

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« 18 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Сукцессия микробоценозов в почвогрунтах разновозрастных отвалов
Бородинского бурогольного разреза

Руководитель	_____	доцент, к.б.н.	Е.Н. Афанасова
Консультант	_____	с.н.с., к.б.н.	А.В. Богородская
Выпускник	_____		Ю.Р. Салимгареева

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. Обзор литературы.....	5
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	14
Глава 3 Годовая динамика параметров функциональной активности ТПО на разновозрастных отвалах Бородинского бурогоугольного разреза	20
Глава 4. Динамика численности и структура эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭКТГМ) в ТПО на разновозрастных отвалах Бородинского бурогоугольного разреза	23
ВЫВОДЫ	26
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	28
ПРИЛОЖЕНИЕ А	31
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	33
ПРИЛОЖЕНИЕ В	35

ВВЕДЕНИЕ

Проблема деградации почв вследствие техногенного нарушения приобретает все более глобальный характер. Особую народно-хозяйственную и экологическую проблему создают постоянно увеличивающиеся территории нарушенных земель, возникающие в связи с интенсивными разработками и добычей полезных ископаемых открытым способом [1]. На месте уничтоженного почвенного покрова создаются так называемые «техногенные» ландшафты, особенности образования и эволюции которых обусловлены спецификой производственной деятельности человека.

Изучение процессов почвообразования в условиях техногенеза является теоретической базой для рекультивации нарушенных земель и возврата их во вторичное использование в народном хозяйстве, а также в целом восстановления нарушенных ландшафтов [1,2].

Бородинский угольный разрез – один из крупнейших в России по объемам добываемого угля, расположен в Красноярском крае, входит в состав СУЭК. На Бородинском разрезе в связи с ведущими направлениями горной рекультивации, особенностями формирования рельефа и почвогрунтов, динамическими процессами, происходящими на отвалах, выделяют три посттехногенных сукцессионных серии: эрозионная, лесная и луговая [3]. На выровненном отвале при отсутствии плодородного слоя почвы (ПСП) формируются благоприятные лесорастительные условия для создания лесных культур, а при гребневом микрорельефе – быстрое естественное заселение древесных пород. Нанесение ПСП на выровненную поверхность отвала применяется для сельскохозяйственной рекультивации, но земли не вовлекаются в такое использование и быстро заселяются сорной растительностью [3].

Поскольку интенсивность почвообразовательных процессов на первых этапах восстановления отвалов определяется микробной колонизацией и ее активным участием в минерализационных и гумификационных процессах, важно изучать сукцессии микробного компонента на отвалах разного возраста с разными способами рекультивации.

Целью работы является: изучение микробоценозов техногенных поверхностных образований (ТПО) разновозрастных отвалов лесной и луговой сукцессионной серии.

Задачи:

1. Определить содержание микробной биомассы и интенсивности базального дыхания в почвогрунтах разновозрастных отвалов под лесной и луговой растительностью.

2. Показать годовую динамику содержания микробной биомассы и интенсивности базального дыхания (по результатам 2016-2017 гг.).

3. Изучить годовую динамику численности эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭКТГМ) в реплантоземах и литостратах на разновозрастных отвалах.

4. Выявить корреляционные взаимосвязи содержания микробной биомассы, базального дыхания и количества разных ЭКТГМ.

Глава 1. Обзор литературы

Почвенные микроорганизмы являются важнейшим компонентом, обладающим очень большим количеством разнообразных функций, которые имеют непосредственное отношение к процессам почвообразования. Почвенные микроорганизмы контролируют потоки углерода и азота, осуществляя важнейшие процессы круговорота: минерализацию органического вещества, иммобилизацию элементов в микробной биомассе, азотфиксацию, нитрификацию, денитрификацию [4]. Кроме того, микробная биомасса является активным агентом разложения растительного материала и ксенобиотиков в почве, трансформации важных элементов (C, N, P, S), иммобилизации тяжелых металлов и сохранения почвенной структуры [5].

Основным свойством молодых техногенных экосистем, отличающим их от экосистем ненарушенных ландшафтов окружающих территорий, является увеличение в ходе сукцессии биомассы почвенных микроорганизмов. При этом более быстрая оборачиваемость, высокая метаболическая активность, а также более значительный вклад микробной биомассы в органическое вещество молодых почвенных образований свидетельствуют об исключительно важной роли почвенных микроорганизмов в структурно-функциональных изменениях экосистем на начальных стадиях сукцессии [6]. В самых общих чертах можно считать, что чем больше масса микроорганизмов, тем активнее идет формирование почвы.

Эволюция экосистем техногенных ландшафтов всегда стадийна и обычно включает несколько этапов, резко изменяющих эдафические условия существования всех компонентов биоты. Микробиоценозы меняют при этом не только свою структуру, но и функциональные проявления и в конечном итоге тип метаболизма молодых почв регенерационных экосистем [7].

Техногенные отвально-карьерные ландшафты под влиянием гипергенных процессов и биогенетической работы всех компонентов биоты в своем развитии обычно проходят три фазы: инициальную, посттехногенную и оптимизации. Они довольно резко отличаются друг от друга по трансформации и миграции минерального субстрата, напряженности физико-химических и биохимических процессов, определяющих смену структуры и функционирование биоты, в том числе и микробных сообществ.

Функциональные проявления микробиоценозов ранних стадий онтогенеза техногенных экосистем имеют ряд черт, не свойственных микробиоценозам более поздних стадий эволюции. Для них характерна высокая численность микроорганизмов и сравнительно низкая биохимическая активность. Это может быть свидетельством того, что на первых порах за счет транспорта из окружающих аборигенных культур и природных ландшафтов идет резкое накопление общей численности микроорганизмов, биохимически же их деятельность селективно сдерживается специфическими свойствами техногенных эдафотопов.

Начало инициальной фазы, характеризуется энергичной техногенной дезинтеграцией вскрышных глубинных пород, их смешиванием, формированием техногенного элювия и ортоэлювия, а так же их гравитационной сортировкой. Поскольку вынесенные в породные отвалы глубинные породы в этот период практически стерильны, его вполне можно принять за нуль-момент формирования микробного ценоза. Его структура и численность в это время полностью обусловлены транспортными процессами. Таким образом, инициальные микробиоценозы на самых начальных этапах онтогенеза развиваются вне сферы влияния других компонентов биоты [7].

Дальнейшее заселение техногенных элювиев породных отвалов микроорганизмами идет за счет микобактерий, спорообразующих и неспорообразующих форм бактерий. При этом микробиоценоз формируется под

прессом жесткого отбора форм, способных выживать в экстремальных условиях обеспеченности влагой и элементами питания (особенно азотом). Поэтому, несмотря на высокую интенсивность транспорта спор и клеток, численность микроорганизмов очень мала.

Таксономический состав микробиоты инициальной стадии очень беден. В нем нет целлюлозоразрушающих микроорганизмов и актиномицетов. Для структуры микробоценозов в данную стадию формирования экосистемы характерно высокое относительное содержание грибов и актиномицетов, со временем оно снижается. Диазо- и олиготрофные цианобактерии, а так же микрофлора рассеяния (грибы и олигонитрофильные бактерии) начинают восстановительную сукцессию на угольных отвалах [7].

Благодаря мицелиарному строению сообщества грибов захватываются и подвергаются биохимической трансформации значительные объемы мелкозема минерального субстрата, создавая тем самым возможность использования многих соединений более требовательными группами микроорганизмов [7].

Для сообществ diaзотрофов, характерна хорошо выраженная способность к физиологической и экологической адаптации. Представители этой группы способны использовать очень широкий круг азот- и углеродсодержащих соединений. Они обладают высокой экологической пластичностью и способностью к азотфиксации в широком диапазоне температур (5-37 градусов Цельсия), концентрации органических веществ (0,05-35% сахарозы), значений рН почвенного раствора (5-11). Эти особенности сообществ diaзотрофов и определяют их общую экологическую стратегию, направленную на формирование устойчивых равновесных популяций, способных функционировать в сложной обстановке техногенных экосистем. Быстрые темпы формирования таких сообществ и их экологические свойства определяют, в свою очередь, высокие скорости развития процесса

азотфиксации. В ходе регенерации отвалов активность азотфиксации непрерывно нарастает [7].

Для микробных ассоциаций инициальной фазы характерен четко выраженный олиготрофный тип питания, связанный с низким уровнем азота и незначительной концентрацией органического вещества [7]. Среди олиготрофных групп микроорганизмов, являющихся доминантными на ранних стадиях сукцессии выделяется группа олигонитрофилов, активно развивающихся в обедненных субстратах [8]. В функциональном отношении они весьма специфичны, еще почти полностью отсутствуют возможности к разложению различных органических соединений (клетчатки, белков и т.д.). Этим они отличны от микробоценозов развитых систем [7].

Следует отметить, что в это время еще не существует четко выраженного микробиологического профиля и распределение микроорганизмов в минеральном субстрате имеет очаговый характер.

Так же большое количество во вскрышной породе окисленных соединений угля способствует развитию форм, которые могут использовать специфические источники углерода [7].

Азотфиксирующей функции микроорганизмов в регенерационных экосистемах принадлежит особенно большая биоценотическая роль. Для функционирования техногенных биогеоценозов очень важно, что процесс азотфиксации начинается, когда растительность практически еще отсутствует. Хотя активность азотфиксации, протекающая на уровне ассоциаций, в которые входят только микроорганизмы, не высока, все же за счет их деятельности вскрышные породы отвалов довольно быстро обогащаются дополнительным азотом, что обеспечивает развитие других компонентов биоты, в частности растений [9]. Появление растений в свою очередь ведет к возникновению новой, весьма важной функции микробоценоза – разлагать клетчатку, в следствие чего в инициальных почвах на отвалах появляются группы

микроорганизмов, деятельность которых заметно активизирует круговорот углерода [7].

Таким образом, осуществляемые инициальным микробоценозом биохимическая трансформация и деструкция минеральных и углистых (органических) частиц мелкозема отвала способствует нарастанию биогеохимической активности экосистемы, включению в биогеоценотическую работу высшей и низшей растительности, с развитием которой связан переход к посттехногенной фазе эволюции карьерноотвальных ландшафтов.

По мере перехода от инициальной фазы эволюции техногенных экосистем к посттехногенной заметно усложняется таксономическая структура микробного ценоза. Таксономическая перестройка микробоценоза является причиной изменения его функциональных проявлений. Уже на самых разных стадиях посттехногенной фазы сильно снижается значение олиготрофного типа питания, что, несомненно, свидетельствует об улучшении азотного режима экосистемы. Повышается численность организмов, совершающих деструкцию азотсодержащих органических веществ.

Усложнение таксономической структуры микробных ассоциаций молодых почв усиливает их функциональные проявления, о чем свидетельствует активизация продуцирования CO_2 в надпочвенной атмосфере. Нарастают потенциальные возможности микробных ассоциаций к переработке метаболитов, типичных для эволюционно зрелых зональных почв, а так же к азотфиксации, что знаменует собой начало нового этапа в эволюции регенерационных экосистем.

Появление на субстратах послеугольных отвалов высшей растительности, ее наземного и корневого опада оказывает большое влияние на формирование микробоценозов, их структуры и функциональную нагрузку в экосистеме.

Увеличение числа микроорганизмов, способных к использованию органических азотсодержащих соединений, приводит к возникновению

процессов аммонификации, в результате чего экосистема улучшает свой азотный режим за счет аммиака, пептидов и аминокислот, появившихся в составе органических веществ молодых почв.

На посттехногенную фазу эволюции изучаемых экосистем приходятся первые стадии дифференциации профиля молодых почв на генетические горизонты, и этот процесс оказывает влияние на перераспределение микроорганизмов по профилю [7].

Уже на 2-й и 3-й год существования регенерационной экосистемы наблюдается проникновение микроорганизмов до глубины 1 м. Таким образом, уже в начале посттехногенной фазы биологическим круговоротом затрагивается довольно мощный слой горной породы. Формируется определенный «микробиологический профиль». Однако он еще очень не устойчив и сильно изменяется во времени.

Распределение микроорганизмов вглубь по профилю влечет за собой расширение ареала воздействия на субстрат биохимических процессов. При этом их напряженность в глубинных слоях иногда не ниже, чем в верхних. По этому признаку рисунок микробиологического профиля молодых почв на отвалах отличается от аналогичного рисунка эволюционно развитых почв, которым не свойственны высокая численность и напряженность микробиологических процессов в глубоких слоях.

Переход от инициальной к посттехногенной фазе эволюции экосистем карьерно-отвальных ландшафтов представляет собой начало первой сукцессии микробиоценоза, коренной перестройки его структуры и функциональной нагрузки. Уже на 2-й 3-ий год формирования регенерационной экосистемы происходят качественные и количественные скачки в развитии микробных ассоциаций и их биогеоценотической работе: от практически стерильного элювия вскрышных пород до возникновения мощных микробных ценозов,

обладающих разнообразными биогеохимическими функциями, обеспечивающими активный биологический круговорот азота и углерода [7].

А.А. Титляновой, Н.А. Афанасьевым, Н.Б. Наумовой изучено формирование биомассы микроорганизмов и особенностей динамического поведения в молодых почвах разного возраста, образующихся на отвалах угольной промышленности. Исследования проводились на КАТЭЖе, в Назаровской котловине (Красноярский край, Назаровский район). Экспериментальный участок расположен в лесостепной зоне котловины около Назаровского углеразреза. Климат Назаровской котловины характеризуется довольно холодной и длинной зимой и коротким теплым летом [8].

Показано, что микробная биомасса в верхнем (0—15-сантиметровом) слое минерального субстрата уже через год после выхода породы на дневную поверхность составляла около 11 мг С/100 г субстрата. За период развития с 1-го по 8-й год биомасса микроорганизмов увеличивалась в среднем по катене практически в 2 раза, достигая 22 мг С/100 г почвы. Следующая стадия сукцессии (8—26 лет) приводит к максимальной по катене биомассе микроорганизмов. Наличие в субстрате растительных остатков может ускорять накопление микробной биомассы приблизительно в 2 раза.

Минимальные значения продукции микробной биомассы за сезон увеличиваются с возрастом отвала. Продукция биомассы в 0—20-сантиметровом слое почвы 26-летнего отвала даже превышает соответствующие значения для лугово-черноземной почвы под остепненным лугом.

Время оборота микробной массы 1—8-летних почв составляет от 1,5 до 2 месяцев; 26-летних — 1,7—3,6; в зрелых почвах ненарушенных экосистем — 4—4,8 месяца. Более быстрый оборот микробной биомассы на самых ранних стадиях почвообразования обусловлен контрастным гидротермическим режимом, дефицитом доступных источников углерода и незначительными

запасами самой биомассы. Короткое время оборота микробного C свидетельствует о том, что биомассой микроорганизмов в инициальную фазу формирования экосистемы в значительной степени ограничивается круговорот химических элементов.

Поток азота из микробомассы увеличивается с возрастом почвы, однако не так быстро, как микробиальный углерод. Так, если по потоку аммонийного азота 1 - 8-летние почвы практически не различаются, то за следующие 18 лет почвообразования этот показатель для слоя почвы 0—20 см увеличивается в 1,4 раза, а для слоя 0—10 см — в 2,4 раза [8].

Биомасса почвенных микроорганизмов на ранних стадиях сукцессии на отвалах угольной промышленности несколько превосходит по метаболической активности биомассу микроорганизмов в почвах ненарушенных экосистем прилегающих территорий, соответствует представлению о том, что в зрелых экосистемах больше численность медленно растущих видов, нежизнеспособных клеток и организмов, потребляющих минимальное количество субстрата.

Более высокая метаболическая активность микробной биомассы наряду с большей скоростью оборота последней в молодых почвах свидетельствует о более высоких энергетических потребностях почвенных микроорганизмов на начальных стадиях сукцессии экосистем. Снижение этих показателей с течением времени отражает на уровне комплекса почвенных микроорганизмов энергетическую оптимизацию экосистемы по мере ее зрелости.

Таким образом, основным свойством молодых техногенных экосистем, отличающим их от экосистем ненарушенных ландшафтов окружающих территорий, является увеличение в ходе сукцессии биомассы почвенных микроорганизмов. При этом более быстрая оборачиваемость, высокая метаболическая активность, а также более значительный вклад микробиальной массы в органическое вещество молодых почвенных образований свидетельствуют об исключительно важной роли почвенных микроорганизмов

в структурно-функциональных изменениях экосистем на начальных стадиях сукцессии [8]

Глава 2. Объекты и методы исследования

Бородинский угольный разрез расположен в пределах Канской котловины, на восточной окраине лесостепной зоны Средней Сибири Площадь месторождения составляет более 4 т. км² [10]. Рельеф представлен волнистой равниной. Климат исследуемой территории - умеренный. Среднее годовое количество осадков 375-400 мм, среднегодовая температура составляет 0.6°C [11].

По почвенно-географическому районированию изучаемая территория относится к Красноярско-Канской подпровинции выщелоченных и обыкновенных черноземов, лугово-черноземных и серых лесных длительносезонномерзлотных почв [12].

Исследования почвенной микробиоты проводились на отвалах различной давности и технологии рекультивации. Были выбраны 8 пробных площадей различного возраста и степени окультуренности и 3 контрольных участка, характеризующих фоновые ценозы данной территории (лес, вершина и средняя части склона луга) (табл. 1).

Техногенные поверхностные образования (ТПО), созданные в результате разработки угля не могут быть предметом генетической почвенной классификации, поскольку в них еще не сформировались генетические горизонты. При анализе ТПО Бородинского разреза использовалась общепринятая систематика техногенных поверхностных образований. В соответствии с классификацией техногенных поверхностных образований (ТПО) отвалов с нанесением плодородного слоя почвы (ПСП) относят к группе квазизёмов, подгруппе реплантозёмов, без нанесения ПСП – к группе натурфабрикатов, подгруппе литострат [13]. Сравнение проводили с зональными почвами Канской лесостепи: серыми лесными (березняк разнотравный) и агрочерноземами (залежный луг).

Таблица 1 – Основные характеристики пробных площадей

№ участка	Возраст отвала, лет	Местоположение по элементам рельефа и экспозиция склона	Тип современной растительности	Тип почвы/ ТПО*	Технология рекультивации**
11	Контроль	Нижняя часть северного склона, 5°	Березняк злаково-травяной	Серые типичные	А
13	Контроль	Южный склон, средняя часть, 10°	Луг разнотравно-злаковый	Агрочернозем глинисто-иллювиальный типичный	А
14	Контроль	Южный склон, верхняя часть, 10°	Луг бобово-разнотравно-злаковый	Агрочернозем глинисто-иллювиальный типичный	А
1	38	Равнинный участок	Березово-осиновый мелкотравный лес	Литостраты	Б
3	34	Средняя часть южного склона отвала, 10°	Сорная растительность с разреженным подростом сосны	Литостраты	Б
19	12	Равнинный участок	Культуры сосны с большими междурядьями, заросшими разнотравьем и облепихой	Литостраты	Б
16	11	Равнинный участок	Культуры сосны и разнотравно-бобовое сообщество	Литостраты	Б
18	14	Равнинный участок	Злаковый пырейно-кострецовый луг	Реплантоземы	В

№ участка	Возраст отвала, лет	Местоположение по элементам рельефа и экспозиция склона	Тип современной растительности	Тип почвы/ ТПО*	Технология рекультивации**
6	33	Равнинный участок	Луг разнотравно-злаковый	Реплантоземы	В
9	11	Равнинный участок	Луг разнотравно-злаковый	Реплантоземы	В
2	38	Равнинный участок	Луг бобово-злаковый разнотравный	Реплантоземы	В

* - по (Классификация..., 2004)
** - технология рекультивации: А – контроль; Б – спланированный отвал без нанесения плодородного слоя почвы (ПСП); В – спланированный отвал с нанесением ПСП

Образцы для микробиологического анализа отбирались из почвенных прикопок стандартным методом в конце вегетативного периода 2016-2017 гг. Образцы почвы отбирались по слоям (0-5 см, 5-10 см). Для анализов использовались свежие образцы, хранившиеся при +5° С не более 2-3 недель [14].

Определяли содержание микробной биомассы ($C_{\text{мик}}$) методом субстрат-индуцированного дыхания СИД [14]. Метод субстрат-индуцированного дыхания (СИД) основан на измерении первоначального максимального выделения CO_2 из почвы, обогащенной глюкозой в интервале не превышающем шести часов. Метод СИД предполагает соблюдение условий, связанных, прежде всего, с количеством внесенной в почву глюкозы, температурой предынкубации (до внесения глюкозы) и инкубации (после внесения глюкозы) почвенного образца. Концентрация глюкозы, обеспечивающая наибольший первоначальный отклик почвенного микробного сообщества в виде

образовавшегося CO_2 , определяется экспериментально для каждого типа почвы и составляет в основном от 1 до 20 мг глюкозы/г почвы. В стеклянные флаконы (250 мл) минеральной смеси (ГМС, мг/мл: глюкоза - 200; K_2HPO_4 - 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 20), герметично закрывали резиновыми пробками и инкубировали при 22°C в течение 3-4 часов, что соответствует лаг-периоду роста микробной популяции. $C_{\text{мик}}$ определяли путем пересчета скорости СИД по формуле (1.1):

$$C_{\text{мик}} (\text{мкг г}^{-1} \text{ почвы}) = (\text{мкл } \text{CO}_2 \text{ г}^{-1} \text{ почвы ч}^{-1}) \times 40.04 + 0.37 \quad (1.1)$$

СИД определяли по разности концентраций CO_2 в начале и в конце инкубации при помощи газового хроматографа Agilent Technologies 6890N (Центр коллективного пользования Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск), снабженного пламенно-ионизационным детектором и метанатором (Hewlett-Packard, США). Во время анализа использовали колонку Supelco 10182004 из нержавеющей стали с внутренним диаметром 3.175 мм и длиной 1828.8 мм. Адсорбент – 80/100 Porapak Q. Рабочие параметры хроматографа Agilent 6890N: температура термостата колонки – 80°C , поток газа-носителя (гелия) – 20 мл мин^{-1} . Режим работы пламенно-ионизационного детектора: температура детектора – 300°C , температура заднего порта – 375°C , поток водорода – 30 мл мин^{-1} , поток воздуха – 400 мл мин^{-1} . Объем вводимой газовой пробы 5 мл.

Базальное (фоновое) дыхание (БД) почвы измеряли по скорости выделения CO_2 почвой за 24 ч ее инкубации при 25°C [15]. Определение CO_2 проводили хроматографически, как описано для определения СИД, только вместо раствора ГМС вносили воду. Интенсивность базального дыхания выражали в $\text{мкг } \text{CO}_2\text{-C г}^{-1} \text{ ч}^{-1}$.

Удельное дыхание микробной биомассы (микробный метаболический коэффициент, $q\text{CO}_2$) рассчитывается как отношение скорости базального дыхания к микробной биомассе: $\text{БД}/C_{\text{мик}} = q\text{CO}_2$ ($\text{мкг } \text{CO}_2\text{-C}/\text{мг С мик в час}$)

[16]. Отношения $BД/C_{\text{мик}}$ – важный индикатор эффективности использования субстрата и, тем самым, микробного стресса [17]. При устойчивом состоянии почвенной системы данный показатель обычно снижен, так как стабильные и развитые почвы выделяют меньше углекислого газа на единицу содержания углерода микробной биомассы, чем молодые или нарушенные. Антропогенные воздействия, а также сукцессионные изменения приводят к повышению значения qCO_2 [17].

Структуру и численность эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭКТГМ) изучали по соотношению количества КОЕ в 1 грамме абсолютно сухой почвы, выросших на разных диагностических средах: на мясо-пептонном агаре (МПА) учитывали аммонификаторов; на крахмало-аммиачном агаре (КАА) – микроорганизмы, использующие минеральные формы азота (прототрофы); на почвенном голодном агаре (ПА) – олиготрофов; на среде Эшби – олигонитрофилов, на нитритной среде (НА)- гумусоразлагающих [14]. Рассчитывали соотношения микроорганизмов, выросших на диагностических средах с органическими и минеральными источниками азота $K_{\text{мин}}=КАА/МПА$, $K_{\text{олиг}}=ПА/МПА$ [18].

Расчет содержания углерода микробной биомассы, базального дыхания и численности ЭКТГМ делали в пересчете на абсолютно сухую почву. Для этого взвешивали пустой бюкс, бюкс с влажной почвой 3-5 г и бюкс с сухой почвой после 8-10 часов высушивания в сушильном шкафу при 105°C. Результат измерений массовой доли углерода микробной биомассы пересчитывали на абсолютно сухую почву по формуле (1.2):

$$C'_{\text{мик}} = C_{\text{мик}} * K, \quad (1.2)$$

где $K= 100/(100-W)$ (1.3)

где W – массовая доля влаги в процентах, измеренная по ГОСТ 28268-89.

$$W=(m_1-m_0/m_0-m)*100 \quad (1.4)$$

где m_1 - масса влажной почвы со стаканчиком и крышкой, г;

m_0 - масса высушенной почвы со стаканчиком и крышкой, г;

m - масса пустого стаканчика с крышкой, г.

Выявляли корреляционные взаимосвязи содержания микробной биомассы, базального дыхания и количества разных ЭКТГМ при доверительной вероятности 95%. Достоверность различий микробиологических показателей разных категорий участков проверялась по критерию Стьюдента ($P=0.05$). При обработке данных использовали статистический пакет программы Microsoft Excel 2007.

Глава 3 Годовая динамика параметров функциональной активности ТПО на разновозрастных отвалах Бородинского бурогоугольного разреза

Годовая динамика содержания углерода микробной биомассы в реплантоземах и литостратах изображена на рис.1.

Среди разновозрастных реплантоземов значительный рост $C_{\text{мик}}$ в верхнем слое 0-5 см обнаружен на самом старом 38-летнем отвале (уч. 2) : с $1647 \text{ мкг С г}^{-1}$ в 2016 году до $2016 \text{ мкг С г}^{-1}$ в 2017, тогда как в верхних слоях 11-14-летних реплантоземах наблюдается незначительное увеличение показателя. Снижение углерода микробной биомассы на 16 % в исследуемый период времени наблюдается на 32-летнем отвале (уч. 6), что сравнимо с его снижением в 0-5 см слое почвы луга (контроль). В нижележащем слое 5-10 см прослеживается тенденция к увеличению показателя, что так же можно сравнить с увеличением в агрочерноземе средней части фонового лугового сообщества (уч. 13).

В течение года как в верхних слоях реплантоземов 0-5 см, так и в нижележащих 5-10 см наблюдается снижение базального дыхания. Значительное снижение показателя произошло в верхнем слое молодого 11-летнего отвала (уч. 9) с $2,1 \text{ CO}_2\text{-С г ч}^{-1}$ в 2016 году до $1,5 \text{ CO}_2\text{-С г ч}^{-1}$ в 2017.

В целом, в верхних слоях разновозрастных реплантоземов значения $C_{\text{мик}}$ и БД сравнимы со значениями данных показателей в агрочерноземе фонового лугового сообщества (уч. 13), но несколько ниже таковых в агрочерноземе вершины луга (уч. 14). В реплантоземе 38-летнего отвала (уч. 2) содержание $C_{\text{мик}}$ и интенсивность БД превышала таковые в фоновых ценозах.

Среди литострат отмечена тенденция снижения содержания $C_{\text{мик}}$ в верхних слоях практически на всех участках в 2017 г., исключая 5 см слой 11-летнего участка, где отмечен незначительный рост $C_{\text{мик}}$. Уровень содержания $C_{\text{мик}}$ в разновозрастных литостратах ниже контрольного на 50-58% в верхних

слоях и на 44-53% в нижних, тогда как в верхнем слое 0-5 см в 38-летнем литострате под березово-осиновым лесом превышает контроль на 40-85% в исследуемые годы, а в нижележащем – сравним с контролем.

В течение года в верхних слоях 0-5 см прослеживается тенденция к увеличению БД в 11-летнем и 33-летнем литостратах, что сравнимо с изменениями в контрольном лесном сообществе (уч. 11). Снижение показателя произошло на 11- и 37-летних литостратах. В слое 5-10 значения БД остаются относительно стабильными.

Таким образом, вариабельность $C_{\text{мик}}$ и БД в литостратах не велика: в слое 0-5 см $C_{\text{мик}}$ достигает 537- 628 мкг С г⁻¹, БД - 1,5-2,7 CO₂-С г ч⁻¹, что ниже уровня контроля на 50-57% для $C_{\text{мик}}$ и 32-62% для БД. Самые высокие, превышающие контроль, показатели отмечены в гумусовом горизонте мертвопокровного осиново-березового насаждения, сформированного на 38-летнем отвале: $C_{\text{мик}}$ 1916 мкг С г⁻¹, БД=4,7 мкг CO₂-Сг⁻¹ ч⁻¹.

Микробный метаболический коэффициент ($q\text{CO}_2$) является важным индикатором эффективности использования субстрата и, тем самым, микробного стресса [15,17]. В устойчивой «зрелой» почвенной экосистеме на поддержание единицы углерода микробной биомассы выделяется меньше CO₂, чем в «юной» или нарушенной, что позволяет оценивать равновесное состояние и устойчивость микробоценоза почвы [21].

Выявлено, что в верхних слоях реплантоземов показатель $q\text{CO}_2$ варьировал от 0,84 до 1,58 мкг CO₂-С мг⁻¹ $C_{\text{мик}}$ ч и практически всегда сравним с контролем (рис. 2). Максимальное снижение $q\text{CO}_2$ (в 1,7 раз) в 2017 г отмечено в 10-летнем реплантоземе (уч. 9), несколько ниже в 13-летнем реплантоземе (уч. 18) и 38-летнем (уч. 2).

В литостратах величина коэффициента qCO_2 в 1,5-2 раза выше, чем в реплантоземах. Максимальных значений за два года она достигла в 11-летнем литострате под культурами сосны (уч. 19) ($5,2-3,3 \text{ мкг } CO_2-C \text{ мг}^{-1}C_{\text{мик}}$ в разных почвенных слоях), что выше на 36 %, чем значения qCO_2 в серой лесной почве контроля и отмечена тенденция к росту qCO_2 в верхнем слое 0-5 см в 2017 г. Также в 35-летнем литострате на склоне с проявлением плоскостной эрозии (уч. 3) значение qCO_2 в 2017 г. выросло на 25% и достигло в 0-5 см слое $3,9 \text{ мкг } CO_2-C \text{ мг}^{-1}C_{\text{мик}}$ ч. В 10-летнем литострате (уч. 16) значение qCO_2 снижается в 2017 г. и сравнимо с контролем. В самом старом 38-летнем литострате под березово-осиновым лесом значения qCO_2 наиболее низкие в течение двух лет ($1,84 \text{ мкг } CO_2-C \text{ мг}^{-1}C_{\text{мик}}$ ч в 2016 году и $2,5- \text{ мкг } CO_2-C \text{ мг}^{-1}C_{\text{мик}}$ ч в 2017). Увеличение значений микробного метаболического коэффициента в верхних слоях литострат, связанное с возрастанием дыхательной активности микрофлоры, объясняется преобладанием R-стратегов в микробных популяциях, которые быстро используют ресурс и нуждаются в большом количестве энергии для поддержания своей биомассы, что подтверждает стрессовое состояние микробоценозов литострат [19,20,8.] Дальнейшее сукцессионное развитие микробоценозов отвалов направлено на преобладание медленно растущих K-стратегов, полнее усваивающих субстрат и энергетический баланс системы выравнивается, что отражается в снижении значений qCO_2 [15].

Глава 4. Динамика численности и структура эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭКТГМ) в ТПО на разновозрастных отвалах Бородинского бурогольного разреза

Динамика численности эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭКТГМ), выросших на разных диагностических средах изображена на рис.3. Самая высокая численность ЭКТГМ среди разновозрастных реплантоземов за исследуемый период отмечена на молодом 11-летнем отвале (уч. 9) : аммонификаторов – 49 млн КОЕ/г, прототрофов – 57 млн КОЕ/г, олиготрофов – 67 млн КОЕ/г, олигонитрофилов – 52 млн КОЕ/г, гумусоразлагающих – 44 млн КОЕ/г. Данные показатели превышают численность ЭКТГМ в агрочерноземе лугового сообщества в середине склона (уч. 13) на 74%, 15%, 41% и 81%, соответственно. Напряженность процессов микробиологической минерализации высока ($K_{\text{мин}}=1,16$), но несколько снижается в 2017г. (рис 4А). Олиготрофность почвы снижена относительно контроля ($K_{\text{олиг}}=1,36$).

В верхнем слое старого 38-летнего реплантозема численность аммонификаторов и олигонитрофилов превышает таковые в контроле, при этом численность гумусоразрушающей микрофлоры несколько ниже. $K_{\text{олиг}}$ и $K_{\text{мин}}$ ниже контроля в 2017 г. (рис. 4А).

Самая низкая численность ЭКТГМ в 2016 г. отмечена в верхнем слое 32-летнего реплантозема (уч. 6), где через год наблюдается тенденция к увеличению численности всех групп микроорганизмов и доминирование олиготрофной и прототрофной микрофлоры, при этом $K_{\text{мин}}$ и $K_{\text{олиг}}$ за два года сравнимы с контролем (рис. 4А). Численность гумусоразрушающих микроорганизмов здесь в 2 раза ниже контроля.

В реплантоземе 14-летнего отвала (уч. 18) численность аммонификаторов и прототрофов снижена относительно контроля, тогда как численность олиготрофных групп высокая, что подтверждается высокими

$K_{\text{олиг}}=2,4-3,18$. Преобладание данной группы микроорганизмов свидетельствует о высокой олиготрофности этого реплантозема. В 2017 г. доминируют гумусоразлагающие микроорганизмы (65 млн КОЕ/г).

В верхнем слое 38-летнего литострата под сформировавшейся лесной растительностью наблюдается самая высокая, превышающая контроль, численность всех ЭКТГМ. Численность гумусоразрушающей микрофлоры достигала 55 млн КОЕ/г, что почти в 3 раза выше, чем в серой лесной почве фонового березняка. $K_{\text{мин}}$ и $K_{\text{олиг}}$ несколько ниже контрольных (рис. 4Б), а в 2017 г. олиготрофность повышена ($K_{\text{олиг}}=1,57$).

В верхнем слое самого молодого литострата (уч. 16) за год значительно повысилась численность аммонификаторов и олиготрофов, что приближает литострат по биогенности к контролю. $K_{\text{мин}}$ свидетельствует об интенсивных микробиологических процессах минерализации органики и недостатке доступного органического вещества в 2016г. $K_{\text{олиг}}= 2,98-3,16$ самые высокие среди литострат и превышают контроль в 2-2,3 раз.

На 12-летнем отвале (уч. 19) под культурами сосны отмечено низкое по сравнению с фоновой лесной почвой содержание ЭКТГМ и преобладание олиготрофной и олигонитрофильной микрофлоры, что связано с недостатком легкоминерализуемых органических веществ и трудноразлагаемым опадом хвойных. $K_{\text{мин}}$ и $K_{\text{олиг}}$ высоки, но отмечена тенденция к их снижению. Численность гумусоразлагающей микрофлоры сравнимо с контролем.

В 34-летнем литострате с плоскостной эрозией отмечено значительное повышение численности ЭКГМ за год, практически сравнимое с контролем в 2017г. Численность гумусоразрушающей микрофлоры в 2,5 раза выше контроля. Напряженность микробиологической минерализации органики высокая ($K_{\text{мин}}=2,67$), олиготрофность в 2017 г. выше контроля в 2 раза $K_{\text{олиг}}=2,36$. Вероятно, в 2017г. не происходило смыва образованной органики с

наклонной поверхности отвала, которую закрепляют корни травянистой и древесной растительности.

Таблица 2 – Зависимость $C_{\text{мик}}$ и БД от численности ЭКТГМ

	Аммонификаторы	Прототрофы	Олиготрофы	Олигонитрофилы
$C_{\text{мик}}$ 2016	0,81	0,41	0,42	0,36
БД 2016	0,56	0,15	0,10	0,26
$C_{\text{мик}}$ 2017	0,76	0,31	0,53	0,34
БД 2017	0,091	-0,37	0,13	0,56

В 2016 году содержание микробной биомассы и базальное дыхание в верхнем слое реплантоземов и литострат имело наиболее тесную корреляцию с численностью аммонификаторов ($C_{\text{мик}} R^2=0,82$, БД $R^2=0,57$). В 2017 году $C_{\text{мик}}$ так же тесно коррелировало с численностью аммонификаторов $R^2 = 0,76$, чуть ниже с численностью олиготрофов $R^2 = 0,54$. БД имело тесную корреляцию с численностью олигонитрофилов $R^2 = 0,57$ и обратную низкую корреляцию с численностью прототрофов $R^2 = -0,37$.

[Изъято 4 страницы]

ВЫВОДЫ

1. Наиболее низкие значения микробной биомассы и базального дыхания, их высокая годовая вариабельность и несбалансированность микробиологических процессов, выраженная в высоких значениях qCO_2 , а также пониженная численность ЭКТГМ и высокая олиготрофность характерна для 10-34-летних литострат. В течение исследованного времени отмечена тенденция к повышению численности ЭКТГМ в верхнем слое литострат, особенно на отвале с развитием эрозии. Наклонная поверхность отвала предопределяет нестабильность почвенно-биологических процессов, смыв органического вещества и тормозит сукцессионное развитие как растительности, так и микробоценоза.

2. На выровненном 38-летнем литострате, представленном мертвопокровным осиново-березовым насаждением, сформировался грубогумусный горизонт мощностью 3 см, с высокой численностью ЭКТГМ, а также максимальными для отвалов значениями микробной биомассы и базального дыхания, значения которых превышают на 85% фоновые серые лесные почвы. При этом микробиологические процессы сбалансированы, значения qCO_2 ниже контроля.

3. Нанесение ПСП на выровненную поверхность отвалов ускоряет сукцессию луговой растительности и развитие микробных комплексов. В верхнем слое реплантоземов разного возраста высоко содержание углерода микробной биомассы, интенсивности БД, а также наблюдается сбалансированность микробиологических процессов и высокая численность ЭКТГМ, не уступающая таковым величинам в агрочерноземе контрольных луговых сообществ. Наибольшее содержание $C_{\text{мик}}$ и БД отмечено в верхнем слое 38-летнего реплантозема, где также отмечена превышающая контроль численность и сравнимая с контролем структура ЭКТГМ.

4. Содержание микробной биомассы и базальное дыхание в верхнем слое реплантоземов и литострат имело наиболее тесную корреляцию с численностью аммонификаторов в разные годы (Смик $R^2 = 0,76-0,82$) БД $R^2 = 0,57$), что указывает на отклик данной группировки к наличию в среде легкоминерализуемой органики и азота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андроханов, В.А. Ускорение процессов рекультивации техногенных ландшафтов на угольных предприятиях КАТЭКа и Хакасии / В.А. Андроханов, А.Т. Лавриненко // Уголь. – 2012 г. – № 7.
2. Бурыкин А.М. Темпы почвообразования в техногенных ландшафтах в связи с их рекультивацией /А.М. Бурыкин // Почвоведение, 1985. № 2. – С. 81-93.
3. Шишкин А. С. Классификация техногенных территорий /А.С. Шишкин // Лесн. таксация и лесоустройство. 2012. № 1 (47). С. 142–148.
4. Макаров М.И. Углерод и азот микробной биомассы в почвах южной тайги при определении разным методами / М.И Макаров, Т. И., Маслов М. Н., Кузнецова Е. Ю., Меняйло О. В.. // Почвоведение, 2016, № 6, с. 733–744 2016 г.
5. Гавриленко Е.Г. /Оценка качества почв разных экосистем (на примере серпуховского и подольского районов Московской области)/ Е.Г. Гавриленко, Н.Д. Ананьева, О.А Макаров // Почвоведение, 2013, № 12, с. 1505–1515.;
6. Курачев В.М. Сукцессии и биологический круговорот / В.М. Курачев / Новосибирск: ВО Наука. Сиб. издательская фирма, 1993.- 157 с.
7. Клевенская И.Л. Сукцессии и функционирование микробоценозов в молодых почвах техногенных экосистем Кузбасса /И.Л. Клевенская, С.С. Трофимов, С.А. Таранов, Е.Р. Кандрашин/ Микробоценозы почв при антропогенном воздействии. – Новосибирск: Наука, 1985.;
8. Титлянова А.А. Сукцессии и биологический круговорот / А.А. Титлянова Н.А. Афанасьев, Н.Б. Наумова / Новосибирск: ВС "Наука". Сибирская издательская фирма, 1993. — 157 с.
9. Клевенская И.Л. Эволюция микробоценозов и их функции / И.Л. Клевенская / Экология и рекультивация техногенных ландшафтов. Новосибирск: Наука. Сиб. Отд-ние, 1992. С. 149-199.

10. Черепнин Л.М. Флора южной части Красноярского края. – Красноярск: Изд-во КГПИ, 1957-1967. – Т.1-6.
11. Научно-прикладной справочник по климату СССР. Серия 3. Многолетние данные. Вып.21. Л.: Гидрометеиздат, 1990. 623 с.
12. Снытко В.А., Почвенно-географическое районирование западного участка КАТЭКа / В.А. Снытко, Ю.М. Семенов, А.В. Мартынов / География и природные ресурсы. – 1982. – №2. – С.32-38.
13. Шишов Л.Л. Классификация и диагностика почв России/ В.Д. Тонконогов, И.И. Лебедева, М.И. Герасимова / Смоленск: Ойкумена, 2004. – 342 с.
14. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. пособие / Д.Г. Звягинцев М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
15. Ананьева Н. Д. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв / Н. Д. Ананьева; Отв. Ред Д. Г. Звягинцев. – М.: Наука, 2003. – 223с.
16. Ананьева, Н. Д. Углерод микробной биомассы и микробное продуцирование двуокси углерода дерново-подзолистыми почвами постагрогенных биогеоценозов и коренных ельников южной тайги / Н. Д. Ананьева, Е. А. Сусьян, И. М. Рыжова, Е. О. Бочарникова, Е. В. Стольникова // Почвоведение, 2011, № 10, с. 1231–1245.
17. Anderson T. H., Domsch K. H. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effect of environmental conditions, such as pH, on the microbial of forest soils // Soil Biol. Biochem. 1993. V. 25. P. 393-395.
18. Андреюк Е. И. Основы экологии почвенных микроорганизмов / Е. И. Андреюк, Е. В. Валагурова / Киев: Наукова думка, 1992. –223с.
19. Таранов С. А. Парцеллярная структура фитоценоза и неоднородность молодых почв техногенных ландшафтов / Е. Р. Кандрашин, Ф. А. Фаткулин, М. Г. Шушуева, И. С. Родынюк // Почвообразование в техногенных ландшафтах. – Новосибирск: Наука, 1979. С. 19–57.

20. Наплекова Н. М. Микробные ценозы техногенных экосистем Сибири / Трофимов С. С., Кандрашин Е. Р., Фаткулин Ф. А., Баранник Л. П. // Техногенные экосистемы: организация и функционирование. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1985. С. 38–69
21. Сусьян Е.А. Углерод микробной биомассы в профиле лесных почв южной тайги / Е.А., Сусьян, Н.Д. Ананьева, Е.Г. Гавриленко и др. // Почвоведение. — 2009.—№10.—С.1233-1240.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Выровненные отвалы при отсутствии плодородного слоя почвы



Участок 16



Участок 19



Участок 3



Участок 1

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Выровненные отвалы с нанесением плодородного слоя почвы



Участок 9



Участок 18



Участок 2

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Контрольные участки



Участок 11



Участок 13


Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

« 18 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

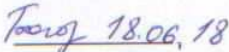
Сукцессия микробоценозов в почвогрунтах разновозрастных отвалов
Бородинского бурогольного разреза

Руководитель

 18.06.18. доцент, к.б.н.
подпись, дата

Е.Н. Афанасова

Консультант

 18.06.18 с.н.с., к.б.н.
подпись, дата

А.В. Богородская

Выпускник

 18.06.18
подпись, дата

Ю.Р. Салимгареева

Красноярск 2018