Ю. Палеокриогенез и разнообразие почв центра восточно-европейской равнины. ГЕОС. Пушкино: 2010. 145 с.
5. Ананьева, Н.Д., Углерод микробной биомассы и микробное продуцирование двуокси углерода дерново-подзолистых почв постагрогенных биогеоценозов и коренных ельников южной тайги (Костромская область) / Н.Д. Ананьева, Е.А. Сусьян, И.М. Рыжова, Е.О. Бочарникова, Е.В. Стольникова // Почвоведение. - 2009.- № 9.- С. 1108-1116.
6. Ананьева, Н.Д. Методические аспекты определения скорости субстрат-индуцированного дыхания почвенных микроорганизмов / Н.Д. Ананьева, Е.В. Благодатская, Д.Б. Орлинский, Т.Н. Мякшина // Почвоведение. -1993. -№11. -С. 72-77.
7. Ананьева, Н.Д. Оценка устойчивости микробных комплексов почв к природным и антропогенным воздействиям / Н.Д. Ананьева, Е.В. Благодатская, Т.С. Демкина // Почвоведение.- 2002.- № 5.- С. 580-587.
8. Благодатский, С.А. Годовая эмиссия и баланс CO₂ в почвах лесных и луговых экосистем Приокско- Террасного заповедника / С.А. Благодатский, И.Н. Курганова, В.Н. Кудеяров // Вестник МГУ, сер. Биология. -2004.- №1. - С. 32-38.

9. Благодатская, Е.В. Характеристика состояния микробного сообщества почв по величине метаболического коэффициента / Е.В. Благодатская, Н.Д. Ананьева, Т.Н. Мякшина // Почвоведение. - 1995. - №2. - С. 205-210.
10. Благодатский, С.А., Ларионова А.А., Евдокимов И.В. Вклад корневого дыхания в эмиссию CO₂ из почвы / В кн.: Дыхание почвы, под ред. Г.А. Заварзина и В.Н. Кудеярова. ОНТИ. Пущино. 1993. С. 26-32.
11. Благодатский, С.А. Кинетика и стратегии роста микроорганизмов в черноземной почве после длительного применения различных систем удобрений / С.А. Благодатский, Е.В. Благодатская, Л.Н. Розанова // Микробиология. - 1994. - Т. 63.-№ 2. - С. 298-307.
12. Благодатская, Е.В. Изменение экологической стратегии микробного сообщества почвы, инициированное внесением глюкозы / Е.В. Благодатская, И.Н. Богомолова, С.А. Благодатский // Почвоведение. - 2001. - № 5. - С. 600-608.
13. Благодатский, С.А. Кинетика дыхательного отклика микробных сообществ почвы и ризосферы в полевом опыте с повышенной концентрацией атмосферного CO₂ / С.А. Благодатский, Е.В. Благодатская, Т.Х. Андерсон, Х.Й. Вайгель // Почвоведение.- 2006. - № 3. - С. 325-333.
14. Благодатская, Е.В. Влияние свинца на дыхание и биомассу микроорганизмов серой лесной почвы в многолетнем полевом эксперименте / Е.В. Благодатская, Т.В. Пампура, Т.Н. Мякшина, Е.Г. Демьянова // Почвоведение. - 2006. - № 5. - С. 559-568.
15. Благодатский, С.А. Действие минеральных соединений азота на интенсивность дыхания и на эффективность роста микроорганизмов в почве / С.А. Благодатский, А.А. Ларионова, И.В. Евдокимов // Почвоведение. - 1992. - № 9. - С. 88-96.
16. Богатырев, Л. Г. Биогеохимия – от биологического круговорота к биогеохимическим циклам / Л. Г. Богатырев, О. Б. Цветнова, А. И.

- Щеглов // Проблемы биогеохимии и геохимической экологии. — 2007. — Т. 2, № 4. — С. 5–15..
17. Богородская, А.В. Состояние микробных комплексов почв лесных экосистем после пожаров и дефолиации древостоев непарным шелкопрядом / А.В. Богородская, Ю.Н. Баранчиков, Г.А. Иванова // Почвоведение. - 2009. - № 3. - С. 337-345.
 18. Ванюшина, А. Я. Органо-минеральные взаимодействия в почвах (обзор литературы) / А. Я. Ванюшина, Л. С. Травникова // Почвоведение. — 2003. — № 4. — С. 418-428.
 19. Ганжара, Н.Ф. Концептуальная модель гумусообразования / Н.Ф. Ганжара // Почвоведение .- 1997. - №9.- С. 1075-1080.
 20. Ганжара, Н.Ф., Солодова Т.А. О скорости разложения свежих органических веществ в почвах // Современные процессы почвообразования и их регулирование в условиях интенсивных систем земледелия. М.: 1985. С. 18-23.
 21. Гузев В.С., Бызов Б.А., Звягинцев Д.Г. Эффект “задержки” в регуляции микробного разложения полимеров в почве по типу катаболитной репрессии в журнале Изв. АН СССР, сер. биол, № 6, с. 834-841 1986
 22. Девятова, Т. А. Экология почв / Т. Н. Крамарева, Т. А. Девятова// .— Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета - 2012 .— 78 с. — 78 с.
 23. Демкина, Т.С. Характеристика микробных сообществ степных подкуранных палеопочв сарматского времени (I – IV вв. н. э.) / Т.С. Демкина, Т.Э. Хомутова, Н.Н. Каширская, И.В. Стретович, В.А. Демкин // Почвоведение. -2009. -№ 7.- С. 836-846.
 24. Дергачева М. И., Макеев А. О. Палеопочвоведение: теоретические и прикладные аспекты // Палеопочвы, природная среда и методы их диагностики. — ЗАО "Офсет" Новосибирск, 2012. — С. 15–24.
 25. Дергачева М.И., Зыкина В.С. Органическое вещество ископаемых почв Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1988. — 128 с.

26. Добровольский Г В., Никитин Е.Д. Сохранение почв как незаменимого компонента биосферы. М.: Наука. 2000, 185 с.
27. Добровольская, Т.Г. Бактериальные комплексы верхового торфяника в условиях различного микрорельефа / Т.Г. Добровольская, А.В. Головченко, А.В. Якушев, Е.Н. Юрченко, А.С. Манучаров, И.Ю. Чернов // Почвоведение. - 2017. - № 4. - С. 483-489.
28. Дымов, А.А. Impact of forest fire on soil properties (review) / А.А. Дымов, Е.В. Абакумов, И.Н. Безкоровайная, А.С. Прокушкин, Я.В. Кузяков Е.Ю.Милановский // Теоретическая и прикладная экология. — 2018. — по. 4. — Р. 13–23.
29. Ермолаев А.М., Ширшова Л.Т. Влияние погодных условий и режима использования сеяного луга на продуктивность травостоя и свойства серых лесных почв // Почвоведение. 2000. - № 12. - С. 1501-1508.
30. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. – М.: Наука. 2004. 348 с.
31. Заварзина А.Г. Реконструкция палеопочв на основе современных процессов гумусообразования. Палеопочвы и индикаторы континентального выветривания в истории биосферы. ПИН РАН: Москва, 2010. с.36- 69.
32. Звягинцев, Д. Г. Микробная сукцессия в почве и определение экологических стратегий конкретных популяций / Д. Г. Звягинцев, П. А. Кожевин, Г. А. Кочкина, Л. М. Полянская // Микробиология. — 1981. — Т. 50. - № 2. — С. 353–358.
33. Инишева Л.И., Ивлева С.Н., Щербакова Т.А. Руководство по определению ферментативной активности торфяных почв и торфов. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2002. – 119 с.
34. Кудеяров, В.Н. Роль почв в круговороте углерода / В.Н. Кудеяров // Почвоведение. - 2005. - № 7. - С. 915-923.

35. Кудеяров В.Н., Глобальные изменения климата и почвенный покров / В.Н., Кудеяров В.А. Демкин, Д.А. Гиличинский, С.В. Горячкин, В.А. Рожков // Почвоведение. - 2009. -С.1027-1042.
36. Кудеяров В.Н. Азотно-углеродный баланс в почве // Почвоведение. - 1999. - №1. - С. 73-82.
37. Кудеяров, В.Н. Роль почв в круговороте углерода / В.Н. Кудеяров // Почвоведение.- 2005. - № 7. - С. 915-923.
38. Кудеяров, В.Н. Дыхание почв России: анализ базы данных, многолетний мониторинг, моделирование, общие оценки / В.Н. Кудеяров, И.Н. Курганова // Почвоведение. - 2005. - № 9. - С.1112-1121.
39. Кузнецова, Т.В., Минерализационно-иммобилизационная оборачиваемость азота в почве при разной обеспеченности разлагаемым органическим веществом / Т.В. Кузнецова, А.К. Ходжаева, Н.А. Семенова, Л.А. Иванникова, В.М. Семенов // Агрохимия. - 2006. - №6. - С. 5-12.
40. Курганова, И.Н. Оценка эмиссии диоксида углерода из пахотных серых лесных почв / И.Н. Курганова, В.О. Лопес-де-Гереню Л.Н. Розанова, Д.В. Сапронов, Т.Н. Мякшина, В.Н. Кудеяров // Агрохимия. - 2002. - №9. - С. 52-57.
41. Ларионова, А.А. Эмиссия диоксида углерода из агросерых почв при изменении климата / А.А. Ларионова, И.Н. Курганова, В.О. Лопес де Гереню, Б.Н. Золотарева, И.В. Евдокимов, В.Н. Кудеяров // Почвоведение. - 2010. - №2. - С. 186-195.
42. Ларионова А.А. Определение баланса углерода в естественных и антропогенных экосистемах В кн. «Методы исследования органического вещества почвы». 2005. М.:Россельхозакадемия. ГНУ ВНИПТИОУ,С. 340-358.
43. Ларионова, А.А. Годовая эмиссия CO₂ из серых лесных почв Южного Подмосковья / А.А. Ларионова, Л.Н. Розанова, Т.С. Дёмкина, И.В. Евдокимов С.А. Благодатский // Почвоведение. - 2001. - №1 С. - 72-80.

44. Лысак, Л.В. Численность и таксономический состав наноформ бактерий в некоторых почвах России / Л.В. Лысак, Е.В. Лапыгина, И.А. Кононова, Д.Г. Звягинцев // Почвоведение. - 2010. - № 7. - С. 819-824.
45. Макушина, А.А. Влияние антропогенного фактора на структуру и функциональность ландшафтов южного Подмосковья/ А.А. Макушина, В.Р. Калинина, П.Н. Резанов // Вестник Московского Ун-та. Сер. Почвоведение -1990. - №6. - С. 30-36.
46. Мамаева, Е.В. Агрохимические и биологические характеристики склоновых почв / Е.В. Мамаева, П.Ю. Галицкая, Б.У. Шафигуллин, С.Ю. Селивановская // Ученые записки Казанского ун-та. Сер. Естественные науки. - 2012. - Т. 154. - Кн. 3. - С. 148–157.
47. Марфенина Т.А. Микробиологическая аспекты охраны почв. М.: Наука, 1999. 113 с.
48. Мамилов, А.Ш. Влияние трудногидролизуемых источников углерода на динамику микробной биомассы и дыхание почвы / А.Ш. Мамилов, Ш.З. Мамилов, Д.Г. Звягинцев // Вестник Московского Ун-та. Сер. 17. Почвоведение. - 1999. - №1. - С. 51-54.
49. Меняйло, О.В. Влияние азота на окисление метана почвами под разными древесными породами / О.В. Меняйло, А.Л. Степанов, М.И. Макаров, Р. Конрад// Доклады АН. - 2012. - Т. 447. - № 1. - С. 103–105
50. Меняйло, О.В. Роль азота в регуляции цикла углерода в лесных экосистемах / О.В. Меняйло, А.И. Матвиенко, М.И. Макаров, Ш.К. Ченг// Лесоведение. — 2018. — № 2. — С. 143–159.
51. Моргун, Е. Г. Возможности и проблемы использования методов геохимии стабильных изотопов углерода в почвенных исследованиях / Е. Г. Моргун, И. В. Ковда, Я. Г. Рысков, С. А. Олейник // Почвоведение. — 2008. — № 3. — С. 299–310.

52. Полянская Л.М., Тригер Е.Г., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Кинетическое описание структуры комплекса почвенных актиномицетов // Микробиология. — 1988. — Т. 57. — С. 854–858.
53. Потоки и пулы углерода в наземных экосистемах России / Кудеяров В.Н., Благодатский С.А., Борисов А.В., Воронин П.Ю., Демкин В.А., Демкина Т.С., Евдокимов И.В., Замолотчиков Д.Г., Карелин Д.В., Комаров А.С., Курганова И.Н., Ларионова А.А., Лопес-де-Гереню В.О., Утин А.И., Чертов О.Г.// отв. Ред. Заварзин Г.А. Наука. Москва. 2007. 315с.52.
54. Розанов Б.Г. Морфология почв / Б.Г. Розанов . 1983. – Изд.-во МГУ – 320 стр.
55. Семенов, В.М. Экспериментальное определение активного органического вещества в некоторых почвах природных и сельскохозяйственных экосистем / В.М. Семенов, И.К. Кравченко, Л.А. Иванникова, Т.В. Кузнецова, Н.А. Семенова, М. Гисперт, Дж. Пардини // Почвоведение. - 2006. - №3. - С. 282-292.
56. Семенов В.М., Когут Б.М. Почвенное органическое вещество. – М.: ГЕОС, 2015. – 233 с.
57. Селивановская, С.Ю. Микробиологические процессы в серой лесной почве, обработанной компостом из осадка сточных вод / С.Ю. Селивановская, В.З. Латыпова, Л.А Губаева // Почвоведение. - 2006. - №4. - С. 495-501.
58. Сорокин, Н.Д. Микробиологический мониторинг лесных экосистем Сибири при различных антропогенных воздействиях / Н.Д. Сорокин // Успехи современной биологии. - 1993. -Т. 113. - Вып. 2. - С. 131-140.
59. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. Наука. Москва, 2005.252 с.
60. Старцев, В.В., Дымов А.А., Прокушкин А.С. Почвы постпирогенных лиственничников Средней Сибири: морфология, физико-химические свойства и особенности почвенного органического вещества / В.В.,

- Старцев, А.А. Дымов, А.С.Прокушкин // Почвоведение. — 2017. — № 8. — С. 912–925.
61. Шарков, И.Н. Разложение меченной ^{14}C пшеничной соломы в субстратах различного гранулометрического состава / И.Н. Шарков, С.Л. Букреева // Почвоведение. - 2004. - №4. - С. 485-488.
 62. Щапова, Л.Н. Микробная сукцессия при трансформации органического вещества / Л.Н. Щапова // Почвоведение. - 2004. - №8. -С. 967-975
 63. Якушев, А.В. Зависимость активности полифенолпероксидаз и полифенолоксидаз в современных и погребенных почвах от температуры / А. В. Якушев, И.Н. Кузнецова, Е.В. Благодатская, С.А. Благодатский // Почвоведение. - 2014. - № 5. - С. 590–596.
 64. Anderson, J. P. E. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils / J. P. E. Anderson, K. H. Domsch // Soil Biology and Biochemistry. - 1978. - V. 10. - № 3. - P. 215-221.
 65. Andrews, J.A. Separation of root respiration from total soil respiration using carbon-13 labeling during free-air carbon dioxide enrichment (FACE) / J.A. Andrews, K. Harrison, R. Matamala, W. H. Schlesinger // Soil Science Society of America Journal. - 1999. -V. 63. - P. 1429–1435.
 66. Asmar, F. Effect of extracellular-enzyme activities on solubilization rate of soil organic nitrogen / F. Asmar, F. Eiland, N.E. Nielsen // Biology and Fertility of Soils.- 1994. - V. 17. - P.32–38.
 67. Batjes, N. H. Total carbon and nitrogen in the soils of the world / N. H. Batjes // European Journal of Soil Science. - 1996 . -V. 47. - P. 151–163.
 68. Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A. : Impact of artificial rootexudates on the bacterial community structure in bulk soil andmaize rhizosphere./ E. Baudoin, E. Benizri, A. Guckert // Soil Biology and Biochemistry. – 2003. – V. 35. – P. 1183–1192.
 69. Bingemann, C.W. The effect of the addition of organic materials on the decomposition of an organic soil / C.W Bingemann, J.E. Varner, W.P.

- Martin // Soil Science Society of America Proceedings. - 1953. – V. 17. P. 34-38.
70. Billes, G. Effect of grass roots on soil–nitrogen net mineralization / G. Billes, P. Bottner, N. Gandaisriollet // *Revue D Ecologie Et De Biologie Du Sol.* - 1988. -V. 25 - P. 261–277.
 71. Blagodatsky, S.A. Estimating the active and total soil microbial biomass by kinetic respiration analysis / S.A., Blagodatsky, O. Heinemeyer, J Richter // *Biology and Fertility of Soils.* -2000. -V. 32. - № 1. - P. 73-81.
 72. Bell, J.M. Priming effect and C storage in semi-arid no-till spring crop rotations / J.M. Bell, J.L Smith , V.L. Bailey, and H. Bolton // *Biology and Fertility of Soils.* - 2003. - V.37. – P. 237-244.
 73. Bernoux, M. The use of stable carbon isotopes for estimating soil organic matter turnover rates / M. Bernoux, C.C. Cerri, C. Neill, J.F.L. de Moraes // *Geoderma.*- 1998.- V.-82.- P. 43-58
 74. Blagodatskaya, E. Contrasting effects of glucose, living roots and maize straw on microbial growth kinetics and substrate availability in soil / E. Blagodatskaya, S. Blagodatsky, T.H. Anderson, Y. Kuzyakov // *European Journal of Soil Science.* - 2009. -V.- 60. P. 186-197.
 75. Blagodatskaya , E.V. Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies / E.V. Blagodatskaya , S.A. Blagodatsky , T.H., Anderson, Y.Kuzyakov // 2007.- *Applied Soil Ecology* - V. 37. - P. 95-105.
 76. Blagodatskaya, E.V. Elevated atmospheric CO₂ increases microbial growth rates in soil: results of three CO₂ enrichment experiments / E.V. Blagodatskaya, S.A. Blagodatsky, M. Dorodnikov, Y. Kuzyakov // *Global Change Biology.* - 2009. - V. 16. -№ 2. - P. 836-848.
 77. Blagodatskaya, E.V. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review / E.V. Blagodatskaya, Y. Kuzyakov // *Biology and Fertility of Soils.* - 2008. - V. 45. - P. 115-131.

78. Blagodatsky, S.A. Microbial growth in soil and nitrogen turnover: a theoretical model considering the activity state of microorganisms. / S.A. Blagodatsky, O. Richter // *Soil Biology and Biochemistry*. - 1998.- V.30 - . P. 1743-1755.
79. Blagodatsky, S.A. Extractability of microbial N as influenced by C:N ratio in the flush after drying or fumigation / S.A. Blagodatsky, , I.V. Yevdokimov // *Biology and Fertility of Soils* -1998. – V. 28.-P 5-11.
80. Blagodatsky, S.A. Microbial growth in soil and nitrogen turnover: model calibration with laboratory data / S.A. Blagodatsky, I.V. Yevdokimov, A.A. Larionova, O. Richter // *Soil Biology and Biochemistry*.- 1998. – V.30-. P.1757-1764.
81. Broadbent, F.E. Nitrogen release and carbon loss from soil organic matter during decomposition of added plant residues / F.E. Broadbent, *Soil Science Society of America Proceedings*. - 1947.- V. 12, .- P. 246-249.
82. Broadbent, F.E., 1956. Tracer investigations of plant residue decomposition in soil. Conference of Radioactive Isotopes in Agriculture. In: *Proceedings of the Conference on Radioactive Isotopes in Agriculture*, 12-14 January 1956. US Atomic Energy Commission, Washington, pp. 371-380.
83. Broadbent, F .E. Some factors affecting the availability of the organic nitrogen in soil./ F .E. Broadbent, A.G. Norman // *Soil Science Society of America Proceedings*. -1946.- V. 11.- P. 264-267.
84. Broadbent, F.E. The effect of quantity of plant material added to soil on its rate of decomposition / F.E. Broadbent, W.V. Bartholomew // *Soil Science Society of America Proceedings*. - 1948. – V. 13.- P. 271-274.
85. Cabrera, M.L. Modeling the flush of nitrogen mineralization caused by drying and rewetting soils / M.L Cabrera // *Soil Science Society of America Journal*. - 1993. - V.57. –P. 63-66.
86. Carreiro, M.M. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition / M.M. Carreiro, R.L. Sinsabaugh, D.A. Repert, D.F. Parkhurst // *Ecology*. - 2000. V. 81.- P.2359–2365.

87. Cheng, W. Measurement of rhizosphere respiration and organic matter decomposition using natural ^{13}C . / W. Cheng // Plant and Soil 1996. – V.183. – P. 263-268.
88. Cheng, W. Rhizosphere effects on decomposition: controls of plant species, phenology, and fertilization / W. Cheng, D.W. Johnson, S. Fu // Soil Science Society of America Journal. - 2003. - V. 67. - P. 1418–1427.
89. Cheng, W. Rhizosphere feedbacks in elevated CO_2 / W. Cheng // Tree Physiology.- 1999. – V.19.- P.313-320.
90. Cheng, W., Coleman, D.C., Effect of living roots on soil organic matter decomposition. / W. Cheng, D.C. Coleman // Soil Biology and Biochemistry.- 1990. – V.22. – P. 781-787.
91. Clarholm, M. Possible role for roots, bacteria, protozoa and fungi in supplying nitrogen to plants. In: Fitter, A.H. (Ed.), Ecological Interactions in Soil. Blackwell, Oxford, 1985a., pp. 355-365.
92. Clarholm, M. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen / M. Clarholm // Soil Biology and Biochemistry. - 1985b. – V.17. –P. 181-187.
93. Clarholm, M. Effects of plant-bacterial-amoebal interactions on plant uptake of nitrogen under field conditions / M. Clarholm. Biology and Fertility of Soils. - 1989. – V.8. – P. 373-378.
94. Conde, E. The impacts of inorganic nitrogen application on mineralization of C-14-labelled maize and glucose, and on priming effect in saline alkaline soil. / E. Conde, M. Cardenas, A. Ponce-Mendoza, M.L. Luna-Guido, C. Cruz-Mondragon, L. Dendooven // Soil Biology and Biochemistry. – 2005. –V. 37. – P.681–691.
95. Dalenberg, J.W. Priming effect of small glucose additions to ^{14}C -labeled soil. / J.W. Dalenberg, G. Jager // Soil Biology and Biochemistry. - 1981. – V. 13. –P. 219-223.

96. Dalenberg, J.W. Priming effect of some organic additions to ^{14}C -labeled soil. / J.W. Dalenberg, G. Jager // Soil Biology and Biochemistry. – 1989. – V.21. – P. 443-448.
97. Degens, B. Changes in aggregation do not correspond with changes in labile organic C fractions in soil amended with C-14-glucose / B. Degens, G.Sparling // Soil Biology and Biochemistry. – 1996. – V. 28. – P. 153-162.
98. Deng, S.P. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils.1. Amidohydrolases / S.P. Deng , M.A. Tabatabai // Biology and Fertility of Soils. - 1996. - V. 22. - P.202–207.
99. Denobili, M., Fate of nitrogen (N-15) from oxamide and urea applied to turf grass- a lysimeter study / M. Denobili, S. Santi, C. Mondini // Fertilizer Research. - 1992. – V.33. P.71-79.
100. De Nobili, M. Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate / M. De Nobili, M. Contin, C. Mondini, P.C. Brookes // Soil Biology and Biochemistry. - 2001. - V. 33. - №9. - P. 1163-1170.
101. Dymov, A. A. Composition and hydrophobic properties of organic matter in the densimetric fractions of soils from the subpolar urals / A. A. Dymov, E. Y. Milanovskii, V. A Kholodov. // Eurasian Soil Science. — 2015. — Vol. 48. - №. 11. — P. 1212–1221.
102. Jansson, S.L.Tracer studies on nitrogen transformations in soil with special attention to mineralization immobilization relationship/ S .L. Jansson // Annals of the Royal Agricultural College of Sweden. – 1958. – V. 24. – P. 101-361.
103. Jenkinson, D.S., The priming action. In: The Use of Isotopes in Soil Organic Matter Studies. / D. S. Jenkinson // Report of Food and Agriculture Organisation and International Atomic Energy Agency, Technical Meeting: Braunschweig-Volkenrode. - 1966. - P. 199-207.
104. Jenkinson, D.S. The turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted classical experiments / D.S. Jenkinson and J.H. Rayner // Soil Science,. - 1977. – V. 123. - P. 298-305.

105. Jenkinson, D.S. Interactions between fertilizer nitrogen and soil nitrogen — the so-called 'priming' effect / D.S Jenkinson, R.H. Fox, J.H. Rayner // *Journal of Soil Science*. – 1985. – V. 36. – P. 425-444.
106. Jones, D.L. Organic acids in the rhizosphere — a critical review / D.L. Jones // *Plant and Soil*. – 1998. – V. 205. – P. 25-44.
107. Johnson, D.W. Biotic and abiotic nitrogen retention in a variety of forest soils / D.W. Johnson , W. Cheng, I.C., Burke// *Soil Science Society of America Journal*. 2000.- V.64.- P.1503-1514.
108. Jones, W. J. Correlations between pesticide transformation rate and microbial respiration activity in soil of different ecosystems / W. J. Jones, N. D. Ananyeva // *Biology and Fertility of Soils*. - 2001. - V. 33. - P. 477-483.
109. Falchini, L. CO₂ evolution and denaturing gradient gel electrophoresis profiles of bacterial communities in soil following addition of low molecular weight substrates to simulate root exudation./ L. Falchini, N. Naumova, P. J. Kuikman, J. Bloem, P. Nannipieri // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2003. – V.35. -P. 775–782.
110. Fernandez, I. Carbon mineralization dynamics in soils after wildfires in two Galician forests / I. Fernandez, A. Cabaniero, T. Carballas // *Soil Biology and Biochemistry*. -1999. -V. 31. - P. 1853-1865.
111. Fiore, M. F. Mineralization of labelled ¹⁵N-Azolla in a cropped and uncropped soil. / M. F Fiore, P. M Silva, R. M. Ferreira, R. L. Victoria, S. M. Tsai // *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. - 1990. – P. 14. – P. 305-311.
112. Fokin, A. D. Availability of phosphates in soils as a function of the state and transformation of organic matter. / A. D. Fokin, P. A. Radzhabova // *Eurasian Soil Science*. - 1996. - V.29. – P. 1216-1221.
113. Fischer, H. Microbial uptake of low molecular weight organic substances outcompetes sorption by the whole range of concentrations in soil / H. Fischer, J. Ingwersen, Y. Kuzyakov // *European Journal of Soil Scie*. - 2010. - № 61. - P. 504-513.

114. Fontaine, S. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply / S. Fontaine, M. Barot, P. Barrac, N. Bdioui, M. Bruno, C. Rumpel // *Nature*. - 2007. - V. 450. - P. 277-280.
115. Fontaine, S. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? / S. Fontaine, A. Mariotti, L. Abbadie // *Soil Biology and Biochemistry*. - 2003. - № 35. - P.837–843.
116. Gioacchini, P. Influence of urease and nitrification inhibitors on N losses from soils fertilized with urea / P. Gioacchini, A. Natri, C. Marzadori, C. Giovannini, L.Vittori, A. C. Gessa // *Biology and Fertility of Soils*. - 2002. - V. 36. - P. 129-135.
117. Hamer, U. Priming effects in different soil types induced by fructose, alanine, oxalic acid and catechol additions./ U. Hamer, B. Marschner // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2005. – V. 37. – P.445–454.
118. Helal, H. M. Influence of plant root on C and P metabolism in soil./ H. M. Helal, D. Sauerbeck // *Plant and Soil*. - 1984. –V.76. – P. 175-182.
119. Helal, H. M. Effect of plant roots on carbon metabolism of soil microbial biomass / H. M. Helal, D. Sauerbeck // *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde*. - 1986. – V. 149.- P. 181-188.
120. Hilsher, A. Mineralisation and structural changes during the initial phase of microbial degradation of pyrogenic plant residues in soil / A. Hilsher, K. Heisher, C. Siewert, H. Knicker // *Organic Geochemistry*. - 2009 .- V. 40. - P. 332-342.
121. Kaal, J. Can pyrolysis-GC/MS be used to estimate the degree of thermal alternation of black carbon? / J. Kaal, C. Rumpel // *Organic Geochemistry*. - . 2009. - V. 36. -P. 1021–1030.
122. Kniker, H. Vegetation fires and burnings, how does char input affect the nature and stability of soil organic nitrogen and carbon? Review./ H. Kniker // *Biogeochemistry*. - 2007. - V. 85. - P. 91-118.
123. Kniker, H. Fire-induced transformation of C- and N-forms in different organic soil fractions from a Dystric Cambisol under a Mediterranean pine

- forest / H. Kniker, F.J.Gonzales-Vila, F. Martin, H.-D. Lüdemann // *Soil Biology and Biochemistry*. - 2005. - V. 37. - P. 701-718.
124. Kögel-Knabner, I. Biodegradation and humification processes in forest soil / I. Kögel-Knabner// *Soil Biology and Biochemistry*. – 1993. – V. 8. – P. 101–135.
 125. Kovda, I.V. Carbon isotope composition in landscape components and its changes under different ecological conditions / I.V. Kovda, E.G. Morgun, K.B.Gongalskii, S.A. Balandin, A.I. Erokhina // *Biology Bulletin*. — 2016. — Vol. 43. - № 2. — P. 177–184.
 126. Kramer, C. Soil organic matter in soil depth profiles: Distinct carbon preferences of microbial groups during carbon transformation / C. Kramer, G. Gleixner // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2008. – №40. – P. 425–433.
 127. Kramer, C. Variable use of plant- and soil-derived carbon by microorganisms in agricultural soils / C. Kramer, G. Gleixner // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2006.- V. 38. – P. 3267–3278.
 128. Kuzyakov, Y. Review of mechanisms and quantification of priming effects / Y. Kuzyakov, J. K. Friedel, K. Stahr // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2000. – V. 32. – P. 1485–1498.
 129. Kuzyakov, Y. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter / Y. Kuzyakov // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2010. – V. 42. – P. 1363–1371.
 130. Kuzyakov, Y. Review of mechanisms and quantification of priming effects./ Y. Kuzyakov, J.K. Friedel, K. Stahr // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2000. – V 45. – P.115–131.
 131. Rusakov, A. Paleoenvironmental reconstruction based on soils buried under Scythian fortification in the southern forest-steppe area of the East European Plain / A. Rusakov, A. Makeev, O. Khokhlova, P. Kust, M. Lebedeva, T.Chernov, A.Golyeva, A. Popov, F. Kurbanova, T.Puzanova // *Quaternary International*. - 2019. – V.502. – P. 197–217

132. Shirshova, L. Fluorescence spectroscopy studies of humic substance fractions isolated from permanently frozen sediments of Yakutian coastal lowlands / L. Shirshova, A. Kholodov, B. Zolotareva, L. Fominykh, A. Yermolayev // *Geoderma*. – 2009. – V.149. – P. 116–123.
133. Kudryarov, V.N., Blagodatsky S.A., Kuznetsova T.V., Larionova A.A. Carbon compensation of "extra-nitrogen" appeared after nitrogen fertilization. In. *Poda aprodukcia agroekosystemov. Sbornic 1.Vol. 10*. Bratislava: DK OH 22-25, 1990:140-8.
134. Kuzyakov, Y. Root and rhizomicrobial respiration: a review of approaches to estimate respiration by autotrophic and heterotrophic organisms in soil. / Y. Kuzyakov, A. A. Larionova // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. – 2005. – V. 168. – P. 503–520.
135. Kuzyakov, Y. Comments on the paper by Kemmitt et al. 'Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass – a new perspective [Soil Biology and Biochemistry 40, 61–73]: the biology of the regulatory gate./ Y. Kuzyakov, E. Blagodatskaya, S. Blagodatsky // *Soil Biology and Biochemistry*. 2008
136. Kuzyakov, Y. Sources and mechanisms of priming effect induced in two grassland soil amended with slurry and sugar / Y. Kuzyakov, R. Bol // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2006. – V. 32. P. 747–758.
137. Lal R. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. / R.Lal // *Geoderma*. – 2004. – V.123.– P.1-22.
138. Larionova, A. A. Does the nitrogen fertilisation increase humus mineralization? / A. A. Larionova, S. A. Blagodatsky // In: "Humic substances in the global environment and implications in human health". Proceedings of 6-th International Meeting of IHSS, N. Senesi and T. Miano(Eds). Amsterdam. Elsevier. – 1993. – P. 975–981.
139. Larsson, C. Growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in chemostatcultures under carbon-limiting, nitrogen-limiting, or carbonlimiting

- and nitrogen-limiting conditions / C. Larsson, U. Vonstockar, I. Marison, L. Gustafsson // *Journal of Bacteriology*. – 1993. - V. 175. - P. 4809–4816.
140. Lavelle, P. Priming effect of macroorganisms on microflora: a key process of soil function? Beyond the Biomass / P. Lavelle, C. Gilot // *Compositional and Functional Analysis of Soil Microbial Communities*. Wiley, Chichester. – 1994. – V. – P. 173-180.
 141. Lavelle, P. Mutualism and biodiversity in soils / P. Lavelle, D. Lattaud, D. Trogo, I. Barois // *Plant and Soil*. – 1995. – V. 170. P. 23–33.
 142. Lefroy, R.D.B. Release of sulfur from rice residues under flooded and non-flooded soil conditions/ R.D.B. Lefroy, W. Chaitey, G.J. Blair// *Australian Journal of Agricultural Research*.- 1994. – V. 45. – P. 657-667.
 143. Liu, Y. Bioenergetic interpretation on the S₀/X₀ ratio in substrate-sufficient batch culture / Y Liu // *Water Resources*. – 1996. – V. 30. – P. 2766– 2770.
 144. Liu, Y. Energy uncoupling in microbial growth under substrate-sufficient conditions / Y. Liu // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1998. – V. 49. – P. 500–505.
 145. Lucas S.D. Biodegradation of estrone and 17 β -estradiol in grassland soils amended with animal wastes / S.D. Lucas, D.L. Jones // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2006. – V. 38. – P. 2803–2815.
 146. Lutzow, M. SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms / M. Lutzow, I. Kogel-Knabner, K. Ekschmitt, H. Flessa, G. Guggenberger, E. Matzner, B. Marschner // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2007. – V. 39. – P. 2183-2207.
 147. Marinari S. Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties./ S. Marinari, G. Masciandaro, B. Ceccanti, S. Grego // *Bioresource Technology*. – 2000. – V. 72. – P. 9–17
 148. Martin-Olmedo, P. The influence of plants grown under elevated CO₂ and N fertilization on soil nitrogen dynamics / P. Martin-Olmedo, R. M. Rees, J. Grace // *Global Change Biology*. -2002. –V. 8. – P. 643–657.

149. Marx, M-C. A microplate fluorometric assay for the study of enzyme diversity in soils / M-C. Marx, M. Wood, S.C. Jarvis // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2001. – V. 33. – P. 1633-1640.
150. Mondini, C. Soil microbial biomass activation by trace amounts of readily available substrate / C. Mondini, M.L. Cayuela, A. Roig, P.C. Brookes // *Biology and Fertility of Soils*. – 2006. – V. 42. – P. 542-549.
151. Nannipieri, P. Microbial diversity and soil functions / P. Nannipieri, J. Ascher, M.T. Ceccheriui, L. Landi, G. Pietramellara, G. Renella // *European Journal of Soil Science*. – 2003. – V. 54. – P. 655–670.
152. Nannipieri, P. Microbial diversity and soil functions / P. Nannipieri, J. Ascher, MT. Ceccherini, L. Loretta, P. Giacomo, R. Giancarlo // *European Journal of Soil Science*. – 2003.– V. 54: – P. 655–670.
153. Nottingham, A. T. Tanner Soil priming by sugar and leaf-litter substrates: A link to microbial groups / A. T. Nottingham, H. Griffiths, P. M. Chamberlain, A. W. Stott // *Applied Soil Ecology*. – 2009.– V. 42. – P. 183–190.
154. Nicolardot, B. Mineralization in soil of microbial material labelled with carbon 14 and nitrogen 15: quantification of the microbial biomass of nitrogen / B. Nicolardot, G. Guiraud, R. Chaussod, G. Catroux // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1986. – V. 18. – P. 263–273.
155. Niklaus, P.A. Estimating soil carbon sequestration under elevated CO₂ by combining carbon isotope labelling with soil carbon cycle modelling / P.A. Niklaus, P. Falloon // *Global Change Biology*. – 2006. – V. 12. – P. 1909–1921
156. O'Donnell, A.G. Sulfate S amendements in soil and their effects on the transformation of soil sulfur / A.G. O'Donnell, J. Wu, J.K. Syers // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1994. – V. 26. – P. 1507-1514.
157. Panikov, N.S. Determination of microbial mineralization activity in soil by modified right and Hobby method / N.S. Panikov, S.A. Blagodatsky, J.V. Blagodatskaya, M.V Glagolev // *Biology and Fertility of Soils*. – 1992. – V. 14. – P. 280–287.

158. Panikov, N.S. A kinetic method for estimating the biomass of microbial functional groups in soil / N.S. Panikov, M.V. Sizova // *Journal of Microbiological Methods*. – 1996. – V. 24. – P. 219-230.
159. Paterson, E. Through the needle^ a review of isotope approaches to quantify microbial processes mediating soil carbon balance / E. Paterson, A. J. Midwood, P. Millard // *New Phytologist*. – 2009. – V. 184. – P. 19-33.
160. Pritch, K. A rapid and highly sensitive method for measuring enzymes activities using 4-methylumbelliferone-fluorogenic substrates in a microplate system / K. Pritch, S. Raidl, E. Marksteiner, H. Blaschke, R. Agerer, M. Schlöter, A. Hartmann // *Journal of Microbiological Methods*. – 2004. – V. 58. – P. 233-241.
161. Rumpel, C. Composition and reactivity of morphologically distinct charred materials left after slash and burn practices in agricultural tropical soils / C. Rumpel, J.A. Gonzales-Perez, J. Bardoux, C. Largeau, F.J. Gonzales-Vila, C. Valentin // *Organic Geochemistry*. – 2007. – V. 38. – P. 911-920.
162. Salomé, C. Carbon dynamics in topsoil and subsoil may be controlled by different regulatory mechanisms / C. Salomé, N. Nunan, V. Pjuteau, T. Z. Lerch, C. Chenu // *Global Change Biology*. – 2010. – V. 16. – P. 416-426.
163. Sallih, Z. Effect of wheat (*Triticum aestivum*) roots on mineralization rates of soil organic matter / Z. Sallih, P. Bottner // *Biology and Fertility of Soils*. – 1988. – V. 7. – P. 67-70.
164. Santruckova, H. Shortterm partitioning of C-14-[U]-glucose in the soil microbial pool under varied aeration status / H. Santruckova, T. Pícek, R. Tykva, M. Šimek, B. Pavlu // *Biology and Fertility of Soil*. – 2004. – V. 40. – P. 386–392.
165. Schimel, J.P. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model / J.P. Schimel, M.N. Weintraub // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2003. – V. 35. – P. 549-563.

166. Shen, J. Priming effect of glucose polymers in soil-based biodegradation tests / J. Shen, R. Bartha // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1997. – V. 29. – P. 1195-1198.
167. Shen, S.M. Mineralization and immobilization of nitrogen in fumigated soil and the measurement of microbial biomass nitrogen / S.M. Shen, G. Pruden, D.S. Jenkinson // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1984. – V. 16. – P. 437-444.
168. Shen, J. The priming effect of substrate addition in soil-based biodegradation tests / J. Shen, R. Bartha // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – V. 62. – P. 1428-1430.
169. Schimel, J. P. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model / J. P. Schimel, M. N. Weintraub // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2003. – V. 35. – P. 549-563.
170. Sowerby, A. Microbial community changes in heathland soil communities along a geographical gradient: interaction with climate change manipulations / A. Sowerby, B. Emmett, C. Beier, A. Tietema, J. Penuelas // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2005. – V. 37. – P. 1805–1813.
171. Schlesinger, W.H. An overview of the carbon cycle In soils and Global change CRC press,. Boca raton,. – 1995. –P. 9-27.
172. Six1, J. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils / J. Six1, R. T. Conant, E. A. Paul & K. Paustian // *Plant and Soil*. – 2002. – V. 241. – P. 155–176.
173. Sparling, G. S. Effect of barley plants on the decomposition of ¹⁴C-labelled soil organic matter / G. S. Sparling, M. V. Cheshire, C. M. Mundie // *Journal of Soil Science*. –1982. – V. 33. – P. 89-100.
174. Schneckenberger, K. Microbial utilization and mineralization of [14C]glucose added in six orders of concentration to soil / K. Schneckenberger, D. Demin, K. Stahr, Y. Kuzyakov // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2008. – V. 40. – P. 1981–1988.

175. Smith, J. L. The initial rate of substrate utilization and longer term soil C storage / J. L. Smith , J. M. Bell, H. Bolton, V. L. Bailey // *Biology and Fertility of Soils*. –2007. – V. 44. – P. 315-320.
176. Vanlauwe, B. Residue fractionation and decomposition: the significance of the active fraction / B. Vanlauwe, L. Dendooven and, R. Merckx // *Plant and Soil*. –1994. – V. 158. – P. 263- 274.
177. Waldrop, M. P., Firestone M. K. Microbial community utilization of recalcitrant and simple carbon compounds: impact of oak-woodland plant communities / M. P. Waldrop, M. K. Firestone // *Oecologia*. –2004. – V. 138. – P. 275–284.
178. Zagal, E. Influence of light intensity on the distribution of carbon and consequent effects on mineralization of soil nitrogen in a barley (*Hordeum vulgare* L.) — soil system / E. Zagal // *Plant and Soil*. –1994. – V. 160. – P. 21-31.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Фотография 1 Приложение 1.

Современная и погребенная подзолистая почва

О (0-4 см) - органогенный горизонт
фоновой почвы;

А1А2 – подзолистый горизонт (не
исследован в работе)

В (45- 80 см)- минеральный
иллювиальный горизонт.



О к.с. (0-2 см)- горизонт культурного слоя,

[O] (23-30 см)- погребенный органогенный горизонт,

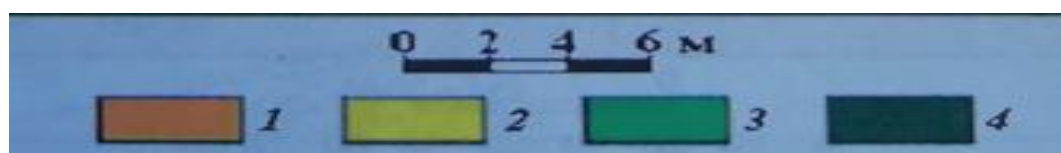
[A1A2] (30-55 см)- погребенный подзолистый горизонт (не исследован в работе),

[B] (55-70 см)- погребенный минеральный горизонт.

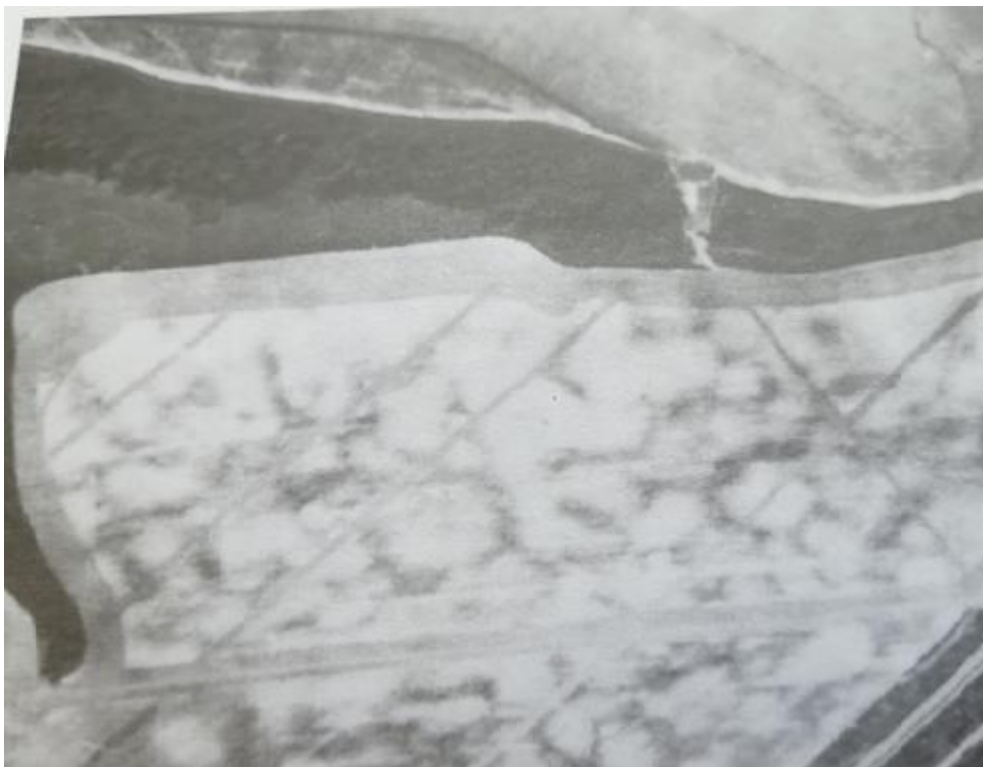
Таблица 1 Приложение 1. Некоторые химические характеристики современных и погребенных подзолистых почв*

Горизонт (см)	Органическое вещество, %	pH	Mn (подвижная форма), мг/кг	Fe (общее) мг/кг	Гигровлага %
О (0-4)	7,29	4,74	<20	38,84	1,6
A1A2 (4-45)	<0,5	6,45	<20	<30	<1
B _{Fe} (45-80)	<0,5	5,65	<20	227,59	<1
С (80-102)	<0,5	5,8	<20	48,15	<1
О (0-2) к.с.	9,46	4,63	<20	35,59	1.4
Выкид (2-23)	<0,5	5,62	<20	100,82	<1
[O] (23-30)	3,1	5,17	<20	121,29	<1
[A2] (30-55)	<0,5	5,99	<20	<30	<1
[B _{Fe}]	<0,5	7,45	<20	67,72	<1
С (70-100)	<0,5	6,19	<20	<30	<1

Примечание. Результаты химического анализа почв предоставлены с.н.с. Института криосферы Земли СО РАН, к.г.н. Якимовым А.С.



Фотография 1 Приложение 2. Карта элементов палеокриогенного полигонально-блочного микрорельефа ключевого участка «Пушино», Московская область (Алифанов и др., 2010).



Аэрофотоснимок. Полигональный микрорельеф на современной поверхности под серыми лесными почвами (южное Подмосковье) (Алифанов и др., 2010).

Блок

Межблочье



Фотография 2 Приложение 2. Объекты исследования современная и погребенная серая лесная почва*

Примечание. Фотографии любезно предоставлены зав.лаб. Экологии почв, д.б.н., проф. Алифановым В.М.

Таблица 2 Приложение 2. Некоторые химические характеристики современных и погребенных серых лесных почв*

Горизонт (см)	С общ.	Гумус, %	pH вод.	pH сол.	Гигровлага %
A1 (1-7) блок	2,83	4,87	5,5	5,1	2,79
A1 (7-13)	2,52	4,35	5,3	5,0	2,62
A1A2BAha (14-23)	1,33	2,29	4,8	4,0	2,27
A1A2BAha (24-31)	1,70	2,94	5,0	4,1	3,24
A1A2BAha (33-43)	1,78	3,06	5,1	4,2	3,88
A1A2BAha (46-56)	2,07	3,57	5,1	4,3	4,99
B2 (67-72)	0,21	0,54	5,4	4,1	5,05
B2 (75-85)	0,32	0,36	5,5	4,1	5,06
B3 (90-100)	0,21	0,36	5,3	4,0	4,89
B3 (105-115)	0,32	0,54	5,4	4,1	5,02
B4t (125-135)	0,18	0,31	5,5	4,1	5,11
B4t (140-150)	0,15	0,25	5,5	4,2	5,38
B5 (160-170)	0,21	0,36	5,6	4,3	5,81
B5 (175-185)	0,21	0,36	5,7	4,3	5,65
B5 (190-200)	0,31	0,53	5,8	4,4	5,84
[A] (215-225)	0,31	0,53	5,9	4,4	5,86

[A] (230-240)	0,18	0,31	5,8	4,4	5,22
---------------	------	------	-----	-----	------

* Результаты химического анализа предоставлены любезно зав.лаб. Экологии почв, д.б.н., проф. Алифановым В.М.

Горизонт (см)	С общ.	Гумус, %	pH вод.	pH сол.	Гигровлага %
A1 (1-8) межблочье	3,65	6,29	5.9	5.0	3.7
A1A2 (10-17)	2,05	3,54	5.5	4.3	2.72
Aha (22-32)	1,37	2,37	5.6	4.2	3.26
B2(Aha) (37-47)	0,64	1,10	5.7	4.0	4.63
B3 (55-65)	0,46	0,79	6.0	4.1	4.56
B4t (85-95)	0,31	0,50	6.2	4.2	4.07
B4t (102-112)	0,31	0,54	6.2	4.2	4.07
B4t (115-125)	0,31	0,54	6.1	4.3	3.82
[A1]D1 (138-148)	0,35	0.60	6.3	4.2	4.96
[A1]D1 (149-159)	0,35	0.60	6.2	4.2	5.19
[A1]D1 (165-175)	0,29	0.49	6.3	4.2	5.71
[B2]D (205-215)	0,23	0.39	6.0	4.3	3.94
[B2]D (230-240)	0,17	0.29	5.7	4.2	4.14

Фотография Приложение 3.

Вид лугового и лесного ценозов до и после низового пожара.



Таблица 3 Характеристики растительных остатков, вносимых в почву

Луг	C,%	N,%
Растительные остатки	54	0,63
Пепел	30	1,31
Лес	C,%	N,%
Растительные остатки	48	1,15
Пепел	47	1,14

Рис. 1 Приложения 4 Химическая структура ГК а)- современного органогенного горизонта подзолистей почвы и его погребенного аналога- б).

