

УДК 579.2

**ЕЖЕДНЕВНАЯ ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИЙ И ЭМИССИИ
СО₂ ПОЧВЫ И СВЯЗЬ ИХ ВОЛНООБРАЗНЫХ КОЛЕБАНИЙ
С СУКЦЕССИЕЙ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА****© 2013 г. А. М. Семенов¹, И. А. Бубнов¹, В. М. Семенов², Е. В. Семенова¹,
В. В. Зеленов¹, Н. А. Семенова²**¹ Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1² Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
142290, Пушкино, Московская обл., Институтская 2

Поступила в редакцию 11.09.2012 г.

В микрополевым эксперименте в течение 25–27 дней изучалась ежедневная динамика численности колониеобразующих единиц копиотрофных и олиготрофных бактерий и эмиссии СО₂ возделываемой почвы после долгосрочных и краткосрочных нарушающих воздействий. Изучена связь волнообразных колебаний численности и СО₂ с сукцессией почвенного микробного сообщества, определяемого методом ПЦР–ДГГЭ также в течение 27 дней. Краткосрочные нарушающие воздействия заключались во внесении в почву разных участков органических или минеральных удобрений и пестицидов, а также растительных остатков. Долгосрочное воздействие заключалось в трехлетнем разлучении в системе земледелия: биологической или интенсивной. Краткосрочные воздействия приводили к росту пиков волнообразной динамики численности, значимость которых подтверждена гармоническим анализом. Впервые изученная методом ДГГЭ ежедневная динамика структуры микробного сообщества почвы (27 дней) также имела колебательный характер. Статистический анализ данных (анализ главных компонент, гармонический и кросскорреляционный анализы) выявил значимые колебания структуры микробного сообщества, совпадающие с соответствующими колебаниями численности. Изменение структуры микробного сообщества происходило в пределах каждого пика динамики численности, а не от пика к пику, что указывает на циклический характер краткосрочной сукцессии. Долгосрочные воздействия привели к снижению интенсивности реакции микробиоты в виде скорости выделения СО₂ почвой, возделываемой по биологической системе земледелия.

Ключевые слова: осцилляции микроорганизмов, денатурирующий градиентный гель-электрофорез, ДГГЭ, КОЕ, анализ главных компонент.

DOI: 10.7868/S0032180X13080078

ВВЕДЕНИЕ

Изучение ответа на различные нарушающие воздействия является распространенным методом исследования сложносоставных систем, таких как почва [13, 14, 20, 25]. В зависимости от целей и типа исследования, могут использоваться как краткосрочные, так и долгосрочные нарушающие воздействия [8, 15, 28]. Как правило, на почву оказываются воздействия в форме механической обработки, полива, внесения удобрения, выращивания растительности и др. [9, 16]. Соответственно, такие “типовые” нарушающие воздействия на почву могут быть как краткосрочными, например, одноразовое локальное применение удобрений, пестицидов, так и долгосрочными — тип землепользования, многолетняя монокультура. При исследовании реакции микробного сообще-

ства (МС) на любой тип воздействия наиболее ценные результаты могут быть получены при изучении ежедневной динамики [2, 29, 34, 35, 40].

При исследовании почв разными методами показаны существенные флуктуации численности бактерий при изучении их ежедневной динамики [1, 7, 31]. Как правило, такие флуктуации были неравномерны во времени и не имели выраженной зависимости от условий окружающей среды. Было показано, что нарушающие воздействия, в виде добавления питательных веществ, оказывало “упорядочивающее” действие на хаотичные на вид флуктуации, переводя их в более закономерные, статистически значимые колебания в условиях промышленных биореакторов [11, 21], ризосферы [29, 33, 35] и неризосферной почвы [41]. Нарушающее воздействие на почвенную экосистему приводит к волнообразной реакции

не только в численности микроорганизмов, но и функциональной активности, например, целлюлолитической активности, эмиссии CO_2 и других газов [2, 17]. Показано, что характеристики волнообразного ответа микробных популяций и МС, такие как амплитуда и частота колебаний, связаны со свойствами МС или даже всей экосистемы [3, 39].

Помимо колебаний численности бактериальных популяций (БП) во времени [41], в ризосфере также был показан значимый колебательный характер пространственного распределения БП вдоль корня пшеницы [29]. Было предположено, что наиболее вероятной причиной возникновения колебаний является рост и отмирание доминирующих популяций бактерий. Эта концепция была успешно смоделирована в математических моделях BACWAVE и BACWAVE-WEB [39, 40, 42]. Методом полимеразной цепной реакции — денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ПЦР—ДГГЭ) с применением анализа главных компонент показано, что вдоль растущего корня пшеницы структура МС менялась в пределах каждого пика числа колониеобразующих единиц (КОЕ), и эти изменения МС повторялись от пика к пику.

Явление долгосрочной сукцессии МС в ответ на различные стрессы показано неоднократно и является установленным фактом [10, 17, 37]. Механизмы и особенности краткосрочной сукцессии МС при ежедневных наблюдениях динамики численности почвенных микробных популяций на данный момент не описаны и не охарактеризованы [40]. Отметим, что условия в неризосферной почве менее упорядочены и в большей степени подвержены воздействию внешних факторов, чем в ризосферной. Поэтому данные о характере изменений структуры МС и их связь с колебательной динамикой численности бактерий будут важны не только для фундаментального познания способов существования микроорганизмов в почве, но и для разработки методов предсказания и контроля поведения почвенных МС, в том числе при оценке здоровья почвы [5, 34]. Предполагается, что здоровая почва характеризуется замкнутостью трофических циклов, а также устойчивостью и сопротивляемостью к нарушающим воздействиям [24], и что количественные характеристики колебаний МС, вызванных нарушающими воздействиями, могут быть использованы в качестве индикатора здоровья почвы [4—6, 32, 34].

Различие в здоровье почвы связано, в том числе, и с использованием тех или иных систем земледелия. Интенсивная система земледелия (ИСЗ) нацелена на увеличение урожайности путем использования минеральных удобрений, пестицидов и при необходимости генетически модифи-

цированных организмов [10, 22, 26]. Биологическая система земледелия (БСЗ) направлена на получение продуктов высокого качества и сохранения здоровой экосистемы при использовании только органических удобрений и биологических способов борьбы с вредителями. Показано, что почвы, возделываемые по БСЗ, имеют большую численность микроорганизмов, особенно бактерий, учитываемых на бедных органическими веществами средах (олиготрофов), большее разнообразие нематод, меньшую эмиссию CO_2 в ответ на нарушающее воздействие и меньшие концентрации минерального азота, чем почвы, возделываемые по ИСЗ, и, таким образом, могут считаться более здоровыми [22, 23, 36].

Целью работы было изучение ежедневной динамики численности КОЕ бактериальных популяций, активности микроорганизмов в виде скорости выделения CO_2 и изучение характера сукцессии бактерий при краткосрочных и долгосрочных нарушающих воздействиях на почву, а также выявление связи между характером сукцессии бактерий и ежедневной динамикой их численности.

ОБЪЕКТЫ МЕТОДЫ

Исследования проводились в условиях микрополевого эксперимента на серой лесной почве в Пушкино на территории Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН. До этого участок почвы не использовался и не обрабатывался в течение как минимум 15 лет. Были подготовлены делянки 2×2 м для различных вариантов обработки почвы, 6 участков для биологического (БСЗ) и 6 для интенсивного земледелия (ИСЗ). Дополнительно были избраны 3 участка в виде необрабатываемой почвы, называемой далее эродированной, так как верхний почвенный слой был нарушен в ходе строительных работ 15 лет назад. Таким образом, всего было подготовлено 15 участков.

Выращиваемые культуры. Участки для каждого способа обработки почвы были поделены на два блока с различными выращиваемыми культурами, по три рандомизированных повторности в каждом блоке. В 2005 г. 22 июля были посажены черная редька (варианты 1 и 2, в трех повторностях) и смесь фуражных многолетних трав (варианты 3, 4, в трех повторностях) (многолетние травы: 20% *Lolium perenne*, 15% *Festuca rubra*, 20% *Festuca rubra commuta*, 10% *Festuca ovina duriuscula*, 10% *Poa pratensis*, 5% *Trifolium repens*, оставшиеся 20% составили календула, гипсофила, маттиола, валериана и др.). Весной 2006 г. вместо редьки была посеяна сахарная свекла в вариантах 1 и 2, а в вариантах 3 и 4 осталась смесь трав. В 2007 г. 16 апреля во все обрабатываемые участки

была посеяна смесь вика-овес-горох (50% *Vicia sp.*, 30% *Avena sp.*, 20% *Pisum sp.*).

Удобрение, нарушающие воздействия и отбор образцов. В 2005 г. 21 июля в участки БСЗ (варианты 2 и 4) было внесено удобрение в виде навоза, приобретенного на ферме, производящей экологически чистые молочные продукты (пос. Болотово, Московской обл.) (25 т/га, сухое вещество — 20.15%, С орг — 36.5%, N общ — 1.64% сухого вещества (0.33% влажного вещества). Всего было внесено 82.5 кг/га N общ и 1.8 т/га С орг. На участки ИСЗ (варианты 1 и 3) были внесены минеральные удобрения, азот в виде $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, фосфор $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ и калий K_2SO_4 . Всего внесено азота 100 кг/га. Дополнительно 8 августа 2005 г. на участки ИСЗ было внесено 2.5 кг/га гербицида 2,4-D. Гербицид вносили между рядками взойшедших растений. Необрабатываемые участки не удобрялись.

Сбор урожая был произведен 28 сентября 2005 г. Листья и корни черной редьки и надземная биомасса фуражной травы были собраны и взвешены. Листья редьки были измельчены и внесены в почву (565 г сухого вещества/м² для участков ИСЗ и 425 г сухого вещества/м² для участков БСЗ). Надземная биомасса фуража была удалена с участков. В 2005 г. отбор образцов почвы и определение эмиссии газов проводили ежедневно с 29 августа по 22 сентября.

Весной 2006 г. образцы почвы и газов первоначально отбирали в течение 8 дней (с 16 по 23 мая) с незасеянных участков (варианты 1 и 2), а на участках с фуражной травой, где она сохранилась с предыдущего года (варианты 3 и 4) — между рядками растений. На 8 день было произведено внесение удобрений. В участки вариантов 1 и 3 (ИСЗ) внесли минеральные удобрения (200 кг/га азота в виде $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$). Также был внесен гербицид 2,4-D в количестве 2.5 т/га. На участки вариантов 2 и 4 (БСЗ) был внесен свежий навоз в количестве 50 т/га (сухое вещество — 20.6%, С орг — 38.5%, N общ — 1.7% сухого вещества). Всего внесено 3.9 т/га С орг и 175.1 кг/га N общ. Удобрения вносились в почву в случае вариантов 1 и 2 или наносились на поверхность почвы в случае вариантов 3–4. Затем на пустых участках вариантов 1 и 2 была посеяна сахарная свекла, 40 см между рядками. Таким образом, нарушающее воздействие заключалось в добавлении удобрений и в механическом нарушении почвы. Отбор образцов затем был продолжен до 11 июня.

Осенью 2006 г. образцы почвы и газов сначала отбирали в течение 4 дней до нарушающего воздействия. Затем растения: сахарная свекла и фуражная трава — были собраны, листья свеклы и надземная биомасса фуража измельчены и внесены в соответствующие участки вариантов 1–4, с которых они были собраны в количествах 8.4, 7.1,

2.65 и 2.55 кг/м² влажного вещества. Ежедневный отбор образцов в 2006 г. проводили дважды: с 16 мая по 11 июня (25 дней; далее — май–июнь 2006 г.) и с 4 по 30 сентября (27 дней; далее — сентябрь 2006 г.).

В 2007 г. 16 апреля минеральные удобрения были внесены только в участки варианта 1 ИСЗ (100 кг/га N общ), а навоз в количестве 25 т/га только в участки варианта 2 БСЗ (сухое вещество — 21.4%, С орг — 31.9%, N общ — 1.93% сухого вещества) (1.7 т/га С орг и 103.3 кг/га N общ). Участки вариантов 3 и 4 не удобрялись в целях изучения эффекта “последствия” предыдущих доз удобрений. Гербицид 2,4-D был внесен в оба варианта 1 и 3 ИСЗ. 16 июня надземная биомасса была собрана, взвешена, измельчена и внесена в соответствующие участки почвы. В 2007 г. ежедневный отбор образцов производился с 13 июня по 7 июля (25 дней; далее — июнь–июль 2007 г.).

Всего в течение трех лет на участки ИСЗ было внесено 746 кг/га N общ и 6311 кг/га С орг (C/N 8.5). На участки БСЗ было внесено 644 кг/га N общ и 13028 кг/га С орг (C/N 20.2). Почвенные и газовые образцы отбирались в течение 25 или 27 дней в одно и то же время дня (утром).

Отбор и анализ газовых образцов. Для сбора образцов газов герметичные непрозрачные контейнеры (основание 91.6 см², объем 750 см³) в трех повторностях заглубляли в почву на 4–5 см в одно и то же место каждый раз перед началом отбора. Газовые образцы отбирались из контейнеров с помощью 20 мл шприцов сразу после внесения в почву и через 45 мин инкубации.

Для определения CO₂ отобранные из контейнеров 20 мл газа переносили в герметически закрытые стеклянные флаконы, заполненные раствором 1 н. NaCl. Концентрацию CO₂ определяли газовым хроматографом Кристалл 5000.1 (Хроматек, Йошкар-Ола, республика Марий Эл). В качестве детектора использовался пламенно-ионизационный детектор (250°C), снабженный метанолитом. Колонка 2 м × 2 мм (+40°C ± 0.1°C) заполнена Hayesep N. Газ-носитель — аргон, скорость потока 30 мл/мин. Вносимый объем 1.0 мл. Чувствительность — 0.05 ppm.

Параметры окружающей среды. Каждый раз при отборе почвенных и газовых образцов измеряли параметры окружающей среды: температуру воздуха и почвы, влажность почвы, количество осадков, выпавших в период определения ежедневной динамики численности КОЕ и CO₂. Почвенные образцы отбирали буром (глубина 20 см) и помещали в новые полиэтиленовые пакеты. В образцах определяли общий органический углерод, минеральные формы азота (NO_3^- и NH_4^+) и использовали для микробиологических и молекулярно-биологических анализов.

Чашечный учет. Подсчет КОЕ бактерий на богатой и бедной средах проводился путем посева на чашки Петри. Полграмма почвы смешивали с 4.5 мл стерильной дистиллированной воды в пробирке и встряхивали 3 раза по 30 с. Суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 30 с (Elma D – 78224, HF – 35 kHz, Emasonic, Germany). 50 мкл суспензии из 10^{-5} разведения наносили на чашки с агаризованной средой в трех повторностях. Использовали две среды. Высокоуглеродная среда содержала (г/л): $0.5 \text{ MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0.5 KNO_3 ; $1.3 \text{ K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$; $0.06 \text{ Ca(NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 2.5 глюкозы; 0.2 энзиматического гидролизата казеина и 15.0 агара, а также 100 ppm стерильно внесенного циклогексимида [29]. Общее содержание углерода в этой среде составляло 1000 мг/л. Низкоуглеродная среда имела схожий состав при уменьшении в 100 раз содержания глюкозы и энзиматического гидролизата казеина, а также использовании высокочистого Agar Noble (Difco Laboratories, Detroit, MI) вместо обычного агара. Колонии бактерий, растущих на высокоуглеродной среде, называемых далее копиотрофами, подсчитывали после 60 ч инкубации при температуре 28°C . Колонии, растущие на низкоуглеродной среде, называемые далее олиготрофами, подсчитывали через 14 дней инкубации при температуре 28°C .

Анализ микробного сообщества. Почвенные образцы для молекулярно-биологического анализа хранили при температуре -20°C . Для определения разнообразия и представленности бактериальных популяций использовали денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ) продуктов ПЦР ДНК, выделенной из почвенных образцов. Данные, полученные с помощью ДГГЭ (наличие/отсутствие отдельных видов и их представленность в образце), были подвергнуты анализу методом главных компонент [19].

Для сравнения структуры МС различно обрабатываемых почв и их реакций на краткосрочные нарушающие воздействия было проанализировано лишь несколько образцов из вариантов 1, 2 и 5, но из каждого периода отбора. Данные, полученные с помощью ДГГЭ, сравнивали с использованием типичных двухмерных диаграмм анализа главных компонент, отображающих суммарные проекции данных на первую и вторую главные компоненты по оси абсцисс и ординат соответственно. Точки на диаграмме отображают относительное сходство и различия структуры МС почвенных образцов.

Для изучения временных изменений структуры МС в течение одного полного периода отбора образцов и для сравнения этих изменений с динамикой численности бактерий в тот же период все ежедневно отобранные почвенные образцы вариантов 1 и 2 сентября 2006 г. были проанализирова-

ны с помощью ДГГЭ и анализа главных компонент. Двухмерные диаграммы применяются для нахождения различий и группировки образцов, однако они хуже подходят для отслеживания изменений во времени. Поэтому были построены графики временной динамики суммарной проекции данных на первую главную компоненту относительно временной шкалы всего периода отбора сентября 2006 г.

Выделение ДНК из почвы. Для образцов мая–июня 2006 г. и сентября 2006 г. выделение и очистка ДНК проводилась с помощью Fast DNA SPIN for soil kit (MP Biomedicals, LLC) в соответствии с руководством, поставляемым производителем. В июне–июле 2007 г. выделение и очистка ДНК осуществлялась с помощью модификации улучшенного фенол-хлороформного метода [38]. Выделенную таким образом ДНК дополнительно очищали с помощью “Wizard DNA clean-up system” (Promega Corporation, Madison, USA) в соответствии с руководством, поставляемым производителем. 10 различных клонов *E. coli* использовались в качестве метчика для ДГГЭ; выделение ДНК проводили тем же способом.

ПЦР и ДГГЭ. ПЦР проводили с использованием T-personal Thermocycler (Bioterra, Germany) и набора реагентов для ПЦР R-412 (Синтол, Москва). Образцы ДНК предварительно разбавляли в 50 раз стерильным буфером Трис-ЭДТА. Использовали эубактериальные праймеры U986GC и L1401 [18], к первому из которых был присоединен GC-clamp. Программу ПЦР использовали в соответствии с [27]. Продукты ПЦР визуализировали посредством электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

Продукты ПЦР разделяли методом ДГГЭ с использованием DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA). Использовали 6%-ные акриламидные гели (37.5 акриламид : 1 бисакриламид) с градиентом денатурирующих агентов 45–60% по методике [35]. В качестве метчика использовали смесь продуктов ПЦР ДНК чистых культур. Гели окрашивали серебряным красителем Bio-Rad’s Silver Stain (Bio Rad Laboratories, USA) в соответствии с руководством, поставляемым производителем. Окрашенные гели анализировали программой Phoretix TotalLab TL120 (Nonlinear dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Полосы определяли вручную, без использования автоматического распознавания. Программный анализ позволил определить относительную интенсивность полос, их подвижность (R_f) и ассоциировать полосы с одинаковым R_f друг с другом.

Статистический анализ. Результаты учета КОЕ представлены в виде средних значений почвенных образцов трех участков, 3 чашки на образец. На графиках представлено среднее зна-

чение со стандартным отклонением на основе трех участков. Все результаты динамики КОЕ были подвергнуты гармоническому анализу (анализом Фурье), с использованием 3-точечного окна Ханна по методике [29, 33]. Бактериальное разнообразие в образцах оценивали двумя способами: как видовое богатство S (число полос ДГГЭ, вне зависимости от интенсивности) и индекс бактериального разнообразия Шеннона H . Последний рассчитывается как $H' = -\sum P_i \lg P_i$ и основан на относительной интенсивности полос в соответствии с [12]. P_i задается как n_i/N , где n_i — интенсивность полосы, а N — сумма интенсивностей всех полос. Анализ главных компонент для данных ДГГЭ производили по программе CANOCO. Software for Canonical Community Ordination (version 4.5) (Biometris, Wageningen, The Netherlands) [30]. Для анализа интенсивность полос ДГГЭ рассматривали как относительную представленность операционных таксономических единиц (ОТЕ) в почвенном образце. ОТЕ сравниваемых образцов объединяются на основе R^2 соответствующих полос, так что каждый образец в итоге характеризуется наличием или отсутствием тех или иных ОТЕ и их представленности. Для последующего анализа данные были нормализованы и стандартизованы. Полученные в ходе анализа координаты были повернуты по правилу варимакс. Результаты в виде проекций данных на главные компоненты и соответствующих факторных нагрузок представлены в виде двухмерных диаграмм или временных графиков по принципу, описанному выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ежедневная динамика численности бактерий (КОЕ). Во всех периодах отбора почвенных образцов и во всех участках были обнаружены колебания численности бактерий при учете КОЕ как копиотрофов, так и олиготрофов. Данные, полученные в разные периоды отбора, не были усреднены, так как колебательные динамики со временем сменяются, и такое усреднение привело бы к потере данных [41]. Было произведено усреднение данных трех участков в пределах каждого варианта обработки. Следует заметить, что неусредненные динамики КОЕ каждого отдельного из трех участков были ровнее и имели более выраженный колебательный характер, чем усредненные данные.

Среднее число КОЕ олиготрофов значительно превышало численность КОЕ копиотрофов в мае—июне 2006 г. и июне—июле 2007 г. и менее выражено в сентябре 2006 г. Как правило, можно выделить 6—8 пиков КОЕ в течение месячной динамики, с периодом от 3 до 5 (реже до 6) дней. Число КОЕ копиотрофов варьировало в мае—июне 2006, сентябре 2006 г. и июне—июле 2007 г. от 1.44×10^7

(КОЕ/г сухой почвы) до 1.19×10^8 , от 8.75×10^6 до 1.15×10^8 и от 3.44×10^6 до 5.23×10^7 соответственно. Число КОЕ олиготрофов варьировало от 5.53×10^7 до 2.81×10^8 , от 2.07×10^7 до 1.53×10^8 и от 1.63×10^7 до 1.60×10^8 соответственно.

В мае—июне 2006 г. нарушающее воздействие (внесение минеральных удобрений и гербицида 2,4-Д в участки ИСЗ и органических удобрений в участки БСЗ) привело к выраженному ответу в динамиках численности копиотрофов и олиготрофов только в вариантах БСЗ. Произошло увеличение числа бактерий и увеличение размаха и центра колебаний (рис. 1) копиотрофов и олиготрофов для образцов, взятых с участков с фуражной травой. В участках с сахарной свеклой отмечен рост только числа КОЕ копиотрофов с быстрым последующим снижением к исходной численности. В участках ИСЗ и эродированной почве колебания численности КОЕ имели равномерный характер в течение всего периода наблюдений.

В сентябре 2006 г. нарушающее воздействие (внесение надземной биомассы на пятый день наблюдений) не повлекло за собой выраженного ответа (данные не приводятся). Имел место лишь умеренный рост как центра, так и размаха колебаний численности КОЕ копиотрофов и олиготрофов (данные представлены частично). В некоторых участках (ИСЗ, свекла и фураж; БСЗ, свекла) такой рост начинался после 12 дня наблюдений и продолжался во второй половине месячной динамики, лучше проявляясь на высоко углеродной среде. В других участках (БСЗ, фураж; эродированная почва) кроме отмеченного увеличения численности КОЕ отмечено сначала увеличение размаха колебаний, потом уменьшение колебаний в первой части месячной динамики.

В июне—июле 2007 г. во всех участках наблюдалась своеобразная колебательная динамика численности КОЕ копиотрофов и олиготрофов. Примерно с третьего по десятый дни наблюдений выявлено несколько высоких пиков КОЕ. Затем колебания уменьшались, равно как и абсолютное число КОЕ, но после 14 дня наблюдений эти характеристики вновь стали постепенно увеличиваться. Увеличение продолжилось в течение второй части месячной динамики, но так и не достигло значений исходных пиков (данные не приводятся). Сразу после нарушающего воздействия (внесение надземной биомассы на 4 день наблюдений) зафиксирован высокий пик численности КОЕ. Однако в некоторых повторностях этот пик начался либо за 1—2 дня до воздействия, либо ему предшествует другой пик сравнимой величины. Кроме того, в участках эродированной почвы также имелся высокий пик числа КОЕ, который начался и достиг максимума до нарушающего воздействия.

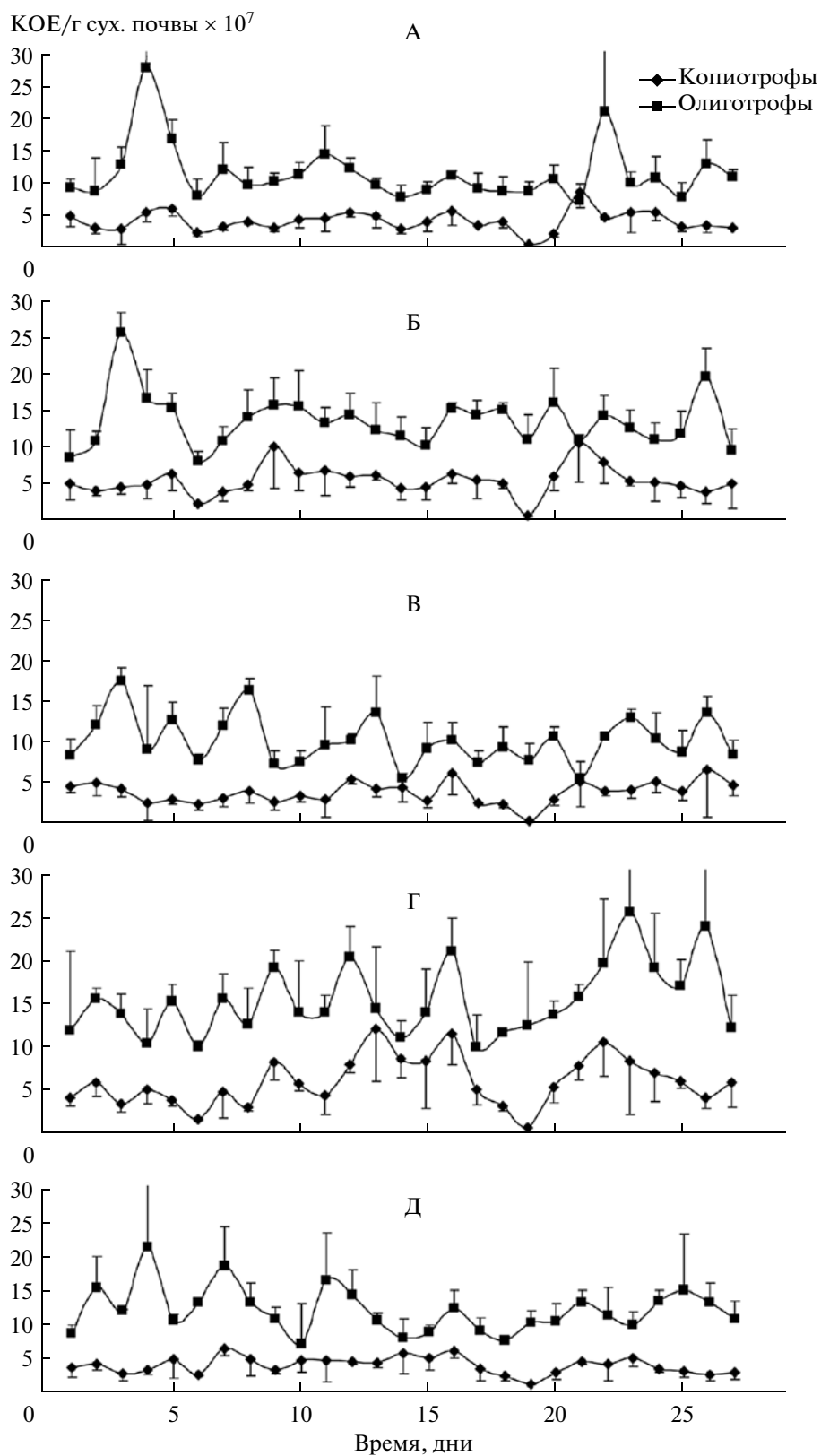


Рис. 1. Ежедневная динамика КОЕ копиотрофов и олиготрофов в мае–июне 2006 г. А – ИСЗ, сахарная свекла; Б – БСЗ, сахарная свекла; В – ИСЗ, фураж; Г – БСЗ, фураж; Д – эродированная почва.

Гармонический анализ подтвердил значимость колебаний численности бактерий во всех участках во всех месячных динамиках на уровне значимости как минимум 0.1 (табл. 1). Также были выявлены гармоники с уровнем значимости 0.05, хотя их число было различно в разные годы. Всего 14 значимых гармоник было выявлено при $P < 0.1$ в мае–июне 2006, 19 в сентябре 2006 г. и 16 в июне–июле 2007 г. Среди них 9, 10 и 2 гармоники соответственно были выявлены при $P < 0.05$.

Характеристики гармоник (номер, период, амплитуда и вклад в дисперсию) при учете КОЕ копиотрофов и олиготрофов не проявляли заметных различий между обрабатываемыми и необрабатываемыми участками и участками с различными культурами. Кроме того, в сентябре 2006 г. и июне–июле 2007 г. не было разницы между участками ИСЗ и БСЗ. Однако в мае–июне 2006 г. и июне–июле 2007 г. была резкая разница в амплитудах колебаний КОЕ копиотрофов и олиготрофов. Колебания численности КОЕ олиготрофов были значительно больше. В сентябре 2006 г. эта разница была менее выражена. В июне–июле 2007 г. гармоники участков БСЗ имели значительно меньший вклад в дисперсию, чем гармоники участков ИСЗ, возможно, по причине наличия негармонической компоненты в реакции на воздействие. Амплитуда гармоник числа КОЕ копиотрофов была примерно в 2 раза больше, чем олиготрофов, что, вероятно, связано с воздействием в форме добавления навоза. В июне–июле 2007 г. вклад гармоник в дисперсию был ниже, чем в предыдущих месячных динамиках (вклад в дисперсию составил от 24 до 63% от общей дисперсии в мае–июне 2006 г., от 20 до 41% в сентябре 2006 г. и от 22 до 29% в июне–июле 2007 г.).

Ежедневная динамика эмиссии CO_2 . В мае–июне 2006 г. (рис. 2А) скорость выделения CO_2 в участках необрабатываемой почвы медленно увеличивалась в течение месячной динамики со средним значением 60 единиц (1 единица = $1 \text{ мг С-CO}_2/\text{м}^2$ в час). Внесение органических удобрений на восьмой день наблюдений привело к заметному увеличению скорости выделения CO_2 в участках БСЗ до 150 единиц и последующим колебаниям с большим размахом. Сразу после оказания нарушающего воздействия имел место первый высокий пик, длящийся 5 дней (8–13 дни наблюдений (д.н.)) и переходящий в меньший пик (13–15 д.н.). Всего после воздействия было 5 хорошо выраженных пиков. Динамика выделения CO_2 после добавления минеральных удобрений в участки ИСЗ имела схожий колебательный характер, однако скорость выделения CO_2 была значительно ниже (до 90 единиц), чем в участках БСЗ, но немного выше, чем в участках эродированной почвы, в которых воздействие за-

ключалось лишь в самом факте отбора образцов газа. Во всех вариантах тип растительности не оказывал заметного влияния.

В сентябре 2006 г. (рис. 2Б) нарушающее воздействие в виде внесения растительных остатков на четвертый день наблюдений привело к значительному увеличению скорости выделения CO_2 до максимума в 100 единиц во всех обрабатываемых участках не зависимо от растительности и системы возделывания почвы. Можно выделить 4 хорошо различимых пика: 2 пика с относительно высокой амплитудой сразу после нарушающего воздействия (5–8 и 8–13 д.н.) и 2 пика с относительно низкой амплитудой во второй части месячной динамики (16–20 и 20–24 д.н.). К концу месячной динамики скорость выделения CO_2 в обрабатываемых участках снизилась до уровня участков эродированной почвы, в которой эмиссия CO_2 оставалась постоянно низкой в течение месячной динамики на уровне 20–25 единиц с небольшими колебаниями.

В июне–июле 2007 (рис. 2В) во всех обрабатываемых участках после оказания нарушающего воздействия (внесение растительных остатков на четвертый день наблюдений) имело место резкое увеличение скорости выделения CO_2 . Воздействие привело к возникновению четких волнообразных колебаний CO_2 с 4 хорошо выраженными пиками. Первые два пика имели период примерно 5 дней (4–10 и 10–16 д.н.), третий – примерно 10 дней (16–24 д.н.). В течение 24 и 25 дней наблюдений хорошо заметно восходящее плечо четвертого пика. Колебания CO_2 имели убывающий тренд в течение месячной динамики. Между участками БСЗ и ИСЗ без внесения удобрений (изучение эффекта последствия) разницы в интенсивности эмиссии CO_2 практически не было. Однако в участках с внесением соответствующих удобрений в апреле 2007 г. амплитуда колебания CO_2 была значительно выше в участках ИСЗ по сравнению с участками БСЗ. Увеличение скорости выделения CO_2 было с 10 до 55 единиц (в 5.5 раз) в участках ИСЗ и с 15 до 40 единиц (в 2.6 раза) в участках БСЗ. Разница была наибольшей для первых двух пиков с постепенным уменьшением или даже полным нивелированием к концу третьего пика. В участках эродированной почвы скорость выделения CO_2 исходно составляла 10 единиц и к концу месячной динамики постепенно снизилась до 2 единиц с небольшими колебаниями, которые, тем не менее, имели тот же характер, что и в обрабатываемых участках.

Анализ микробных сообществ различных возделываемых почв. Для выявления возможных изменений в микробных сообществах различно обрабатываемых почв в разные периоды наблюдений и для выявления особенностей в изменении МС при изучении ежедневной

Таблица 1. Характеристики значимых гармоник фильтрованных и сглаженных данных ежедневной динамики КОЕ копиотрофов и олиготрофов

Переменная	Порядок гармоники*	Амплитуда, КОЕ/г сухой	Фаза, дни	Период, дни	Частота, дни ⁻¹	Вклад в дисперсию, %	F-оценочное	F-критическое при P < 0.1	n
Май— июнь 2006 г.									
ИСЗ, сахарная свекла									
Копиотрофы	3	5.5×10^6	0.68	8.7	0.1154	30.5	3.81	2.53	26
	4	4.99×10^6	0.45	6.5	0.1538	25.1	3.14	2.53	26
Олиготрофы	3	1.98×10^7	0.30	8.7	0.1154	25.6	3.20	2.53	26
	4	2.07×10^7	0.63	6.5	0.1538	28.1	3.52	2.53	26
БСЗ, сахарная свекла									
Копиотрофы	4	7.91×10^7	-0.46	6.5	0.1538	30.1	3.76	2.53	26
Олиготрофы	6	1.99×10^7	1.24	4.3	0.2308	29.5	3.68	2.53	26
ИСЗ, фураж									
Копиотрофы	2	4.32×10^6	8.14	13.0	0.0769	35.4	4.43	2.53	26
	6	3.82×10^6	0.95	4.3	0.2308	27.6	3.45	2.53	26
Олиготрофы	6	1.14×10^7	0.99	4.3	0.2308	25.9	3.23	2.53	26
	7	1.15×10^7	1.65	3.7	0.2692	26.4	3.31	2.53	26
БСЗ, фураж									
Копиотрофы	4	1.10×10^7	-0.88	6.5	0.1538	33.7	4.21	2.53	26
Олиготрофы	2	1.86×10^7	6.24	13.0	0.0769	31.7	3.96	2.53	26
Эродированная почва									
Копиотрофы	3	3.63×10^6	2.27	8.7	0.1154	24.1	3.02	2.53	26
Олиготрофы	6	1.82×10^7	0.58	4.3	0.2308	63.2	7.90	2.53	26
Сентябрь 2006 г.									
ИСЗ, сахарная свекла									
Копиотрофы	6	7.66×10^6	1.83	4.3	0.2308	28.8	3.60	2.53	26
	7	7.28×10^6	0.62	3.7	0.2692	26.1	2.26	2.53	26
	8	7.05×10^6	-0.05	3.3	0.3077	24.5	3.06	2.53	26
Олиготрофы	3	8.51×10^6	3.71	8.7	0.1154	20.8	2.60	2.53	26
	4	1.06×10^7	3.13	6.5	0.1538	32.1	4.01	2.53	26
Главная компонента 1	6	0.119	1.08	4.3	0.2308	41.6	5.20	2.53	26
БСЗ, сахарная свекла									
Копиотрофы	4	7.20×10^6	1.89	6.5	0.1538	26.4	3.30	2.53	26
	6	6.35×10^6	3.12	4.3	0.2308	20.5	2.57	2.53	26
Олиготрофы	2	5.87×10^6	6.33	13.0	0.0769	20.3	2.54	2.53	26
	4	8.00×10^6	2.76	6.5	0.1538	37.7	4.71	2.53	26
Главная компонента 1	6	0.153	1.40	4.3	0.2308	32.0	4.00	2.53	26
ИСЗ, фураж									
Копиотрофы	4	7.86×10^6	0.04	6.5	0.1538	24.7	3.09	2.53	26
	5	7.93×10^6	0.32	5.2	0.1923	25.1	3.14	2.53	26
Олиготрофы	6	1.05×10^7	-0.51	4.3	0.2308	32.9	4.11	2.53	26
	8	9.75×10^6	-0.69	3.3	0.3077	28.5	3.56	2.53	26

Таблица 1. Окончание

Переменная	Порядок гармоник*	Амплитуда, КОЕ/г сухой	Фаза, дни	Период, дни	Частота, дни ⁻¹	Вклад в дисперсию, %	F-оценочное	F-критическое при P < 0.1	n
БСЗ, фураж									
Копиотрофы	2	7.53×10^6	0.77	13.0	0.0769	28.3	3.54	2.53	26
	5	9.31×10^6	0.65	5.2	0.1923	43.2	5.40	2.53	26
Олиготрофы	2	8.93×10^6	0.52	13.0	0.0769	20.8	2.60	2.53	26
Эродированная почва									
Копиотрофы	2	5.08×10^6	2.00	13.0	0.0769	40.6	5.08	2.53	26
	5	4.33×10^6	0.03	5.2	0.1923	29.5	3.69	2.53	26
Олиготрофы	2	1.20×10^7	0.57	13.0	0.0769	31.6	3.95	2.53	26
Июнь–июль 2007г.									
ИЗС, смесь вика-овес-горох									
Копиотрофы	6	3.63×10^6	−1.04	4	0.25	26.29	3.023	2.55	24
Олиготрофы	4	8.51×10^6	1.64	6	0.1667	27.77	3.19	2.55	24
БСЗ, смесь вика-овес-горох									
Копиотрофы	4	3.71×10^6	0.947	6	0.1667	23.39	2.69	2.55	24
	5	4.02×10^6	−0.391	4.8	0.2083	27.45	3.157	2.55	24
	6	3.62×10^6	−1.3	4	0.25	22.34	2.569	2.55	24
ИСЗ, постэффект, смесь вика-овес-горох									
Копиотрофы	5	3.13×10^6	−1.22	4.8	0.2083	22.96	2.64	2.55	24
	6	3.49×10^6	−1.39	4	0.25	28.47	3.27	2.55	24
Олиготрофы	2	1.14×10^7	0.244	12	0.0833	48.8	5.62	2.55	24
БСЗ, постэффект, смесь вика-овес-горох									
Копиотрофы	3	3.27×10^6	2.6	8	0.125	22.24	2.558	2.55	24
	4	3.70×10^6	2.07	6	0.1667	28.6	3.29	2.55	24
Олиготрофы	2	7.97×10^6	0.011	12	0.0833	27.54	3.17	2.55	24
	4	8.29×10^6	1.52	6	0.1667	29.79	3.43	2.55	24
Эродированная почва									
Копиотрофы	2	4.68×10^6	0.858	12	0.0833	25.82	2.969	2.55	24
	4	4.47×10^6	1.63	6	0.1667	23.52	2.705	2.55	24
Олиготрофы	2	1.16×10^7	0.24	12	0.0833	25.14	2.891	2.55	24
	4	1.25×10^7	1.87	6	0.1667	29	3.33	2.55	24

* Гармоники, помеченные курсивом, значимы при $P < 0.05$.

динамики структуры МС, использовались два подхода.

Выборочный ПЦР–ДГГЭ анализ почвенных образцов, отобранных в каждый временной период осуществления месячных динамик исследований. Несколько образцов, отобранных до нарушающих воздействий, сразу после воздействий и в конце месячной динамики из варианта 1 (ИСЗ, свекла), 2 (БСЗ, свекла) и 5 (эродированная почва) были взяты для проведения ДГГЭ анализа.

Были получены гели с ясно видимыми полосами (не приводятся). Всего было получено 20 гелей с различной комбинацией образцов на каждом геле, что позволило проанализировать каждый гель отдельно. При программном анализе было подсчитано число полос в каждом проанализированном образце, их интенсивность и положение на геле (*Rf*). Полосы были сопоставлены в соответствии с их положением на геле и обозначены как операционные таксономические единицы (ОТЕ).

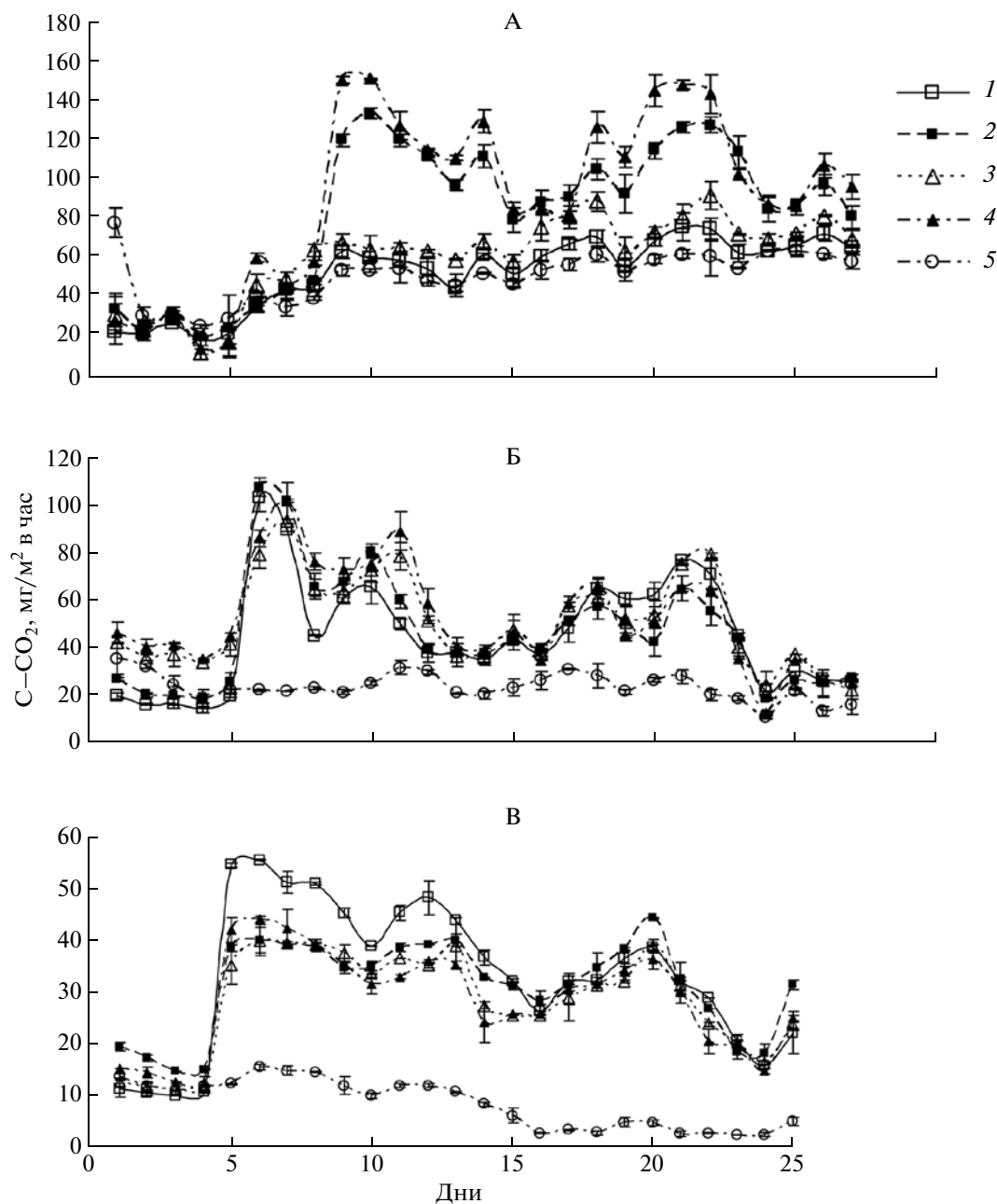


Рис. 2. Ежедневная динамика скорости выделения CO_2 в мае–июне 2006 г. (А), сентябре 2006 г. (Б), июне–июле 2007 г. (В). Для А и Б: 1 – ИСЗ, сахарная свекла; 2 – БСЗ, сахарная свекла; 3 – ИСЗ, фураж; 4 – БСЗ, фураж; 5 – эродированная почва. Для В: 1 – ИСЗ, смесь вика-овес-горох; 2 – БСЗ, смесь вика-овес-горох; 3 – ИСЗ постэффект, смесь вика-овес-горох; 4 – БСЗ постэффект, смесь вика-овес-горох; 5 – эродированная почва.

Таким образом, каждый образец характеризуется наличием или отсутствием каждой ОТЕ со всего геля и ее обилием (интенсивностью полосы). Индекс биоразнообразия Шеннона H' и видовое обилие S (основанное на количестве ОТЕ) для всех месячных динамик приведены в табл. 2. Согласно t -тесту, индекс Шеннона не имел заметных различий в одном и том же участке во времени, между типом обработки почвы и даже в разные сезоны – мае–июне и сентябре 2006 г. (данные не

приводятся). Индекс был в целом ниже в июне–июле 2007 г., а также ниже в участках эродированной почвы, по сравнению с временными периодами сентября 2006 г. и июня–июля 2007 г. Видовое обилие S , напротив, различалось как между различными участками, так и между месячными динамиками. В мае–июне 2006 г. среднее число ОТЕ было выше в участках ИСЗ (115–129) и ниже в участках БСЗ (110–118) и эродированной почве (109–119). В сентябре 2006 г. наибольшее число

Таблица 2. Видовое обилие и индекс биоразнообразия Шеннона почвенного МС, определенные ДГГЭ. Приведены среднее значение, стандартное отклонение и доверительный интервал (погрешность) при $\alpha = 0.05$ для участков ИСЗ, БСЗ и эродированной почвы для каждой месячной динамики

Период обработки	Тип обработки	Видовое обилие, S			Индекс Шеннона, H		
		среднее	стандартное отклонение	погрешность	среднее	стандартное отклонение	погрешность
Май—июнь 2006 г.	ИСЗ	124.2	3.83	2.08	4.02	0.05	0.03
	БСЗ	113.9	2.51	1.37	3.89	0.15	0.08
	Эродированная	114.7	3.04	1.65	4.06	0.17	0.09
Сентябрь 2006 г.	ИСЗ	112.3	5.22	2.84	4.01	0.06	0.03
	БСЗ	97.6	2.93	1.59	4.01	0.06	0.03
	Эродированная	74.5	2.70	1.47	3.41	0.12	0.07
Июнь—июль 2007 г.	ИСЗ	71.8	7.18	4.45	3.81	0.08	0.05
	БСЗ	84.8	4.87	3.02	3.87	0.08	0.05
	Эродированная	90.3	8.45	5.24	3.59	0.20	0.12

ОТЕ было в участках ИСЗ (107–118), меньше в БСЗ (95–102) и наименьшее в эродированной почве (71–81). В июне—июле 2007 г. наибольшее число ОТЕ было в эродированной почве (88–98), меньше в БСЗ (79–93) и наименьшее в ИСЗ (63–82). В целом, заметно лишь постепенное уменьшение числа ОТЕ от первого периода отбора образцов к последнему.

Данные, полученные на каждом геле, были далее проанализированы с помощью анализа главных компонент. Результаты сравнения различных систем обработки почвы (ИСЗ, БСЗ, эродированная) приведены на двухмерных диаграммах (рис. 3). В мае—июне 2006 г. не замечено разницы между участками, хотя несколько участков эродированной почвы имели некоторое отличное от других МС (данные не приведены). В сентябре 2006 г. и июне—июле 2007 образцы обрабатываемой (варианты 1 и 2) и необрабатываемой почвы (вариант 5) были четко разделены на основании первой главной компоненты, и основное различие заключалось в обработке почвы. Вторая главная компонента отразила разницу образцов в пределах каждого варианта. Однако из-за ограниченного числа образцов, использованных для анализа, не удалось четко проследить сукцессию МС, так как полученных результатов было недостаточно для их однозначной интерпретации (данные не приведены).

Ежедневный ПЦР–ДГГЭ анализ всех образцов месячной динамики сентября 2006 г. Все образцы варианта 1 (ИСЗ, свекла) и 2 (БСЗ, свекла) в сентябре 2006 г. (44 образца) были проанализированы с помощью ПЦР–ДГГЭ. Было получено 4 геля с образцами, распределенными между двумя гелями на каждый вариант. В среднем, было обнаружено 105–116 полос в образцах ИСЗ и 90–105 полос в образцах БСЗ. Значения индекса Шеннона были сравнимы с таковыми в табл. 2 и

не менялись значимо на протяжении наблюдений (данные не приведены). Пары гелей проанализировали отдельно с использованием анализа главных компонент. Первая главная компонента имела вклад 60.6% в общую дисперсию для варианта ИСЗ и 38.7% в дисперсию для варианта БСЗ. Двухмерные диаграммы не выявили какого-либо обособленного группирования образцов, отобранных в разные дни месячной динамики (данные не приведены).

Для того, чтобы выявить изменения в структуре МС во времени в течение месячной динамики и чтобы сравнить их с динамикой численности бактерий, был построен график изменения суммарной проекции данных на первую главную компоненту во времени (рис. 4). При этом выявился явный волнообразный характер изменений этого показателя во времени, как в участках ИСЗ, так и в БСЗ. Можно выделить 6 пиков (не менее 4 точек в каждом пике) в каждом варианте, длящихся 4–5 дня. Большинство пиков выявленной динамики визуально совпали во времени с пиками численности КОЕ (возрастая и убывая одновременно), особенно это проявилось для КОЕ копиотрофов.

Для того, чтобы определить статистическую значимость колебаний, динамика проекции данных на первую главную компоненту была подвергнута гармоническому анализу (рис. 5, табл. 1). Для образцов участков ИСЗ и БСЗ были выявлены значимые на уровне $P < 0.05$ шестые гармоники с периодом 4.3 дня и вкладом в дисперсию 41.6% в варианте ИСЗ и 32.0% в варианте БСЗ. Фазы соответствовали 1.08 дней в варианте ИСЗ и 1.40 дней в варианте БСЗ, то есть динамика в варианте ИСЗ имела опережение в 0.32 дня. Значимая шестая гармоника (период 4.3) была также выявлена и в динамике численности КОЕ копио-

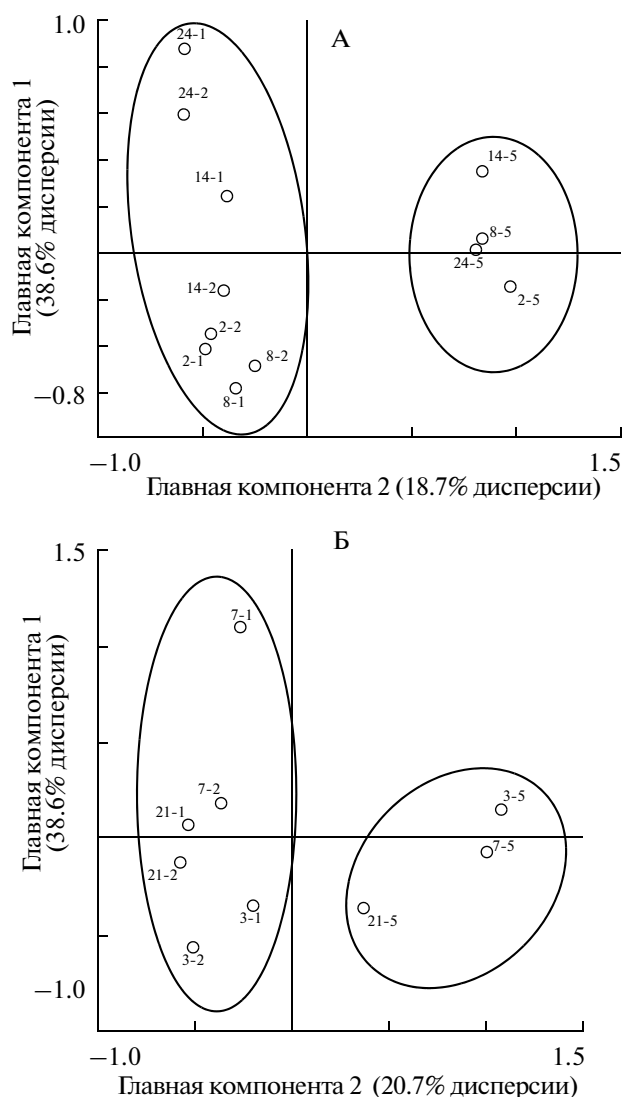


Рис. 3. Диаграмма анализа главных компонент результатов ДГГЭ (первая цифра — день отбора; вторая цифра — вариант), в качестве переменных использованы данные об относительной представленности выявленных на геле видов. А — сентябрь 2006 г., проанализировано 173 вида в 12 образцах, варианты: 1 — ИСЗ, сахарная свекла; 2 — БСЗ, сахарная свекла; 5 — эродированная почва. Б — июнь–июль 2007 г., проанализировано 135 видов в 9 образцах, варианты: 1 — ИСЗ, смесь вика-овес-горох; 2 — БСЗ, смесь вика-овес-горох; 5 — эродированная почва.

трофов в участках ИСЗ (уровень значимости 0.05; фаза 1.83) и БСЗ (уровень значимости 0.1, фаза 3.12).

Согласно кросскорреляционному анализу (табл. 3), проведенному между динамиками первой главной компоненты и численности КОЕ копиотрофов в варианте ИСЗ, значение кросскорреляционной функции (CCF) ($P < 0.05$) было 0.507 с нулевым лагом, что соответствует коэффициенту корреляции Пирсона. Значение CCF

между динамиками численности КОЕ олиготрофов и первой главной компоненты было 0.406 с лагом -3 (то есть динамика численности КОЕ олиготрофов опережала динамику проекции на первую главную компоненту на 3 дня). В варианте БСЗ единственная значимая ($P < 0.05$) кросскорреляция была между динамиками КОЕ олиготрофов и первой главной компоненты, CCF была равна -0.456 с лагом -6 (опережение на 6 дней).

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые волнообразные колебания численности микроорганизмов были выявлены и изучены как закономерное, естественное явление. Ранее колебания численности микроорганизмов выявлялись, но этот факт рассматривался скорее как феномен, как следствие частого отбора образцов и подсчета микроорганизмов [1, 7]. В настоящей работе, напротив, преследовалась цель намеренного выявления колебательной динамики численности и активности микроорганизмов, даже их создания, изучения их различными методами и изучения сукцессии МС после нарушающих воздействий. Было показано, что закономерные волнообразные колебания могут быть созданы и изучены не только в контролируемых лабораторных условиях [41], но и в условиях полевого эксперимента. Настоящее исследование представляет собой первую или одну из первых попыток выявить ранние изменения волнообразной динамики исходно однородных почв, но различно обрабатываемых с целью следования биологической или интенсивной системам земледелия. Исследование является важным шагом в разработке подходов и методов контролирования естественных МС и оценки здоровья почвы.

Был использован комбинированный подход, в котором временная реакция почвенного МС на краткосрочное нарушающее воздействие анализировалась не только отдельно, но также использовалась и для сравнения эффектов различных долгосрочных воздействий. Этот подход основан на представлении о том, что реакция МС на краткосрочные нарушающие воздействия зависит (и, таким образом, может быть изучена, смоделирована и предсказана) от структуры МС и от условий окружающей среды, которые, в свою очередь, формируются под действием долгосрочных воздействий [3].

Учет КОЕ не использовался нами для изучения всего почвенного МС. Напротив, высокоуглеродная среда применялась для учета быстрорастущей, копиотрофной части сообщества, которая, как предполагалось, должна была проявить начальную и наиболее выраженную реакцию на добавление питательных веществ. Низкоуглеродная среда использовалась для учета медленно растущей, олиготрофной части сообщества, которая,

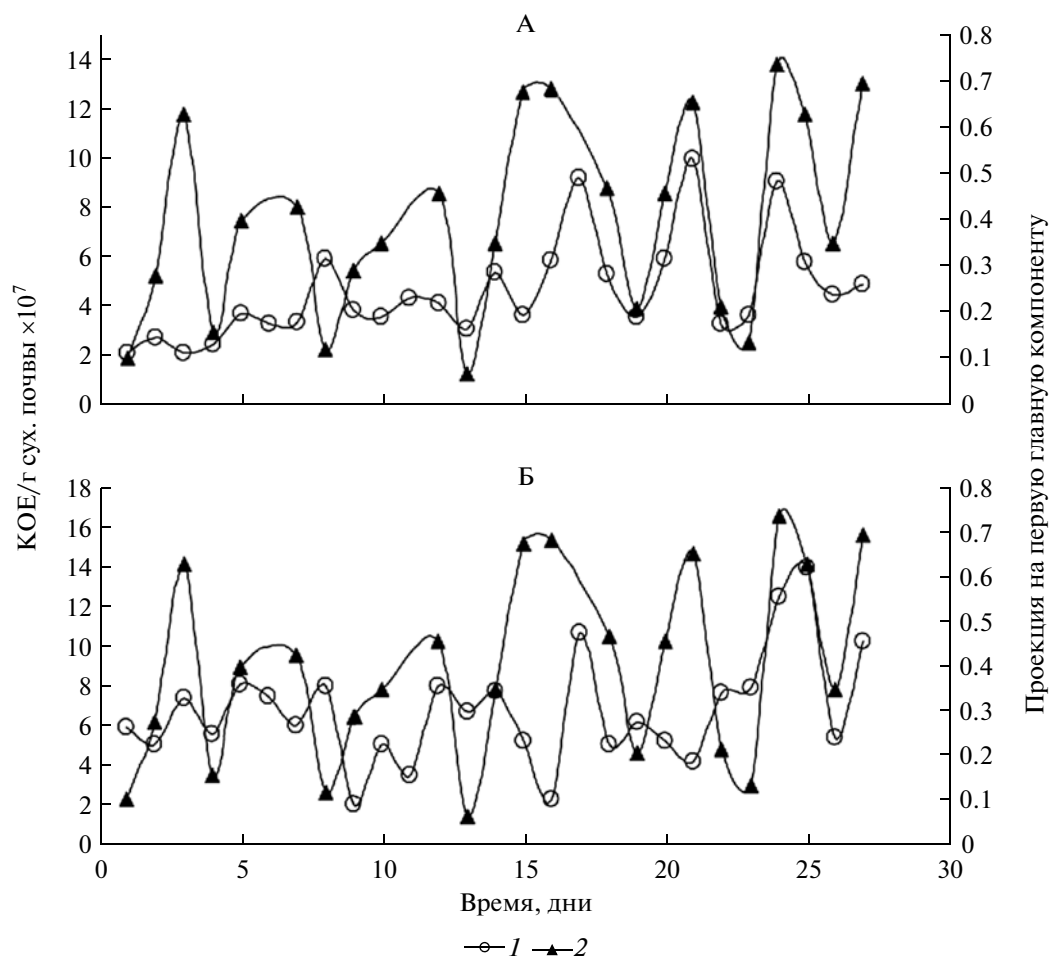


Рис. 4. Ежедневная динамика КОЕ (1) и суммарной проекции данных ДГГЭ на первую главную компоненту (2), полученную при помощи анализа главных компонент результатов ДГГЭ почвенных образцов сентября 2006 г. ИСЗ, сахарная свекла. А – копиотрофы; Б – олиготрофы.

как предполагалось, численно превосходит копиотрофных представителей в естественных МС. В результате, во всех случаях были выявлены выраженные, достоверные колебания численности бактерий, подтвержденные гармоническим анализом, что соответствует представлениям о повсеместности и универсальности колебательного характера развития МС [3].

Ежедневные наблюдения эмиссии CO_2 выявили сильный, ярко выраженный и незамедлительный ответ на нарушающие воздействия. Содержание выделяемого CO_2 резко увеличивалось после оказания воздействий и затем постепенно волнообразно снижалось к концу месячной динамики. Единственное исключение имело место в участках ИСЗ в мае–июне 2006 г., так как наруша-

Таблица 3. Значения кросскорреляционной функции CCF ($P < 0.05$) между динамиками КОЕ копиотрофов и олиготрофов и динамикой суммарной проекции на первую главную компоненту, определенной для участков ИСЗ и БСЗ с сахарной свеклой в сентябре 2006 г.

Участок	Переменная	Копиотрофы		Олиготрофы		Первая главная компонента	
		CCF	Лag	CCF	Лag	CCF	Лag
ИСЗ, сахарная свекла	Копиотрофы	0.44	3	0.585	–7	0.507	0
	Олиготрофы					0.406	–3
БСЗ, сахарная свекла	Копиотрофы			0.544	–6	–0.456	6
	Олиготрофы						

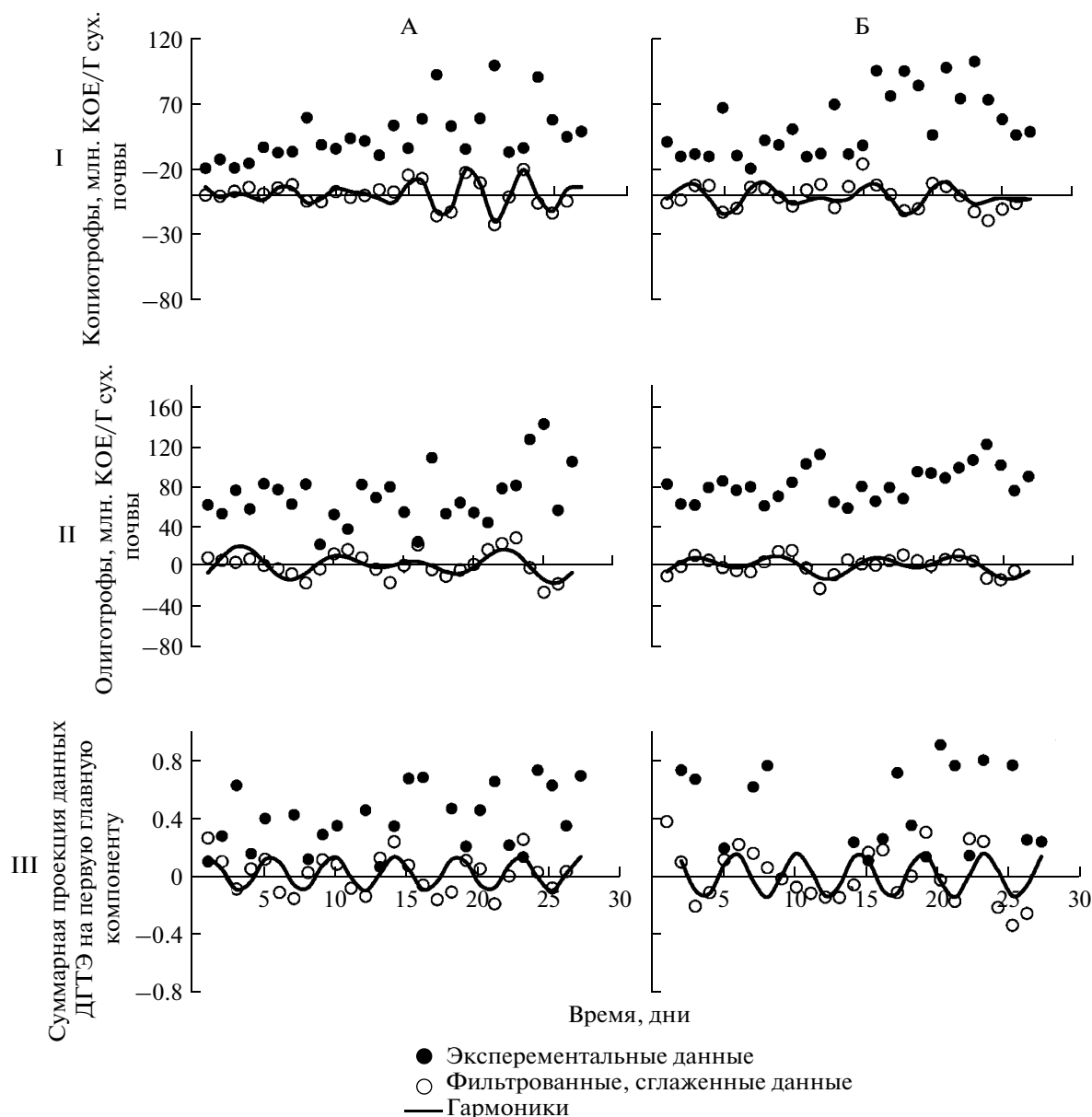


Рис. 5. Гармоники и экспериментальные данные динамики КОЕ копиотрофов (I) и олиготрофов (II) и суммарной проекции данных ДГТЭ на первую главную компоненту (III) в участках ИСЗ (А) и БСЗ (Б) с сахарной свеклой в сентябре 2006 г.

ющее воздействие в этом случае состояло в добавлении минеральных удобрений и гербицида 2,4-D, без органического вещества (рис. 2А). В отличие от динамики численности бактерий, которая, имея колебательный характер, тем не менее проявляла хорошо заметный ответ лишь на добавление значительных количеств органического вещества (май–июнь 2006 г., участки БСЗ), динамика CO_2 проявляла выраженную реакцию как на добавление органических удобрений (май–июнь 2006 г.), так и на внесение растительных остатков (сентябрь 2006 г., июнь–июль 2007 г.). Дыхательный ответ почвы более чувствителен к нарушаю-

щим воздействиям по сравнению с численностью бактерий.

Сравнение динамик выделения CO_2 в различно обрабатываемых почвах (БСЗ и ИСЗ), начиная с постановки эксперимента в 2005 г., выявило постепенное изменение реакции почвенного МС в ответ на краткосрочные воздействия в виде процесса внесения удобрений или растительных остатков, так и на долгосрочные воздействия – применение соответствующих удобрений и гербицида в течение нескольких лет. Конечный результат этого процесса проявился в июне–июле

2007 г., когда волнообразные колебания выделяемого различно обрабатываемых участках почвы CO_2 имели схожие периоды и фазы, но высота их первых пиков различалась в почвах с разной системой обработки (рис. 2В). Такая разница в амплитуде динамики CO_2 между участками БСЗ и ИСЗ согласуется с предложенной ранее гипотезой [32], согласно которой, почва ИСЗ, являясь менее здоровой, обладает меньшим сопротивлением к нарушающим воздействиям, чем почва БСЗ, что и проявляется в различных реакциях МС. В данном случае, меньшее сопротивление воздействиям привело к более высоким откликам в виде эмиссии CO_2 . Это позволяет рассматривать наблюдаемые колебания CO_2 при ежедневных измерениях, вызванные нарушающим воздействием, в качестве перспективного индекса для создания индикатора здоровья почвы [6].

Стоит отметить, что наблюдаемые динамики CO_2 отличались от динамик численности КОЕ по ответу на нарушающие воздействия, числу визуально наблюдаемых пиков, их высоте и длительности. Это может быть связано с тем, что КОЕ отражают лишь численность наиболее активно растущих, гетеротрофных бактерий, в то время как эмиссия CO_2 почвой является кумулятивной метаболической реакцией всего сообщества. С другой стороны, необходимы дополнительные исследования с применением различных воздействий для выявления всесторонних связей динамики численности бактерий и динамики метаболической активности в виде эмиссии CO_2 .

Как уже отмечалось выше, к моменту проведения настоящих исследований ежедневный учет численности КОЕ почвенных бактерий предпринимался неоднократно [1, 7, 41], однако попытки связать ее с изменением состава МС достаточно редки. Ранее была обнаружена связь между пространственными колебаниями численности бактерий (КОЕ и микроскопический учет) вдоль корней растений и изменением структуры МС, определяемой с помощью ПЦР–ДГГЭ и анализа главных компонент [33]. При этом в условиях постоянного нарушающего воздействия (растущий корень) структура МС изменялась в пределах пиков колебаний КОЕ, между восходящим и нисходящим плечами, и не менялась от пика к пику. Однако для неризосферной почвы наличие или отсутствие такой связи установлено не было.

Анализ ДГГЭ позволил получить данные о присутствии или отсутствии тех или иных видов (ОТЕ) и их обилии в образцах почвы. В настоящей работе не ставилась задача идентификации всего таксономического состава почвенного МС и его изменения в течение месячной динамики. Для достижения целей исследования вполне достаточным является лишь анализ ОТЕ, так как такой анализ позволяет получить достаточно ин-

формативные и однозначные результаты, являясь при этом менее трудоемким. Кроме того, стандартная оценка биоразнообразия с помощью индекса Шеннона уже на уровне ОТЕ не выявила различий между типами обработки почвы или выращиваемой растительностью, как и изменений во времени в течение месячной динамики. Так как индекс Шеннона учитывает лишь численность и выраженность ОТЕ в пределах каждого отдельного образца и не учитывает изменение ОТЕ между образцами, ясно, что получение таксономического списка не увеличит значимость полученных результатов. Поэтому был использован анализ главных компонент результатов в виде ОТЕ, учитывающий различия между образцами. Так как получаемые главные компоненты основаны на суммарной вариации каждого ОТЕ между анализированными образцами, то численные значения суммарной проекции данных на главные компоненты могут быть использованы как относительные характеристики структуры МС на пространственной (сравнение различных объектов) или временной шкале (изучение одного объекта во времени).

Был проведен ПЦР–ДГГЭ анализ МС всего ряда почвенных образцов, отобранных в сентябре 2006 г. на основании концепции о нарушающих воздействиях и волнообразном развитии МС [4, 34]. Оказалось, что при сравнении ежедневно отобранных образцов первая главная компонента объясняла достаточно большую долю дисперсии (до 60.6% в варианте ИСЗ), что позволило предположить наличие единого, ярко выраженного характера изменения МС во времени. Исходя из этого, был проведен дальнейший анализ динамики по этой компоненте для того, чтобы описать доминирующий характер сукцессии МС и сравнить его с динамикой КОЕ.

Для этого измерения суммарной проекции данных на первую главную компоненту для каждого образца были отложены на временной шкале и далее из сравнивали с результатами ежедневного учета КОЕ (рис. 4). Оказалось, что полученная динамика имела закономерные колебания во времени с периодом 4–5 дней как в варианте БСЗ, так и ИСЗ. Эти результаты были подвергнуты гармоническому анализу, как это было ранее проделано с динамикой численности КОЕ, и этот анализ подтвердил наличие высоко значимых ($P < 0.05$) колебаний с периодом 4.3 дня в обоих вариантах, что соответствовало визуальным наблюдениям. При этом в варианте ИСЗ колебания по первой главной компоненте достаточно хорошо визуальным совпадали с колебаниями числа КОЕ копийотрофов. Значение изменялось во временной период увеличения численности КОЕ и возвращалось к исходному значению в период уменьшения численности КОЕ. Для подтверждения этого наблюдения был проведен кросскорре-

ляционный анализ, который подтвердил наличие значимой корреляции между суммарной проекцией на первую главную компоненту и динамической численности КОЕ, выявленной на высоко углеродной среде (кросскорреляционная функция была значима ($P < 0.05$) при нулевом лаге с корреляцией $CCF = 0.507$). Более того, для обоих вариантов БСЗ и ИСЗ, как в динамике численности КОЕ копиотрофов, так и в динамике первой главной компоненты, гармонический анализ выявил значимые гармоники шестого порядка (период 4.3 дня) с достаточно небольшими задержками (полученная динамика опережала динамику КОЕ лишь на 0.75 дня в варианте ИСЗ и на 1.72 день в варианте БСЗ), что также подтверждает совпадение этих двух динамик. Можно сделать вывод, что и динамика численности КОЕ копиотрофов (отражающая наиболее активную гетеротрофную часть МС), и динамика суммарной проекции на первую главную компоненту (отражающая основное направление изменения МС) имели схожий волнообразный характер со сравнимым периодом; это видно не только статистически, но и визуальное. Нулевой лаг кросс-корреляции и малая разность фаз значимых гармоник свидетельствуют, что эти колебания совпадали. Таким образом, доминирующие волнообразные изменения структуры МС одинаковым образом происходили в пределах пиков численности КОЕ копиотрофов, но не между пиками. Это соответствует упомянутым выше результатам [35], в которых волнообразная сукцессия МС наблюдалась вдоль корня.

Полученные результаты не означают отсутствия направленной, долгосрочной сукцессии МС во времени. Без сомнения, этот процесс имеет место, однако для его развития и завершения требуется долгосрочное нарушающее воздействие в виде соответствующей обработки почвы, что подтверждается значительным различием структуры МС почв ИСЗ и БСЗ [22, 23, 36]. В то же время в основе долгосрочных изменений структуры сообщества лежит обнаруженная и подтвержденная нами краткосрочная волнообразная сукцессия. В свете полученных наблюдений и результатов, становится ясно, что для анализа краткосрочной сукцессии важно использовать достаточно длительный ежедневный отбор проб из-за существования ярко выраженного волнообразного изменения структуры МС. Недостаточно частый и тем более редкий анализ может привести к значительной недооценке или переоценке не только численности и активности, но и характера сукцессии МС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аристовская Т.В. Микробиология процессов почвообразования // Л.: Наука, 1980. 187 с.
2. Лаврентьева Е.В., Семенов А.М., Зеленов В.В., Чжун Ю., Семенова Е.В., Намсареев Б.Б., Ван Бругген А.Х.К. Ежедневная динамика целлюлазной активности в пахотной почве в зависимости от обработки // Почвоведение. 2009. № 8. С. 1–10.
3. Семенов А.М. Трофическое группирование и динамика развития микробных сообществ в почве и ризосфере. Дис. ... д.б.н. в виде научн. доклада. М., МАКС Пресс, 2005. 66 с.
4. Семенов А.М., Ван Бругген А.Х.К. К методу определения параметра здоровья почвы // Агро XXI. 2011. № 1–3. С. 8–10.
5. Семенов А.М., Ван Бругген А.Х.К., Бубнов И.А., Семенова Е.В. Способ определения параметра здоровья у образцов почвы, компостов и других твердых субстратов. Патент № 2408885. Зарегистр. в Госреестре изобр. РФ 10.01.2011. Заявка № 2009130742. Приоритет 12.08.2009. Положительное решение от 18.08.2010 г.
6. Семенов А.М., Семенов В.М., Ван Бругген А.Х.К. Диагностика здоровья и качества почвы // Агрохимия. 2011. № 12. С. 4–20.
7. Звягинцев Д.Г., Голимбет В.Е. Динамика микробной численности, биомассы и продуктивность микробных сообществ в почвах // Успехи в микробиологии. 1983. № 18. С. 215–231.
8. Bruns M.A., Stephen J.R., Kowalchuk G.A., Prosser J.I., Paul E.A. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in never-tilled, tilled, and successional soils // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65(7). P. 2994–3000.
9. Crecchio C., Gelsomino A., Ambrosoli R., Minati J.L., Ruggiero P. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices // Soil Biol. & Biochem. 2004. V. 36. P. 1873–1883.
10. Drinkwater L.E., Letourneau D.K., Workneh F., van Bruggen A.H.C., Shennan C. Fundamental differences between conventional and organic tomato agroecosystems in California // Ecol. Appl. 1995. V. 5(4). P. 1098–1112.
11. Egli K., Langer C., Siegrist H.-R., Zehnder A.J.B., Wagner M., van der Meer J.R. Population analysis during start-up of nitrification reactors // App. Environ. Microbiol. 2003. V. 69(6). P. 3213–3222.
12. Eichner C.A., Erb R.W., Timmis K.N., Wagner-Döbler I. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community // App. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 102–109.
13. Epelde L., Becerril J.M., Hernandez-Allica J., Barrutia O., Garbisu C. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction // App. Soil Ecol. 2008. V. 39. P. 299–310.
14. Garcia J.P., Wortmann C.S., Mamo M., Drijber R., Tarkalson D. One-time tillage of no-till: effects on nutrients, mycorrhizae, and phosphorus uptake // Agron. J. 2007. V. 99. P. 1093–1103.
15. Gattinger A., Hofle M.G., Schlöter M., Embacher A., Bohme F., Munch J.C., Labrenz M. Traditional cattle manure application determines abundance, diversity

- and activity of methanogenic Archaea in arable European soil // *Environ Microbiol.* 2007. V. 9(3). P. 612–624.
16. Govaerts B., Mezzalama M., Unno Y., Sayre K.D., Luna-Guido M., Vanherck K., Dendooven L., Deckers J. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity // *App. Soil Ecol.* 2007. V. 37. P. 18–30.
 17. Griffiths B.S., Bonkowski M., Roy J., Ritz K. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts // *App. Soil Ecol.* 2001. V. 16. P. 49–61.
 18. Heuer H., Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities / Eds. Elsas J.D. van, Trevors J.T., Wellington E.M.H. *Modern soil microbiology*. N.-Y.: Dekker, 1997. P. 353–373.
 19. Jongman R.H.G., Ter Braak C.J.F., Van Tongeren O.F.R. *Data analysis in community and landscape ecology*. Cambridge Univ. Press, 1995. 306 p.
 20. Kuan H.L., Hallett P.D., Griffiths B.S., Gregory A.S., Watts C.W., Whitmore A.P. The biological and physical stability and resilience of a selection of Scottish soils to stresses // *European J. of Soil Science*. 2007. V. 58. P. 811–821.
 21. Layton A.C., Dionisi H., Kuo H.W., Robinson K.G., Garrett V.M., Meyers A., Sayler G.S. Emergence of competitive dominant ammonia-oxidizing bacterial populations in a full-scale industrial wastewater treatment plant // *Appl. Environ Microbiol.* 2005. V. 71(2). P. 1105–1108.
 22. Mäder P., Fließbach A., Dubois D., Gunst L., Fried P., Niggli U. Soil fertility and biodiversity in organic farming // *Science*. 2002. V. 296. P. 1694–1697.
 23. Mulder C., de Zwart D., van Wijnen H.J., Schouten A.J., Breure A.M. Observational and simulated evidence of ecological shifts within the soil nematode community of agroecosystems under conventional and organic farming // *Funct. Ecol.* 2003. V. 17. P. 516–525.
 24. O'Neill R.V., DeAngelis D.L., Waide J.B., Allen T.F.H. *A hierarchical concept of ecosystems*. Princeton: Princeton University Press, 1986. 263 p.
 25. Orwin K.H., Wardle D.A. Plant species composition effects on belowground properties and the resistance and resilience of the soil microflora to a drying disturbance // *Plant and Soil*. 2005. V. 278. P. 205–221.
 26. Reganold J.P., Glover J.D., Andrews P.K., Hinman H.R. Sustainability of three apple production systems // *Nature*. 2001. V. 410. P. 926–930.
 27. Rosado A.S., Duarte G.R., Seldin L., van Elsas J.D. Genetic diversity of nifH gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments // *Appl. Environ Microbiol.* 1998. V. 64. P. 2770–2779.
 28. Seghers D., Kristof V., Reheul D., Bulcke R., Siciliano S.D., Verstraete W., Top E.M. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil // *Microb. Ecol.* 2003. V. 46(2). P. 139–146.
 29. Semenov A.M., van Bruggen A.H.C., Zelenev V.V. Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat // *Microb Ecol.* 1999. V. 37. P. 116–128.
 30. ter Braak C.J.F., Smilauer P. *CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)*. Ithaca. N.-Y.: Microcomputer Power, 2002. 500 p.
 31. Thornton H.G., Taylor C.B. Short period fluctuations in bacterial numbers in soil // *Trans. Third Intern. Congr. Soil Sci.* 1935. V. 1. P. 175–179.
 32. van Bruggen A.H.C., Semenov A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression // *App. Soil Ecol.* 2000. V. 15. P. 13–24.
 33. van Bruggen A.H.C., Semenov A.M., Zelenev V.V. Wave-like distributions of microbial populations along an artificial root moving through soil // *Microbial Ecology*. 2000. V. 40. P. 250–259.
 34. van Bruggen A.H.C., Semenov A.M., van Diepeningen A.D., de Vos O.J., Blok W.J. Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management // *Europ. J. Plant Pathol.* 2006. V. 115. P. 105–122.
 35. van Diepeningen A.D., de Vos O.J., Zelenev V.V., Semenov A.M., van Bruggen A.H.C. DGGE fragments oscillate with or counter to fluctuations in cultivable bacteria along wheat roots // *Microb Ecol.* 2005. V. 50(4). P. 506–517.
 36. van Diepeningen A.D., de Vos O.J., Korthals G.W., van Bruggen A.H.C. Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils // *App. Soil Ecol.* 2006. V. 31. P. 120–135.
 37. Williamson W.M., Wardle D.A., Yeates G.W. Changes in soil microbial and nematode communities during ecosystem decline across a long-term chronosequence // *Soil Biol. & Biochem.* 2005. V. 37. P. 1289–1301.
 38. Yeates C., Gillings M.R., Davison A.D., Altavilla N., Veal D.A. PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil // *Lett in App Microbiol.* 1997. V. 25. P. 303–307.
 39. Zelenev V.V., van Bruggen A.H.C., Semenov A.M. "BACWAVE", a spatial-temporal model for traveling waves of bacterial populations in response to a moving carbon source in soil // *Microbial Ecology*. 2000. V. 40. P. 260–272.
 40. Zelenev V.V., van Bruggen A.H.C., Semenov A.M. Modeling wave-like dynamics of oligotrophic and copiotrophic bacteria along wheat roots in response to nutrient input from a growing root tip // *Ecol. Model.* 2005. V. 188(2–4). P. 404–417.
 41. Zelenev V.V., van Bruggen A.H.C., Semenov A.M. Short-term Wave-like Dynamics of Bacterial Populations in Response to Nutrient Input from Fresh Plant Residues in Soil // *Microb. Ecol.* 2005. V. 49. P. 83–93.
 42. Zelenev V.V., van Bruggen A.H.C., Leffelaar P.A., Bloem J., Semenov A.M. The simulation model 'BACWAVE-WEB' // *Soil Biol. and Biochem.* 2006. V. 38(7). P. 1690–1711.