

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПРОЦЕССОВ НАЧАЛЬНОГО ЭТАПА МИКРОБНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ДРЕВЕСНОГО ОПАДА В ЛЕСНОЙ ПОЧВЕ

© 2018 г. **Е.В. Менько, Е.Н. Тихонова, Р.В. Уланова, М.В. Сухачева*,
Т.В. Кузнецова**, С.Н. Удальцов**, И.К. Кравченко**

*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2*

**Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2*

***Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2*

E-mail: irinakravchenko@inbox.ru

Поступила в редакцию 15.06.18 г.

Органическое вещество почв лесных экосистем характеризуется высокой чувствительностью к повышению температуры, что делает его наиболее уязвимым в условиях глобального потепления. В работе оценено влияние различных по составу компонентов древесного опада (листья и мелкие ветки осины) на динамику активности и количественных характеристик микробных сообществ почв в условиях, моделирующих потепление климата. Эксперимент выполнен с образцами серой лесной почвы характерного для Европейской части России лесного биоценоза Московской области. Инкубацию почвенных образцов, в которые вносили измельченные листья и ветки из расчета 0,5% по весу, проводили при постоянных температурах (5, 15 и 25°C) в течение 28 сут. Оценивали в динамике выделение CO₂, содержание органического углерода, микробной биомассы и количества рибосомальных генов бактерий, архей и микромицетов. Установлено, что оптимальной для разложения растительного опада была температура 15°C, а ее снижение и повышение приводило к снижению интенсивности процесса деградации опада. В диапазоне температур 5–15°C внесение растительных остатков приводило к значительному увеличению температурной чувствительности процесса почвенного дыхания, и величина температурного коэффициента возрастала от 1,75 до 3,44–3,54. В диапазоне температур 15–25°C наблюдалась обратная зависимость. При высоком значении температуры внесение растительных остатков стимулировало разложение органического вещества почвы. Полученные результаты вносят вклад в понимание динамики почвенного углерода и могут быть использованы в прогностических моделях процессов разложения растительного опада и динамики почвенного органического вещества в лесных биоценозах Евразии в условиях климатических изменений.

Ключевые слова: температурная чувствительность, древесный опад, микроорганизмы, глобальное изменение климата, бактерии, микромицеты.

DOI: 10.1134/S0006302918050150

Древесный опад представляет собой совокупность органического вещества, содержащегося в ежегодно отмирающих частях растений, и его биогеоценотическое значение очень велико. От количества поступающего органического вещества опада, его химического состава, скорости минерализации и гумификации зависят потенциальная продуктивность биоценозов

и характер современного почвообразования. Несмотря на достаточно высокую степень изученности первичной продуктивности зональных лесных сообществ, вопросы трансформации надземной части древесной растительности исследованы недостаточно и требуют детального анализа. В частности, в литературе имеется мало сведений об исследовании процессов микробиологического разложения древесного опада в лесных экосистемах на ранних стадиях разложения в условиях высокой обеспеченности растительным материалом и современного из-

Сокращения: ОВ – органическое вещество, ПЦР – полимеразная цепная реакция, С-CO₂ – содержание диоксида углерода, выраженное в пересчете на углерод.

менения климата. По обобщенным данным, представленным в работе [1], в лесных экосистемах различных природных зон России общий опад оценивается: в хвойно-таежной зоне в 35–55 ц/га, а в лиственных – 65–90 ц/га, при этом величина листового опада в северной подзоне лиственных лесов составляет 8–15 ц/га.

Химический состав древесного опада весьма разнообразен. Он состоит из углеводов (целлюлозы, гемицеллюлозы, пектиновых веществ), лигнина, липидов и липопротеидов, дубильных веществ, смол, восков, а также из многих других органических соединений (органических кислот, сахаров, алкалоидов, витаминов, ферментов и др.) [2]. Наиболее значительную часть растений составляют целлюлоза (15–60% сухого веса), гемицеллюлоза (10–30%), лигнин (5–30%). Водорастворимая фракция, в которую входят сахара, аминокислоты и алифатические кислоты, составляет 5–30%. Фракция эфирно- и спирторастворимых соединений – жиры, масла, воски, смолы, многочисленные пигменты – составляет 0,5–3%. Распад древесного опада представляет собой комплекс механических, биохимических и химических процессов трансформации органических компонентов, в ходе которых сложноорганизованные молекулы превращаются в более простые, вплоть до полной минерализации. При поступлении в почву древесный опад подвергается процессам микробной трансформации. Почва представляет собой множество гетерогенных сред обитания микроорганизмов и одновременно существующих микрорзон, которые различаются содержанием органических субстратов, минеральных веществ, влаги и т.д. [3], что обеспечивает протекание взаимосвязанных процессов распада и синтеза органических веществ.

В почвах лесных экосистем скорость разложения опада определяется рядом биофизических, химических, и биологических факторов, среди которых необходимо отметить влажность, температуру, pH, наличие доступного азота и кислорода, состав почвенной микробиоты. Влажность почвы является одним из основных факторов, определяющих активность почвенных микробных сообществ и соответственно регулирующих процессы и скорости деструкции. Установлено, что недостаточный (ниже 30%) или избыточный (выше 150%) уровень влажности существенно тормозит скорость разложения целлюлозы [4]. В интервалах от 30 до 150% увеличение влажности оказывает положительное воздействие на микробные сообщества и интенсивность разложения растительных остатков [5].

Другим важным биофизическим фактором, влияющим на деструктивную деятельность почвенных организмов, является температура. Большинство исследователей считают температуру главным абиогенным фактором разложения органического вещества. Воздействие температуры обусловлено прежде всего ее влиянием на рост и активность почвенных организмов, а также на насыщенность почвы кислородом и растворимыми питательными компонентами. В литературе приводятся данные о том, что оптимальной температурой для разложения целлюлозы в почве является 35–37°C, хотя разложение может происходить и при более низких температурах (0–5°C) [6]. Микроорганизмы не имеют механизмов регуляции температуры клетки, поэтому их жизнедеятельность напрямую зависит от температуры окружающей среды [2]. Некоторые авторы считают [7], что температура влияет на интенсивность и скорость минерализации растительных остатков в шесть раз сильнее, чем влажность. Как низкие, так и высокие значения температуры замедляют темпы разложения растительного опада [8,9].

Процесс разложения растительных остатков может быть разделен на фазы, в каждой из которых образуются специфичные продукты, дающие возможность развиваться определенным группам микроорганизмов. На начальных стадиях разложения доминирует высвобождение (в основном за счет вымывания) кальция, калия и магния, в то время как для азота, фосфора и серы может наблюдаться временное увеличение их содержания в растительных остатках. Такое различие в динамике биофильных элементов объясняется микробной иммобилизацией. Элементы, лимитирующие микробный рост, прежде всего азот и фосфор, аккумулируются в опаде, а те элементы, которые только частично являются структурными компонентами, вымываются из него в первую очередь. Вследствие различий в содержании зольных элементов и органических компонентов опад разных растений минерализуется с различной скоростью. Промежуточные продукты распада являются питательным субстратом для разных популяций, поддерживающих разнообразие почвенной микробиоты и ее сукцессионные изменения в процессе разложения [10].

Взаимодействие различных представителей блока биодеструкторов в почвах является важным фактором, определяющим интенсивность разложения растительного опада [11]. Установлено, что через микробную биомассу проходит до 95% углерода, поступившего с растительными остатками [12]. Например, при исследовании интенсивности разложения опада липы и хвои

ели в лесной дерново-подзолистой почве было показано, что потери веса за год для липы составляют около 60%, а для хвой – 32–42% [6]. Скорость разложения богатого питательными элементами опада на начальной стадии выше, чем опада с невысоким содержанием биофильных элементов, но на поздних стадиях ситуация может меняться на противоположную.

Почвенные микроорганизмы (главным образом бактерии и мицелиальные грибы) отвечают за разложение органического вещества (ОВ), в ходе которого оно претерпевает структурные изменения или минерализуется до CO_2 ; эти процессы тесно связаны с его доступностью и качеством [13]. Согласно фундаментальным принципам ферментативной кинетики, температурная чувствительность микробного дыхания должна демонстрировать обратную зависимость от качества растительного материала. В инкубационных экспериментах было показано, что степень доступности субстратов (растительные остатки) в значительной степени влияла на температурную зависимость дыхания почвы: по мере снижения качества органического углерода в растительных остатках, гидролитическая активность была в большей степени чувствительна к изменениям температуры [14].

Изменения температуры влияют не только на активность, но и на состав микробных гидролитических сообществ [15]. Эффективное разложение лигнина в почвах осуществляется несколькими группами микромицетов [16]. Грамположительные бактерии адаптированы к почвам с низким содержанием доступных субстратов, в то время как грамотрицательные в большей степени зависят от поступления свежего органического вещества, образуя «горячие точки» разложения органического вещества в почве [17]. Установлено, что изменение температуры почвы [18], так же как и изменение состава ОВ при воздействии повышенных концентраций CO_2 или азотных соединений [19,20], вызывают структурные изменения в составе этих микробных групп. Таким образом, изучение температурных контролей грибных и бактериальных сообществ, участвующих в процессе разложения ОВ, а также мониторинг микробных сукцессий в ходе глобальных изменений климата имеет большое экологическое значение.

Согласно современным климатическим моделям, XXI век будет характеризоваться глобальным повышением температуры воздуха [21, 22]. Для регионов средних и высоких широт, а также полярных регионов прогнозируется повышение температуры на 3–5°C [23]. Повышение температуры может увеличить поступление

в почву органических остатков, но одновременно возрастет скорость его микробного разложения. В литературе имеются сведения о том, что при повышении температуры потери углерода из почвы возрастают в большей степени, т.е. чувствительность гидролитических процессов к температуре гораздо выше, чем фотосинтеза [24]. Пока нет полной ясности об отдаленных последствиях влияния глобального потепления на почвенное органическое вещество, в том числе – в какой мере изменения температуры отразятся на доступности микроорганизмам легкоразлагаемых и трудноразлагаемых компонентов свежего и трансформированного в почве органического вещества [25,26]. По одним оценкам, после непродолжительного всплеска минерализации, затрагивающей небольшой по размеру активный (лабильный) пул органического вещества, процесс в целом замедлится, по другим – принципиально не изменится, или, наоборот, возрастет, поскольку усилится минерализация большого по размерам стабильного пула вследствие его большей термочувствительности.

Эмиссия углерода из почвы в атмосферу происходит в большей степени в форме CO_2 в результате так называемого «почвенного дыхания». Процессы образования в почве и выделения CO_2 в значительной мере зависят от температуры и влажности внешней среды, типа растительности, доступности С-субстратов органотрофным микроорганизмам, продуктивности экосистемы в целом, динамики растительности и микробных сообществ, трофических взаимоотношений, антропогенной нагрузки и других факторов [27–29]. Среди всех вышеназванных факторов именно температура является ключевым регулятором микробных процессов [25,30]. Изменения температуры влияют не только на ферментативную активность, но и на состав микробных сообществ, доступность влаги и питательных субстратов из-за изменений скоростей диффузии [30]. Поэтому определение интенсивности продукции и эмиссии диоксида углерода дает представление о доступности углеродных субстратов для микроорганизмов-гидролитиков в данный момент времени [14].

Настоящее исследование посвящено изучению температурной чувствительности процесса разложения древесного опада, а также динамики активности, численности и состава осуществляющих его микробных сообществ серых лесных почв. Высказана гипотеза, что изменение температуры является основным драйвером микробной активности и дифференциации микробных сообществ на начальном этапе транс-

формации древесного опада. Для проверки этой гипотезы была проведена серия инкубационных экспериментов в контролируемых условиях с аэробными микрокосмами почвы смешанного леса Московской области и внесением фрагментов листьев и веток.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Образцы почвы для проведения инкубационных экспериментов были отобраны в июне 2017 г. с глубины 0–20 см во вторичном мелколиственном лесу в районе г. Пущино Московской области (54,8° N; 37,6° E). Растительность древесного яруса на данном участке была представлена кленом остролистным (*Acer platanoides*), березой (*Betula sp.*), осиной (*Populus tremola*) и ольхой (*Alnus*). Почва была охарактеризована как серая лесная суглинистая на покровных суглинках, подстилаемых мореной (*Gleyic Phaeozems*).

Инкубационные эксперименты с аэробными микрокосмами проводили в стеклянных флаконах объемом 100 мл, в которые помещали навеску, соответствующую 10 г воздушно-сухой почвы. Микрокосмы, заложенные в шестикратной повторности, инкубировали в течение 28 сут в термостатах при трех постоянных температурных режимах: 5°C (модель средней температуры за весенние и осенние месяцы в южном Подмосковье), 15°C (модель средней температуры в летний период) и 25°C (модель глобального повышения температуры).

Для выяснения агентов трансформации растительных остатков в почву были внесены измельченные до размера < 0,5 мм фрагменты опавших листьев и тонких веток осины (0,5% от веса почвы). Содержание общего органического углерода и общего азота в растительных материалах определяли на элементном анализаторе CHNS-932 (Leco, США). Содержание углерода в листьях составляло $42,853 \pm 0,580\%$, азота – $0,923 \pm 0,023\%$, соотношение C : N – 46,43, для веток эти значения составили соответственно $46,540 \pm 0,447\%$, $0,738 \pm 0,029\%$ и 63,06 [В.М. Семенов, неопубликованные данные].

В течение всего периода инкубации контролировали и поддерживали постоянную влажность образцов почв на уровне 25 вес. % (60% полной влагоемкости почвы). Половина микрокосмов каждого варианта была использована для количественного учета выделяющегося CO₂ на протяжении всего периода инкубации, а другая – для проведения химических и молекулярных анализов.

Биологическую активность почв оценивали по интенсивности выделения CO₂ методом газовой хроматографии. Измерения проводили на приборе «Кристалл-5000» (ЗАО СКБ Хроматэк) через 24–48 ч инкубации. Для пересчета содержания CO₂ в газовой фазе на величину выделения из образцов почв учитывали объем флакона и газовой пробы, массу почвы и время инкубации, при этом содержание диоксида углерода выражали в пересчете на углерод (C-CO₂).

Для оценки влияния температуры на дыхательную активность при внесении растительного опада был рассчитан коэффициент отклика микробного сообщества на внесение субстратов – $k_{л}$ и $k_{в}$ для листьев и веток соответственно. Для расчета использовали отношение величин интегрального накопления CO₂ в вариантах с внесением субстрата к величинам в контрольном варианте при различных температурах.

Динамику разложения внесенных субстратов оценивали по разнице между интегральным накоплением C-CO₂ в вариантах опыта с внесением растительного материала и контролем без внесения. Скорость разложения субстратов рассчитывали по формуле:

$$L_t = L_0 \times e^{-kt}, \quad (1)$$

где L_t – масса субстрата в момент времени t (мг С); L_0 – масса субстрата в нулевой точке (мг С); k – характеристика скорости разложения субстрата; t – время инкубации (сут).

Температурную чувствительность скорости разложения субстратов характеризовали с помощью температурного коэффициента (Q_{10}), который показывает как увеличивается интенсивность выделения CO₂ при повышении температуры инкубации на 10°C. Температурный коэффициент Q_{10} рассчитывали по формуле

$$Q_{10} = (K_2/K_1)^{10/(T_2 - T_1)}, \quad (2)$$

где K_2 – скорость разложения субстрата при верхнем значении температуры T_2 , K_1 – скорость разложения субстрата при нижнем значении температуры T_1 .

Для определения содержания органического вещества в почве использовали метод, предложенный в работе Schulte et al., 1991 [31]. Образцы почвы, отобранные в начале инкубации и через 28 сут, были высушены до постоянного веса сначала при 105°C, а затем при 360°C. Содержание органического вещества рассчитывали по формуле

$$OB (\%) = (W_{105} - W_{360}) / W_{105} \times 100, \quad (3)$$

где W_{105} и W_{360} – вес образцов почвы, высушенных при 105 и 360°C соответственно. Для пересчета содержания ОВ на содержание углерода использовали пересчетный коэффициент 0,58, который соответствует усредненному содержанию углерода в гуминовой кислоте, равному 58% [32].

Содержание углерода микробной биомассы в образцах почв было рассчитано исходя из количества ДНК с помощью пересчетных калибровочных коэффициентов. Выделение тотальных препаратов ДНК из свежих образцов микробиоты проводили с помощью коммерческих наборов реактивов Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, США) согласно рекомендациям производителей. Содержание ДНК в растворе было определено спектрофотометрически по поглощению в УФ-области (260 нм) с помощью прибора SmartSpec Plus (BioRad, США). Расчет содержания ДНК в почве проводили с учетом фактора разведения. Для пересчета содержания ДНК на величину углерода микробной биомассы, соответствующей определению этого показателя методом субстрат-индуцированного дыхания, использовали пересчетный коэффициент 5,1, полученный для серых лесных почв Московской области [33].

Определение количества бактерий, архей и микромицетов в образцах почвы проводили один раз в неделю методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. ПЦР проводили в буфере-Б («Синтол», Россия) в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I и пассивного референсного красителя ROX. Детекцию для каждого образца осуществляли в двукратной повторности. В качестве отрицательного контроля (реакционная смесь без ДНК-матрицы) использовали ddH₂O («Синтол», Россия). Амплификацию проводили с использованием системы ПЦР-обнаружения реального времени CFX96 Touch™ (Bio-Rad, США). Чтобы определить количество филотивов в природных образцах, сравнивали величину сигнала, полученного в образце, со стандартной кривой, построенной для серии последовательных разбавлений стандартного образца с известной концентрацией. В качестве стандартного образца использовали предварительно очищенный с помощью набора Wizard SV Geland PCR Clean-Up System (Promega, США) и клонированный в pGEM-T вектор (Promega, США) целевой ПЦР-фрагмент. В качестве стандартов использовали растворы клонированных фрагментов рибосомального оперона 16s ДНК для бактерий *Escherichia coli* и архей *Methanosarcina barkerii*, а также 18s ДНК для микро-

мицетов *Penicillium chrysogenum*. Количество копий консервативного участка ДНК на грамм почвы (копий/г почвы) рассчитывали с учетом исходной навески и манипуляций с препаратом ДНК, выделенным из почвы. Полученные данные (количество копий/г почвы) использовали для сравнения численности микроорганизмов в вариантах эксперимента. Несмотря на то что количество рибосомальных оперонов в геномах микроорганизмов варьирует в широких пределах, было установлено, что при пересчете по усредненным показателям значения численности являются приближенными к реальным показателям [34].

Статистическую обработку данных и графическое представление всех полученных результатов осуществляли с использованием программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Серая лесная почва, использованная в настоящем исследовании, является типичной для зоны смешанных лесов Южного Подмосковья. Реакция почвенной среды была слабокислой (рН водной суспензии 5,28). Содержание органического углерода, являющегося основным питательным субстратом для микробных сообществ, составляло 2,53%. Содержание минерального азота аммонийной и нитратной формы было примерно одинаковым и составляло в сумме 1,48 мг N/100 г почвы.

Определение интенсивности выделения CO₂ (рис. 1) продемонстрировало различия в динамике и интенсивности базального и индуцированного внесением субстратов дыхания почвы для вариантов с различной температурой инкубации. Для варианта 5°C величина базального дыхания была низкой в течение всего периода наблюдения. Достоверное увеличение выделения CO₂ после внесения фрагментов листьев и веток было зарегистрировано только через 8–10 суток после начала инкубации (рис. 1). В вариантах 15°C и 25°C значения интенсивности базального дыхания были значительно выше, они возрастали с начала инкубации и достигали максимального значения на восьмые–десятые сутки. Уже через двое–трое суток было отмечено достоверное увеличение по сравнению с контролем дыхательной активности, индуцированной внесенными субстратами. Подобный характер динамики дыхательной активности, индуцированной субстратами, был описан ранее в работах зарубежных авторов [35,36].

Наибольший отклик почвенного микробного сообщества на внесение субстратов был за-

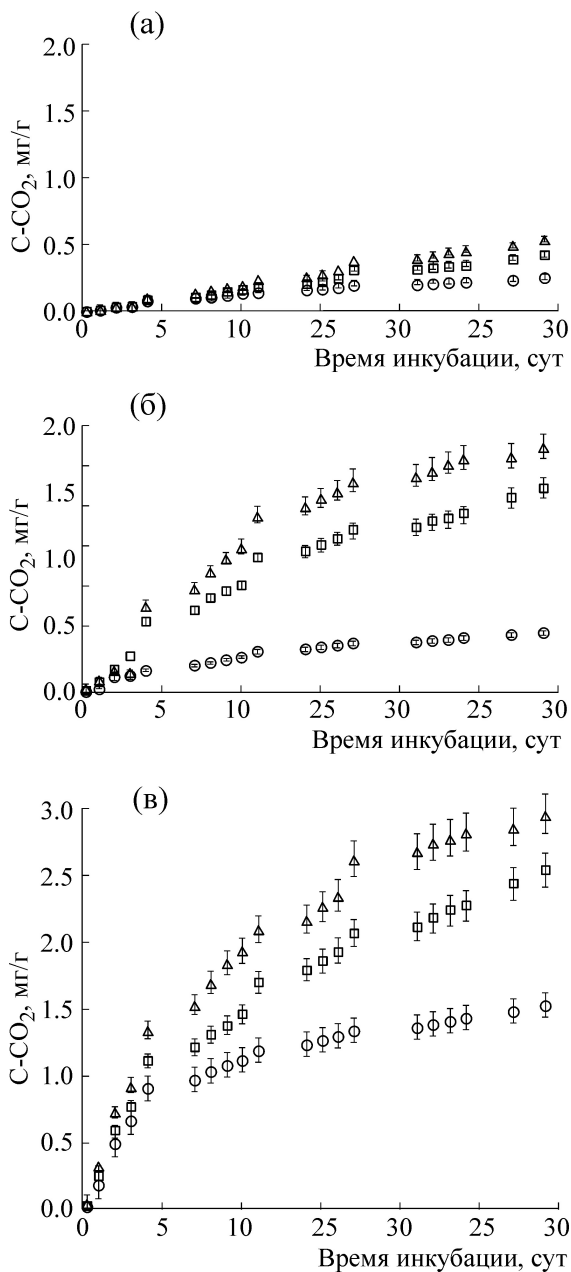


Рис. 1. Кривые интегрального накопления CO₂ в инкубационных экспериментах с различными значениями температуры: (а) – 5°C, (б) – 15°C, (в) – 25°C. Кружки – контроль, квадраты – ветки, треугольники – листья.

фиксирован для варианта опыта 15°C (табл. 1). При добавлении фрагментов листьев дыхательная активность ($k_{\text{л}}$) возрастала в 4,15 раза, а веток ($k_{\text{в}}$) – в 3,45 раза. Как для низких, так и для высоких значений температуры величины коэффициентов отклика были примерно в два раза ниже.

Динамика содержания углерода во внесенных субстратах в почве за период инкубации

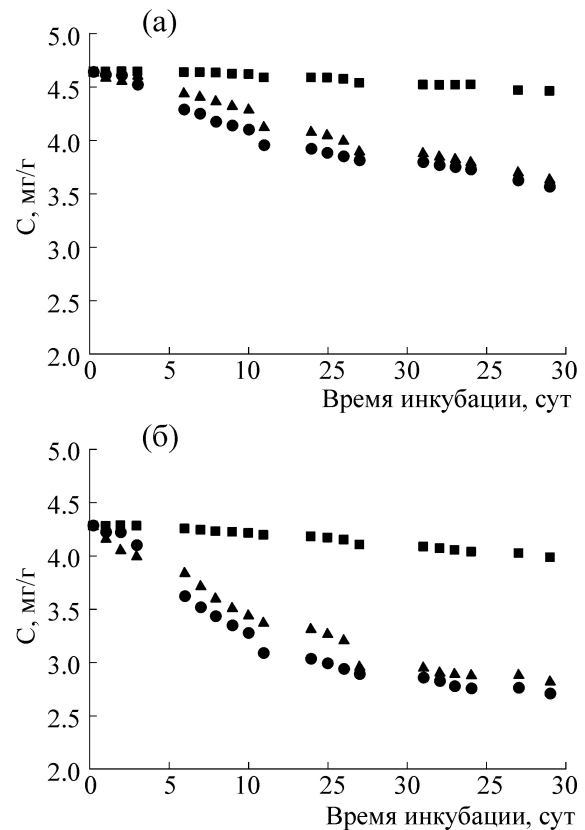


Рис. 2. Динамика остаточного содержания углерода внесенных листьев (а) и веток (б) осины в образцах почвы инкубационных экспериментов с различными значениями температуры: квадраты – 5°C, кружки – 15°C, треугольники – 25°C.

приведена на рис. 2. При низком значении температуры наблюдается незначительное равномерное снижение содержания углерода внесенных субстратов в течение всего периода наблюдения: за 28 суток убыль составила 0,28 мг С (6,8% от исходного) для листьев и 0,19 мг С (4,16%) для веток соответственно. В вариантах опыта при 15°C и 25°C наиболее интенсивно содержание углерода во внесенных субстратах уменьшалось в период инкубации с 5-х по 20-е сутки, после чего скорость снижения замедлялась (рис. 2). За период инкубации и при 15°C, и при 25°C величина снижения содержания углерода субстратов была близкой: для вариантов с листьями она составила 1,58 мг С (37%) и 1,45 мг С (33,9%) соответственно, а для вариантов с ветками убыль этого показателя составила 1,09 мг С (23,49%) и 1,02 мг С (21,81%) при 15°C и 25°C соответственно. Средняя скорость разложения листьев и веток за период инкубации при 5°C составила соответственно 0,24 и 0,16 мг С г⁻¹·сут⁻¹, а для двух других температур она была значительно выше: при 15°C – в 4,6 и 5,1 раза, при 25°C – в 5,1 и

Таблица 1. Влияние температуры инкубации на величину коэффициента отклика на внесение и скорость разложения растительных субстратов

Температура, °С	Коэффициент отклика микробного сообщества на внесение субстрата		Скорость разложения, мг С/г почвы·сут	
	$k_{л}$	$k_{в}$	Листья	Ветки
5	2,11	1,71	0,24	0,16
15	4,15	3,45	1,11	0,83
25	1,94	1,66	1,22	0,83

Таблица 2. Значения температурных коэффициентов Q_{10} для микробных процессов в серой лесной почве

Вариант	Температурный коэффициент (Q_{10})	
	5–15°С	5–25°С
Базальное дыхание	1,75	3,44
Разложение листового опада	3,44	1,61
Разложение древесного опада	3,54	1,65

5,2 раза для вариантов с листьями и ветками соответственно (табл. 2).

Сравнивая результаты определения почвенного дыхания и содержания углерода внесенных субстратов, нужно отметить следующий момент. Несмотря на то что абсолютные значения кумулятивного накопления углерода дыхательной активности ($C-CO_2$) для вариантов опыта с температурами 15 и 25°С отличались значительно (рис. 1), количество полностью окисленного древесного субстрата было для них близким (рис. 2). Количество $C-CO_2$, выделившего за период инкубации из образцов почвы с внесением листьев и веток, составляло при 15°С 18,47 мг и 15,34 мг соответственно, а при инкубации при высокой температуре (25°С) эти величины были выше, чем при 15°С, и составляли 29,71 и 24,45 мг соответственно для вариантов с внесением листьев и веток. В то же время количество полностью окисленных субстратов было близким для соответствующих температур в обоих случаях. Таким образом, повышение температуры приводит к изменению в соотношении углерода свежего растительного материала и почвенного ОВ в общем пуле продукции CO_2 в сторону снижения доли растительных субстратов и увеличения доли почвенного углерода (так называемый затравочный эффект). Высказанное предположение для своего подтверждения требует дополнительных исследований, в частности с использованием радиоактивно-меченых растительных субстратов, что позволит точно оценить пути распределения углерода древесного опада. В литературе имеются подобные работы, и наши заключения не противоречат их результатам. При изучении

пахотных черноземных почв Германии с помощью ^{13}C -меченых растительных остатков наибольший вклад свежего растительного вещества в дыхательную активность почвы был отмечен в первые дни после внесения, а затем его доля снижалась, особенно в условиях повышенной температуры [35].

Принципы химической кинетики предполагают, что температурная чувствительность процесса зависит от качества субстрата, и, следуя им, можно предположить, что процессы, в которых доля использования почвенного ОВ выше, чем свежей органики, должны быть более чувствительными к температуре. Это связано с тем, что почвенное ОВ состоит из сложных органических молекул, для разложения которых требуются высокие энергетические затраты на активацию. Поэтому увеличение температуры будет в большей степени влиять на динамику этих компонентов [37]. Для получения количественной оценки чувствительности почвенных процессов к температуре нами был использован температурный коэффициент Q_{10} . Для величины базального дыхания, основным субстратом которого является почвенное ОВ, значение коэффициента Q_{10} в температурном диапазоне 5–15°С было равно 1,75, а с повышением температуры в диапазоне 15–25°С возрастало до 3,4. В то же время в вариантах с внесением свежего органического вещества, как листового, так и древесного опада наблюдали обратную закономерность – высокие значения температурного коэффициента при низких температурах и снижение при высоких (табл. 2). Полученные значения температурных коэффициентов соответствуют типичным значениям коэффициента Ван

Таблица 3. Динамика содержания ДНК, углерода микробной биомассы и углерода органического вещества в образцах почвы инкубационного эксперимента

Температура инкубации 5°C												
Вариант опыта	Контроль				Листья				Ветки			
Время инкубации, сут	0	7	14	30	0	7	14	30	0	7	14	30
Содержание ДНК, мкг/г	26,8	26,9	29,4	30,5	26,8	28,5	28,6	28,9	26,8	28,8	29,3	29,3
Микробная биомасса, мкг С/г	136,7	137,0	150,1	155,6	136,7	145,4	145,8	147,0	136,7	146,6	149,6	149,2
Органическое вещество, мг С/г	Н.д.*	Н.д.	Н.д.	22,33	Н.д.	Н.д.	Н.д.	23,78	Н.д.	Н.д.	Н.д.	22,62
Температура инкубации 15°C												
Вариант опыта	Контроль				Листья				Ветки			
Время инкубации, сут	0	7	14	30	0	7	14	30	0	7	14	30
Содержание ДНК, мкг/г	26,8	27,4	28,1	28,6	26,8	27,0	28,7	29,7	26,8	26,5	29,2	28,6
Микробная биомасса, мкг С/г	136,7	139,7	143,1	145,8	136,7	137,9	146,3	151,5	136,7	135,4	148,9	145,7
Органическое вещество, мг С/г	Н.д.	Н.д.	Н.д.	23,05	Н.д.	Н.д.	Н.д.	26,10	Н.д.	Н.д.	Н.д.	21,03
Температура инкубации 25°C												
Вариант опыта	Контроль				Листья				Ветки			
Время инкубации, сут	0	7	14	30	0	7	14	30	0	7	14	30
Содержание ДНК, мкг/г	26,8	27,4	29,1	29,4	26,8	27,0	28,0	27,4	26,8	25,8	28,9	28,1
Микробная биомасса, мкг С/г	136,7	139,6	148,4	149,9	136,7	137,8	142,8	140,0	136,7	131,8	147,4	143,4
Органическое вещество, мг С/г	Н.д.	Н.д.	Н.д.	21,46	Н.д.	Н.д.	Н.д.	26,10	Н.д.	Н.д.	Н.д.	22,62

Примечание. * – Нет данных.

Гоффа. Они также близки к значениям Q_{10} , которые были получены на начальных стадиях разложения листового опада в модельных экспериментах с песчаными микрокосмами [38].

Количественные характеристики углерода микробной биомассы являются одним из основных параметров, который отражает увеличение микробной активности при разложении сложных органических соединений. В нашем исследовании для оценки микробной биомассы была проведена оценка содержания микробной ДНК с последующим использованием стабильных пересчетных коэффициентов [33]. Количественная оценка микробной биомассы почв с помощью этого метода позволяет преодолеть некоторые ограничения других базовых методов. Кроме того, полученные образцы ДНК могут быть использованы для последующих исследований методом количественной ПЦР в реальном времени, или секвенирования. Проведенные исследования показали, что внесение листового и древесного опада не приводило к достоверному повышению величины углерода микробной биомассы за время проведения эксперимента при всех исследованных температурных режимах (табл. 3). В течение всего периода наблюдений величина микробной биомассы варьировала в диапазоне от 136 до 150 мкг С·г⁻¹ для всех вариантов эксперимента. Возможной причиной отсутствия ее прироста мо-

жет быть недостаток доступного для микроорганизмов азота: соотношение С:Н в используемом растительном материале было значительно шире, чем таковое у самих микроорганизмов (для листьев оно составляло 46,43, а для веток – 63,06). Другим возможным объяснением может быть то, что внесенные субстраты используются для перехода покоящихся форм почвенных микроорганизмов в активное состояние и дальнейшего поддержания их гидролитической активности.

Доля углерода микробной биомассы в валовом содержании почвенного органического вещества ($C_{\text{мик}} : C_{\text{орг}}$) является одним из эколого-физиологических параметров состояния микробного сообщества, отражающим его трофический статус, и показателем биологической активности почвы, изменяющейся под краткосрочным воздействием на почву, или обусловленным разными свойствами почв [39]. Отношения $C_{\text{мик}} : C_{\text{орг}}$ являются также индикатором доступности почвенного углерода для микроорганизмов, и сужение этого отношения в почве указывает на стабильность органического субстрата или на наличие условий, препятствующих усвоению его микроорганизмами [40]. Внесение листового опада привело к увеличению содержания органического вещества почвы, что особенно проявилось в экспериментах с 15 и 25°C, однако доля углерода микробной био-

Таблица 4. Динамика численности микроорганизмов (копий рибосомальных генов) и соотношения бактерий и грибов в образцах почв эксперимента с различной температурой инкубации

Количество копий генов / г в.с. почвы ($\times 10^6$)												
Температура инкубации 5°C												
Вариант опыта	Контроль				Листья				Ветки			
	0	7	14	28	0	7	14	28	0	7	14	28
Время инкубации, сут												
16s рРНК бактерий	420	640	2000	1400	420	600	1800	2400	420	400	2000	2400
16s рРНК архей	0,66	1,0	0,4	0,9	0,66	0,4	1	0,8	0,66	0,1	1	0,3
18s рРНК грибов	6	40	60	60	6	20	80	121	6	4	200	340
Соотношение бактерий и грибов	1,27	1,16	1,20	1,18	1,27	1,20	1,27	1,34	1,27	1,30	1,12	1,10
Температура инкубации 15°C												
Вариант опыта	Контроль				Листья				Ветки			
	0	7	14	28	0	7	14	28	0	7	14	28
Время инкубации, сут												
16s рРНК бактерий	420	4000	1800	1400	420	4000	6000	8600	420	6000	2000	2000
16s рРНК архей	0,66	0,4	0,2	0,4	0,66	0,6	0,6	0,8	0,66	1,4	0,2	0,9
18s рРНК грибов	6	40	50	80	6	180	280	760	6	120	180	270
Соотношение бактерий и грибов	1,27	1,26	1,20	1,16	1,27	1,16	1,15	1,10	1,27	1,21	1,26	1,10
Температура инкубации 25°C												
Вариант опыта	Контроль				Листья				Ветки			
	0	7	14	28	0	7	14	28	0	7	14	28
Время инкубации, сут												
16s рРНК бактерий	420	600	1200	1400	420	6000	6000	9400	420	1400	1400	2600
16s рРНК архей	0,66	0,1	0,4	0,3	0,66	0,5	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2	0,7
18s рРНК грибов	6	5	10	40	6	180	180	830	6	120	120	340
Соотношение бактерий и грибов	1,27	1,43	1,40	1,44	1,27	1,18	1,18	1,12	1,27	1,14	1,13	1,10

массы осталась постоянной и варьировала в пределах 0,5–0,6% от содержания органического углерода.

Методами молекулярной биологии впервые в динамике получены количественные показатели численности микроорганизмов в ходе процесса первичной трансформации древесного опада в почве. С помощью метода количественной ПЦР в реальном времени прослежена динамика численности (количества копий рибосомальных генов) в ходе инкубационного эксперимента (табл. 4). Количество бактерий (копий 16s рРНК) варьировало от $4 \cdot 10^8$ до $9 \cdot 10^9$ на г почвы. Инкубация почвы с фрагментами листьев и веток в течение периода наблюдения приводила к увеличению количества бактерий не более чем в два–семь раз по сравнению с контролем. Количество микромицетов (копий 18s рРНК) варьировало от $6 \cdot 10^6$ до $340 \cdot 10^6$ на г почвы и возрастало в вариантах с внесением субстратов в два–пять раз. Количество архей достоверно не изменялось и составляло $(0,3–0,7) \cdot 10^6$ на г почвы. Полученные данные согла-

суются с результатами определения содержания углерода микробной биомассы и указывают на то, что на первичных этапах разложения свежего растительного материала происходит увеличение активности микробных гидролитиков, но не происходит значительного увеличения их численности.

Одним из подходов для понимания функционирования микробных сообществ почв является их дифференциация на экологически значимые группы, например, копиотрофы и олиготрофы, автохтонные и зимогенные, г- и к-стратеги, а также на эукариоты (грибы) и прокариоты (бактерии) [41]. Отношение бактерий : грибы хорошо отображает процессы разложения субстратов, трансформации питательных элементов и, как следствие, способность почвенных экосистем к саморегуляции [42]. Величина соотношения бактерий к грибам находилась в узком интервале от 1,10 до 1,44 для всех вариантов эксперимента (табл. 4), отражая примерное равновесие в численности с незначи-

тельным преобладанием бактериального компонента над грибным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В инкубационных экспериментах с образцами серой лесной почвы установлено, что на начальных этапах разложения древесного опада (фрагменты листьев и веток осины) процесс характеризуется высокой чувствительностью к температуре. Проведенные исследования показали, что процессы разложения внесенных растительных остатков наиболее интенсивно шли в течение первых трех–пяти суток, возможно, за счет использования водорастворимых органических соединений. Установлено, что эффективность использования внесенных субстратов в значительной мере зависит от температуры. При 15°C было зафиксировано максимальное увеличение дыхательной активности в ответ на внесение материала листьев и веток. Установлено, что температура 15°C, соответствующая средней температуре летних месяцев, является оптимальной для микробной деградации листового и древесного опада в серой лесной почве, в то время как и снижение, так и увеличение температуры приводит к снижению интенсивности разложения растительного материала.

В условиях высокой температуры внесение субстратов стимулировало разложение органического вещества почвы, что может быть охарактеризовано как «затравочный эффект» или прайминг-эффект. Наиболее вероятно, что он связан с усилением минерализации органического вещества почвы, а не с ускорением оборачиваемости микробной биомассы, так как в процессе инкубации не зафиксировано достоверных изменений величины микробной биомассы. Изменения оборачиваемости ОВ почвы происходят вследствие изменений активности микроорганизмов, участвующих в деградации высокомолекулярных соединений в ответ на внесенный доступный органический субстрат. Интенсивность микробного отклика, в свою очередь, зависит от состава и активности исходных микробных сообществ.

Методами молекулярной биологии впервые получены количественные показатели численности микроорганизмов в ходе первичных этапов разложения древесного опада. Применение высокочувствительного метода количественной ПЦР показало, что в процессе разложения субстратов наблюдается небольшое, но достоверное увеличение количества бактерий и грибов, в то время как количество архей остается неизменным. Для выяснения конкретных бактериальных и грибных агентов, которые, веро-

ятно, совместно участвуют в процессе минерализации свежего растительного материала, необходимо проведение анализа состава микробных сообществ методом метагеномного анализа.

Внесение фрагментов листьев и веток незначительно, но достоверно увеличивало количество как бактерий, так и микромицетов, что предполагает их совместное участие в процессе трансформации древесного опада.

Несмотря на то что наш эксперимент являлся модельным, результаты, полученные в исследовании, могут получить более широкое применение. Нами показано, что повышение температуры приводит к дополнительному поступлению CO₂ в атмосферу не только за счет минерализации свежего органического материала, но и органического вещества почвы, т.е. прайминг-эффекта. Понимание механизмов его возникновения и контроля является необходимым условием для описания баланса углерода в системе почва–атмосфера. Согласно современным прогнозам, потепление климата приведет к увеличению поступления первичной продукции в почву и, как результат, к усилению микробной активности, что, в свою очередь, может привести к формированию отрицательного баланса углерода в почве из-за интенсивной минерализации почвенного ОВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект РФФИ-ГФЕН № 18-54-53004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. И. Базилевич и Л. Е. Родин, *Динамика органического вещества и биологический круговорот азота и зольных элементов в основных типах растительности земного шара* (Наука, Москва, 1965).
2. К. А. Лукомская, *Микробиология с основами вирусологии* (Наука, Москва, 1987).
3. Д. Г. Звягинцев, *Почва и микроорганизмы* (Изд-во МГУ, Москва, 1987).
4. J. S. Clein and J. P. Schimel, *Soil Biol. Biochem.* **27**, 1231 (1995).
5. F. L. Bunnell, D. E. N. Tait, P. W. Flanagan, and K. Van Cleve, *Soil Biol. Biochem.* **9**, 33 (1977).
6. Л. А. Гришина, М. И. Копчик и М. И. Макаров, *Трансформация органического вещества почв* (Изд-во МГУ, Москва, 1990).
7. Л. С. Песочина и Т. П. Малыгина, *Микроморфологические особенности трансформации растительных остатков в различных гидротермических условиях* (Бюл. Почв. ин-та, М., 1989).
8. W. H. Schlesinger, *Soil organic matter: a source of atmospheric CO₂*, Ed. by G. M. Woodwell (London, 1984).

9. Н. Н. Наплекова, *Аэробное разложение целлюлозы микроорганизмами в почвах Западной Сибири* (Наука, Новосибирск, 1974).
10. B. Berg and C. McLaugherty, *Plant Litter–Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration* (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2008).
11. А. А. Рахлеева, Т. А. Семенова, Б. Р. Стриганова и В. А. Терехова, *Почвоведение* **1**, 44 (2011).
12. B. Berg and R. Laskowski, *Adv. Ecol. Res.* **38**, 1 (2006).
13. E. A. Davidson, S. CHart, and M. K. Firestone, *Ecology* **73** (4), 1148 (1992).
14. N. Fierer, J. M. Craine, K. McLaughghan, and J. P. Schimel, *Ecology* **86**, 320 (2005).
15. E. Matzner and W. Borken, *Eur. J. Soil Sci.* **59** (2), 274 (2008).
16. M. Carlile, S. Watkinson, and G. Gooday, *The Fungi*, 2nd ed. (Academic Press, 2001).
17. C. Kramer and G. G. Leixner, *Soil Biol. Biochem.* **38**, 3267 (2006).
18. M. Pettersson and E. Bafiafith, *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**, 13 (2003).
19. K. Carney, B. Hungate, B. Drake, and J. Megonigal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 4990 (2007).
20. K. K. Treseder, *Ecol. Lett.* **11** (10), 1111 (2008).
21. P. M. Cox, R. A. Betts, C. D. Jones, et al., *Nature* **408**, 184 (2000).
22. G. A. Meehl, T. F. Stocker, W. D. Collins, et al., In *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*, Ed. by S. Solomon, D. Qin, M. Manning, et al. (Cambridge University Press, Cambridge, UK; New York, USA, 2007).
23. J. H. Christensen, B. Hewitson, A. Busuioc, et al., In *Climate Change 2007: The Physical Science Basis?* Ed. by S. Solomon, D. Qin, M. Manning, et al. (Cambridge University Press, Cambridge, UK; New York, USA, 2007).
24. T. R. Filley, T. W. Boutton, J. D. Liao, et al., *J. Geophys. Res. – Biogeosciences* **113**, G03009 (2008).
25. M. U. F. Kirschbaum, *Soil Biol. Biochem.* **38**(9), 2510 (2006).
26. I. P. Hartley and P. Ineson, *Soil Biol. Biochem.* **40** (7), 1567 (2008).
27. В. Н. Кудяров, Г. А. Заварзин, С. А. Благодатский и др., *Пулы и потоки углерода в наземных экосистемах России* (Наука, Москва, 2007).
28. А. В. Смагин, Н. Б. Садовникова, М. В. Смагина и др., *Моделирование динамики органического вещества почв* (Изд-во МГУ, Москва, 2001).
29. L. Rustad, T. G. Huntington, and R. D. Boone, *Biogeochemistry* **48** (1), 1 (2000).
30. S. Manzoni, S. M. Schaeffer, G. Katul, et al., *Soil Biol. Biochem.* **73**, 69 (2014).
31. E. E. Schulte, C. Kaufmann, and B. J. Peter, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **22**, 159 (1991).
32. Д. С. Орлов, О. Н. Бирюкова и Н. И. Суханова, *Органическое вещество почв Российской Федерации* (Наука, Москва, 1996).
33. M. Semenov, E. Blagodatskaya, A. Stepanov, and Y. Kuzyakov, *J. Arid Environm.* **150**, 54 (2018).
34. Е. Е. Андронов, С. Н. Петрова и А. Г. Пинаев, *Почвоведение* **2**, 173 (2012).
35. S. Thiessen, G. Gleixner, T. Wutzler, and M. Reichstein, *Soil Biol. Biochem.* **57**, 739 (2013).
36. Z. A. Malik, R. Pandey, and A. B. Bhatt, *J. Mountain Sci.* **13**, 69 (2016).
37. J. C. C. Yuste, D. D. Baldocchi, A. Gershenson, et al., *Glob. Change Biol.* **13**, 2018 (2007).
38. А. А. Ларионова, А. Н. Мальцева, В. О. Лопес де Гереню и др., *Почвоведение* **4**, 438 (2017).
39. E.-A. Kaiser and O. Heinemeyer, *Soil Biol. Biochem.* **25** (12), 1649 (1993).
40. В. М. Семенов, Л. А. Иванникова и А. С. Тулина, *Агрохимия* **10**, 77 (2009).
41. M. S. Strickland and J. Rousk, *Soil Biol. Biochem.* **42**, 1385 (2010).
42. M. G. A. Van der Heijden, R. D. Bardgett, and N. M. Van Straalen, *Ecol. Lett.* **11**, 296 (2008).

Temperature Sensitivity of the Initial Stage of Microbial Woody Litter Decomposition in Forest Soil

E.V. Menko, E.N. Tikhonova, R.V. Ulanova, M.V. Sukhacheva*, T.V. Kuznetsova,
S.N. Udaltsov**, and I.K. Kravchenko**

*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

**Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

***Institute of Physical-Chemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

It is known that soil organic matter of forest ecosystems is characterized by a high level of sensitivity to temperature rise, due to this fact soil organic matter is more vulnerable under the effects of global warming. In this study, evaluation of the influence of different components of tree litter (leaves and small branches of aspen) on the dynamics of activity and quantitative characteristics of microbial communities of soils has taken place in the form of climate warming model. Samples of gray forest soil, the typical soil for the European part of Russia and isolated from a forest biocenosis in the Moscow region, were used in our experiment. Incubation of soil samples, to which crushed leaves and twigs were added at the rate of 0.5% by weight, was carried out at constant temperatures of 5, 15 and 25°C for 28 days. The dynamics of CO₂ emission, organic carbon, microbial biomass, and the number of ribosomal genes of bacteria, archaea and micromycetes was evaluated. It was found that the optimal temperature for plant litter decomposition was 15°C, and a decrease or increase in temperature led to a reduction in the intensity of the litter decomposition process. In the temperature range of 5–15°C, when plant residues were added to soil samples, temperature sensitivity of soil respiration significantly increased, and the temperature coefficient raised from 1.75 to 3.44–3.54. In the temperature range of 15–25°C, the inverse relationship was observed. At a high temperature, an addition of plant residues stimulated decomposition of soil organic matter. The obtained results contribute to the understanding of the dynamics of soil carbon and can be used in predictive models of the processes of plant litter decomposition and the dynamics of soil organic matter in forest biocenoses in Eurasia under climate change.

Keywords: temperature sensitivity, tree litter, microorganisms, global climate change, bacteria, micromycetes