

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

**Фролов Олег Алексеевич**

**Агрофизические и биологические свойства копролитов червей  
*Aporrectodea caliginosa* и *Lumbricus rubellus***

Специальность 1.5.15 – Экология (биологические науки)

Специальность 4.1.5 – Мелиорация, водное хозяйство и агрофизика  
(биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре физики и мелиорации почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

**Научные руководители:** *Милановский Евгений Юрьевич*, доктор биологических наук, доцент  
*Степанов Алексей Львович*, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** *Холодов Владимир Алексеевич*, доктор сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом биологии и биохимии почв, ФГБНУ ФИЦ Почвенный институт имени В.В. Докучаева.

*Кураков Александр Васильевич*, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой микологии и альгологии, биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

*Мазиров Михаил Арнольдович*, доктор биологических наук, профессор, кафедра земледелия и методики опытного дела, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева».

Защита диссертации состоится 02.04.2024 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.3 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр.12, биологический факультет МГУ, аудитория М2.

E-mail: [paramonovata@my.msu.ru](mailto:paramonovata@my.msu.ru)

Диссертация находится на хранении в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2854>

Автореферат разослан 28 февраля 2024.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.б.н. Парамонова Т.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Функционирование почв напрямую связано с жизнедеятельностью почвенной биоты (Звягинцев и др., 2005; Filser at al., 2016). Дождевые черви являются одними из самых изучаемых представителей почвенной фауны (Тиунов, 2007 и др.; Huang, Xia, 2018; Прусак и др., 2008; Лукина и др., 2020). Необходимо отметить, что при изучении дождевых червей редко уделяется отдельное внимание копролитам, в большинстве экспериментов рассматривается почва или субстрат (где живут черви) и сравнивается с контролем без дождевых червей. Данный подход не позволяет ясно оценить, за счет чего происходят изменения в тех или иных свойствах почвы или субстрата. Не всегда ясно – произошло ли изменение за счет появления растительных остатков на поверхности, их преобразования микроорганизмами, отличия вызваны именно деятельностью дождевых червей и если да, то за счет образования копролитов или, например, перемешивания. Модельные лабораторные эксперименты позволяют изучить копролиты в контролируемых условиях, как самостоятельный объект исследования.

**Цель работы:** комплексное исследование изменений свойств почвы после прохождения через кишечник дождевых червей (*Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus rubellus*) в условиях модельного эксперимента.

### Поставлены задачи:

- Получить комплекс параметров, описывающих свойства копролитов дождевых червей, полученных в модельном эксперименте.
- Определить отличия суточных копролитов дождевых червей *A.caliginosa* и *L.rubellus* от контрольной почвы.
- Установить свойства, статистически достоверно разделяющие копролиты дождевых червей *A.caliginosa* и *L.rubellus*

**Объекты исследования:** Копролиты двух экофизиологических групп дождевых червей (*Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus rubellus*).

**Предмет исследования:** агрофизические и биологические свойства копролитов дождевых червей (*A.caliginosa*, *L.rubellus*).

**Научная новизна.** Проанализированы и предложены характеристики, отличающие копролиты представителей двух разных экологических групп дождевых червей друг от друга и фоновой почвы.

Определение гранулометрического состава исходных копролитов до и после окисления в них органического вещества впервые позволило установить, что в копролитах присутствуют минеральные частицы (размером  $> 100$  мкм), которые не были определены в исходной почве. Установлено, что часть из этих элементарных почвенных частиц (ЭПЧ) образованы из биогенного кремнезема растительных остатков.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты позволяют конкретизировать роль копролитов в преобразования почвы дождевыми червями, что является необходимым условием для формирования моделей, обеспечивающих эффективное использование почвенных экосистем. При интерпретации данных гранулометрического состава и степени дифференциации почвенного профиля по  $\text{SiO}_2$  следует учитывать возможность наличия ЭПЧ биогенного генезиса, отсутствующих в почвообразующей породе.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. В копролитах дождевых червей *A.caliginosa* и *L.rubellus* могут присутствовать ЭПЧ, превышающие по размеру ЭПЧ исходной почвы.
2. При прохождении через кишечник дождевых червей *A.caliginosa* и *L.rubellus* опада листьев клена (*Acer platanoides* L.) в копролитах накапливаются минеральные ЭПЧ биогенного генезиса.
3. Совокупность показателей (гранулометрический и микроагрегатный состав, эстеразная активность, численность бактерий, содержание органического вещества, насыщенность азотом и углеродом) позволяет достоверно различать копролиты эндогеяных (*A.caliginosa*) и

эпигейных (*L.rubellus*) дождевых червей между собой и фоновой почвой при наличии или отсутствии растительного опада.

**Методология исследования** основывается на применении лабораторных инкубационных экспериментов, аналитических методов и статистического анализа результатов по общепринятым методикам.

**Личный вклад автора.** Планирование, постановка и проведение модельных экспериментов. Отбор и идентификация дождевых червей, выполнение большей части анализов, статистическая обработка и интерпретация результатов, написание диссертации и автореферата.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Полученные в диссертации результаты являются оригинальными, их достоверность определяется большим объемом полученных данных, использованием традиционных и современных методов и подходов, корректным использованием статистических методов. Основные результаты были представлены на 4-х конференциях: «Почвоведение: Горизонты будущего» 2018-2020 гг., «2018 Student Conference Life Sciences in the 21st Century: Looking into the Future» 2018 г., Москва.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 4 научные работы. Из них 3 статьи в рецензируемых российских и международных научных журналах, включенных в список Scopus, Web of Science, RSCI. В работе [1] вклад автора составил 0,5 печатных листа (п.л.) из 1 п.л.; в работе [2] 0,7 п.л. из 1,4 п.л.; в работе [3] 1,2 п.л. из 1,9 п.л., в работе [4] 0,3 п.л. из 0,57 п.л.

**Структура и объем работы.**

Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов и заключения, 20 приложений, списка литературы из 247 источников, из которых 165 на иностранных языках. Общий объем диссертации – 223 страницы (из них 75 страниц приложение), диссертация содержит 41 рисунок и 12 таблиц.

**Благодарности**

Выражаю мою глубокую признательность моим учителям Милановскому Е.Ю., Степанову А.Л., Якушеву А.В., а также всем сотрудникам кафедр физики и мелиорации почвы, биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В.Ломоносова. Отдельная благодарность Гольевой А.А. и Салимгареевой О.А. за помощь в проведение электронной микроскопии. Исследование поддержано РФФИ (грант № 19-34-90069).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Современное состояние проблемы исследования**

Состоит из 14 подразделов, в которых приведено описание физических и биологических свойств копролитов дождевых червей. Приводятся литературные данные о гранулометрическом, микроагрегатном составе, удельной поверхности, краевом угле смачиваемости, реологических свойствах, численности бактерий, дегидрогеназной и эстеразной активности в копролитах, накоплении углерода и азота, рассматриваются результаты исследования копролитов комплексным структурно-функциональным методом. Например, по данным А.В. Прусак и др. (2008) в гранулометрическом составе (ГС) (метод лазерной дифракции, образец с органическим веществом (ОВ)) копролитов отмечено увеличение содержания крупных фракций, а в работе Asawalam, Johnson (2007) – их снижение по сравнению с контрольной почвой (ареометрический метод, образец без ОВ). Удельная поверхность копролитов относительно вмещающей почвы как увеличивается (Прусак и др., 2008 (методом газовой хроматографии, сорбция паров воды)), так и уменьшается (Lyttle et al., 2015 (рассчитана для фракции <2 мм с удалением органики в муфельной печи; метод газовой хроматографии по сорбции N<sub>2</sub>)).

В публикациях результаты исследования одноименных свойств копролитов в большинстве случаев получены с использованием разных методов, что приводит к противоречивым и несопоставимым выводам.

Анализ литературных данных свидетельствует, что для интерпретации результатов исследования копролитов необходим комплексный подход с использованием единых методов и процедур подготовки образцов к анализам.

## **Глава 2. Материалы и методы исследования**

### **2.1. Дизайн модельных экспериментов.**

Дождевые черви могут накапливать минеральные частицы и измельчать существующие в почве частицы растительных остатков (Прусак и др., 2008; Georgiadis et al., 2019). Потребление органических частиц и их измельчение, перемешивание в кишечнике вместе с почвой может приводить к изменению содержания органического углерода, азота, изотопов углерода и азота в копролитах. Уменьшение размера частиц увеличивает общую площадь поверхности частиц в копролитах (следовательно, должно быть изменение удельной поверхности). Подобные изменения должны приводить к изменению структуры копролитов относительно исходной почвы (микроагрегатный состав, реологические свойства, угол смачивания твердой фазы). Увеличение площади доступного для микроорганизмов субстрата способствует возрастанию активности и численности микроорганизмов (возрастет количество КОЕ на г почвы, численность клеток, для сообщества микроорганизмов может наблюдаться изменение предельной численности организмов, т.к. потенциальная емкость среды изменится). В свою очередь, измениться должна и функциональная активность микроорганизмов. Её можно оценить по ферментативной активности (одним из хороших показателей активности микроорганизмов являются дегидрогеназная (Kumar et al., 2013; Кожевников, 2016) и эстеразная активность (Adam, Duncan, 2001; Enoch, 2002; El-Tarabily, 2002)).

Для проверки этих предположений проведено 3 эксперимента. Для всех экспериментов отбор суточных копролитов проводился с

поверхности почвы, содержание дождевых червей при температуре 17–22°C и весовой влажности почвы 35–40%.

1. Почва – пахотный горизонт агрочернозема (51°37'17.1"N 36°15'42.0"E). Заложено по одному мезокосму для вариантов: исходная почва; почва с подстилкой из листьев клена (*Acer platanoides* L.); почва с подстилкой и дождевыми червями *Aporrectodea caliginosa* и *Lumbricus rubellus*. I этап (вариант) – оба вида вместе (вес воздушно-сухой (в.с.) почвы в сосуде – 496 г, общий вес червей – 12 г в равных долях). II этап (вариант) – виды червей отдельно (вес в.с. почвы в сосудах с *A.caliginosa* – 470 г, с *L.rubellus* – 370 г, вес червей *A.caliginosa* – 16 г, *L.rubellus* – 18 г). Однократная повторность мезокосмов, продолжительность опыта 6 месяцев.

2. Почва и дождевые черви, как в 1 эксперименте. Заложены мезокосмы с аналогичными первому эксперименту вариантами, за исключением варианта совместного присутствия разных видов дождевых червей в одном мезокосме. Повторность мезокосмов трехкратная. Продолжительность опыта 4 месяца. Вес в.с. почвы в сосудах – 350г. Вес червей в мезокосме – 10 г. Вес опада – 5г.

3. Третий эксперимент проведен для уточнения изменения в изотопном составе, содержание углерода и азота в почве под воздействием прохождения через кишечник эндогеяных дождевых червей. Для эксперимента отобран вид дождевых червей *A.caliginosa*, почва, на которой не росли растения С-4 фотосинтеза и в качестве корма пожнивныe остатки кукурузы. Почва – пахотный горизонт чернозема длительного (с 1947 г.) пара (51°34'12.3"N 36°05'22.6"E). Варианты: исходная почва; почва с подстилкой из пожнивных остатков кукурузы; почва с подстилкой и *A.caliginosa*. Вес в.с. почвы в сосудах – 350г. Вес червей в мезокосме – 10г. Вес пожнивных остатков – 5 г. Повторность мезокосмов трехкратная, продолжительность опыта 5 месяцев.

Отбирались суточные копролиты дождевых червей с поверхности почвы. Для микробиологических анализов копролиты использовались сразу, либо после заморозки. Для остальных исследований использовали воздушно-сухие копролиты.

## **2.2. Методы**

**Содержание углерода, азота и их изотопов** определен в ЦКП «Лаборатория радиоуглеродного датирования и электронной микроскопии» Института географии РАН на CHNS-анализатор-IRMS Vario ISOTOPE select (Elementar, Германия), а также на экспресс-анализаторе углерода АН-7529 (Гомельский завод измерительных приборов, Республика Беларусь). Карбонаты в пахотных горизонтах отсутствуют, и общее содержание углерода соответствует  $C_{орг}$  (Тюгай и др., 2014; Русанов и др., 2015).

**Окисление органического вещества почвы**  $H_2O_2$  проведено по методике, описанной в работе (Eusterhues et al., 2005).

**Гранулометрический состав** определен методом лазерной дифракции на Mastersize 3000E с Hydro EV (Malvern Panalytical) после предварительной ультразвуковой (УЗ) диспергации образцов с энергией 450 Дж/мл (Digital Sonifier S-250D (Branson Ultrasound, США)). Для обсчета данных использована теория Ми с индексом рефракции твердой фаза 1,55, жидкой 1,33 и адсорбции 0,01 (Ozer et al., 2010). Классификация границ гранулометрических фракций по USDA/FAO (мкм): ил (0–2), пыль (мелкая 2–20, крупная 20–50) и песок (очень мелкий 50–100, мелкий 100–250, средний 250–500; крупный 500–1000).

**Микроагрегатный состав** определен методом лазерной дифракции (Mastersize 3000E с Hydro EV (Malvern Panalytical)) при отключенном в процессе измерения ультразвуке. Пробоподготовка согласно работе О.И.Филипповой и др. (2019).

**Анализ морфологии гранулометрических фракций.** После УЗ диспергации и мокрого просеивания образцов копролитов *L.rubellus* и

*A. caliginosa* на ситах 250, 50 мкм отобраны и высушены при 25°C фракции >250, 250-50, <50 мкм и проанализированы на люминесцентном микроскопе «Биомед 6» (фирмы «Биомед», Россия). Электронно-микроскопическое исследование проведено при помощи растрового электронного микроскопа JEOL-6060A лаборатории экологического почвоведения (фирмы “JEOL”, Япония) с вольфрамовым катодом при ускоряющем напряжении 2–5 кВ. Спектр энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) получен при облучении пучков электронов в центре отдельных частиц с ускоряющим напряжением 0–20 кВ и временем счета 50–100 с. Процентное содержание элементов определено с помощью метода рентгенофлуоресцентного анализа (РФА).

**Реологические характеристики** почв и копролитов определены на реометре MCR-302 (Anton Paar, Австрия) с измерительной системой плато-плато методом амплитудной развертки (Хайдапова и др., 2016; Mezger, 2020).

**Определение удельной поверхности твердой фазы** на анализаторе удельной поверхности СОРБОМЕТР-М (ЗАО КАТАКОН, Россия) по низкотемпературной адсорбции/десорбции азота (Шейн и др., 2017).

**Краевой угол смачивания (КУС) поверхности твердой фазы** определен методом статической сидячей капли на цифровом гониометре DSA100 (Krüss, Germany) с фиксацией пробы на мембранном фильтре (Матвеева и др., 2019).

**Численность микроорганизмов (метод посева).** Общая численность культивируемых гетеротрофных аэробных бактерий определена чашечным методом Коха на среде “Rich” – разбавленной глюкозо-пептонно-дрожжевой среде (ГПД).

**Численность микроорганизмов (метод прямой люминесцентной микроскопии).** Окраска акридином оранжевым (Звягинцев, 1991.) и флуоресцеином диацетатом (ФДА) (Chrzanowski, 1984).

**Дегидрогеназная активность.** Применены бесцветные соли тетразолия (2,3,5- трифенилтетразолий хлористый, ТТХ), которые восстанавливаются в красные соединения формазанов (трифенилформаза, ТФФ) (Звягинцев, 1991; Колешко, 1981).

**Эстеразная активность.** Использована реакция гидролиза флуоресцеина диацетата (ФДА) (Schnürer, Rosswall, 1982).

**Анализ кривых роста бактерий** согласно комплексному структурно-функциональному методу (Якушев, 2015) с модификацией перечня субстратов.

### Глава 3. Результаты и обсуждение

**Содержание углерода, азота и их изотопов (эксперимент с опадом клена, рис. 1, 2).** Здесь и далее отличия, обозначенные знаками больше и меньше, значимы по t-критерию. Содержание органического углерода ( $C_{орг}$ , %) уменьшалось в ряду: опад клёна (30,0) >> копролиты *L.rubellus* (5,6) > почва с *L.rubellus* (4,9) > копролиты *A.caliginosa* (4,6); почва с *A.caliginosa* (4,6); > почва с опадом (4,3); почва (4,2). Изотопная подпись ( $\delta^{13}C$ , ‰) изменялась в ряду: опад клёна (-29,1) < копролиты *A.caliginosa* (-26,3); почва с *A.caliginosa* (-26,3); копролиты *L.rubellus* (-26,9); почва с *L.rubellus* (-26,5) < почва с опадом (-25,8); почва (-25,7).

Содержание азота (N, %) уменьшалось в ряду: опад клёна (1,6) >> почва с опадом (0,4); почва с *L.rubellus* (0,4); копролиты *L.rubellus* (0,5); копролиты *A.caliginosa* (0,4); почва с *A.caliginosa* (0,4); почва (0,4). Соотношение углерода к азоту (C/N) возрастало в ряду: опад клёна (19,8) >> копролиты *L.rubellus* (12,0) > почва с *L.rubellus* (10,8); копролиты *A.caliginosa* (10,6); почва с *A.caliginosa* (11,5); почва (10,6) > почва с опадом (9,6). Изотопная подпись ( $\delta^{15}N$ , ‰) увеличивалась в ряду: опад клёна (3) < копролиты *L.rubellus* (4,8); почва с *L.rubellus* (5,0); почва с опадом (4,4); почва (4,5) < копролиты *A.caliginosa* (5,6); почва с *A.caliginosa* (5,6).

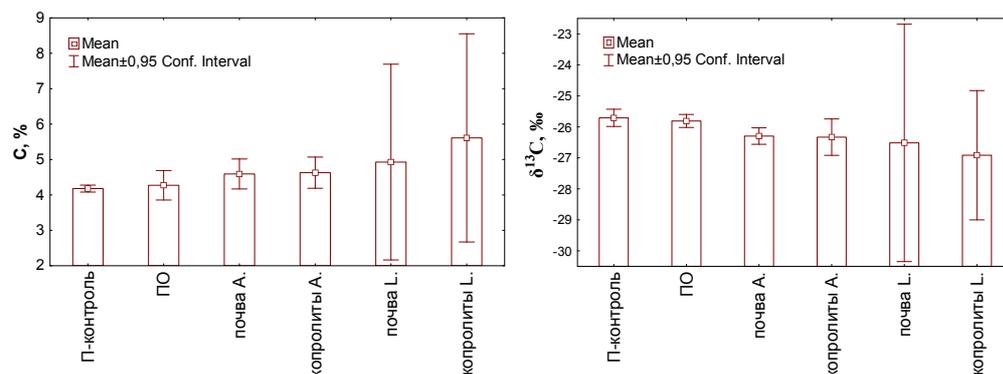


Рисунок 1. Содержание углерода (C, %), изотопа углерода ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) в объектах эксперимента №2. П-контроль – почва; ПО – почва с опадом; копролиты А – копролиты *A. caliginosa*; почва А – почва с *A. caliginosa*; копролиты L – копролиты *L. rubellus*; почва L – почва с *L. rubellus*.

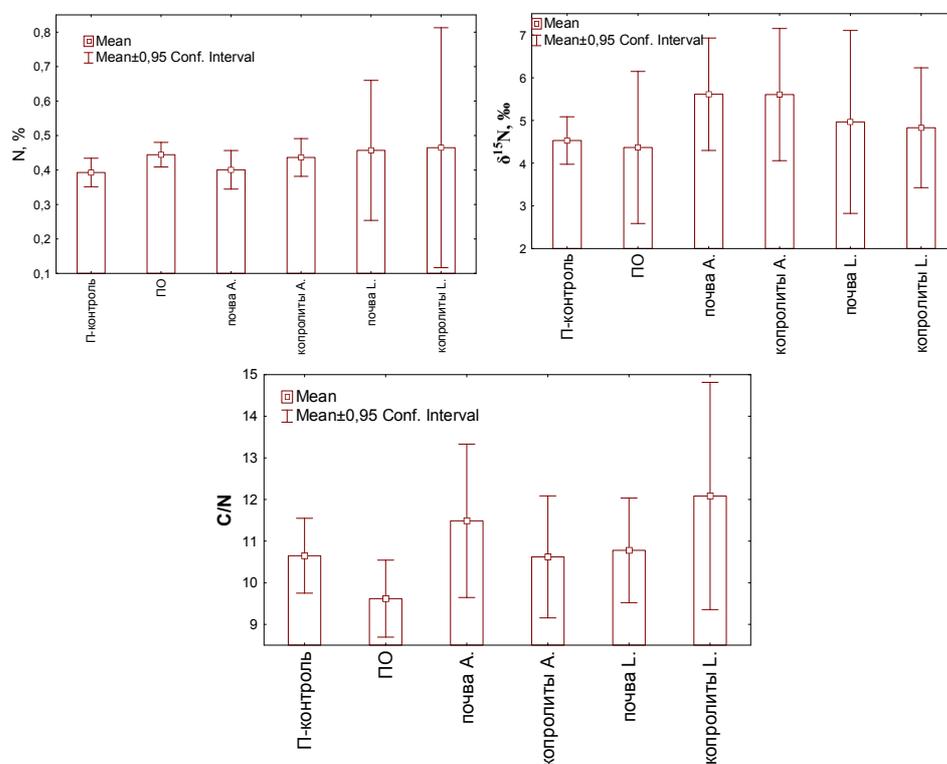


Рисунок 2. Содержание азота (N, %), соотношение углерода к азоту (C/N), изотопа азота ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰) в объектах эксперимента №2. Обозначения как на рис. 1.

**Содержание углерода, азота и их изотопов (эксперимент 3 (с кукурузой); рис. 3, 4).** Содержание  $C_{\text{орг}}$  уменьшалось в ряду: пожнивные остатки кукурузы (ПОК) (33,6)  $\gg$  копролиты *A. caliginosa* (3,7); почва с *A. caliginosa* (3,8)  $>$  почва (3,2); почва с опадом (3,2). Изотопная подпись ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) изменялась в ряду: опад кукурузы (-14,6)  $>$  копролиты *A. caliginosa* (-24,0); почва с *A. caliginosa* (-23,4)  $>$  почва (-25,6); почва с

опадом (-25,5). Содержание азота (N,%) уменьшалось в ряду: пожнивные остатки кукурузы (1,2) >> копролиты *A.caliginosa* (0,4) > почва с опадом (0,3); почва (0,3); почва с *A.caliginosa* (0,3). Соотношение углерода к азоту (C/N) возрастало в ряду: пожнивные остатки кукурузы (35,5) >> почва с *A.caliginosa* (11,9) > копролиты *A.caliginosa* (10,3); почва с ПОК (9,7); почва (10,1). Изотопная подпись ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰) увеличивалась в ряду: пожнивные остатки кукурузы (-2,2) < почва с ПОК (3,3) < копролиты *A.caliginosa* (4,8); почва с *A.caliginosa* (5,4); почва (4,7).

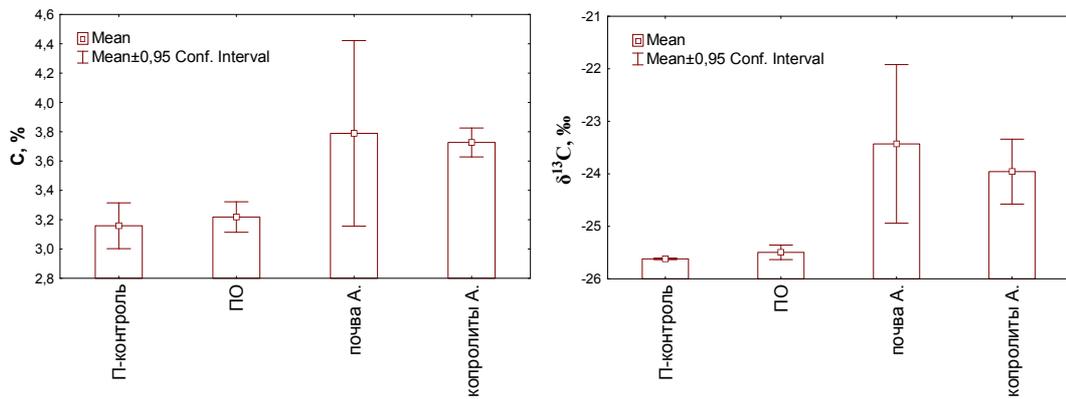


Рисунок 3. Содержание углерода (C,%), изотопа углерода ( $\delta^{13}\text{C}$ ,‰) в объектах эксперимента №3. П-контроль – почва; ПО – почва с пожнивными остатками кукурузы; А – копролиты *A.caliginosa*; почва А – почва с *A.caliginosa*.

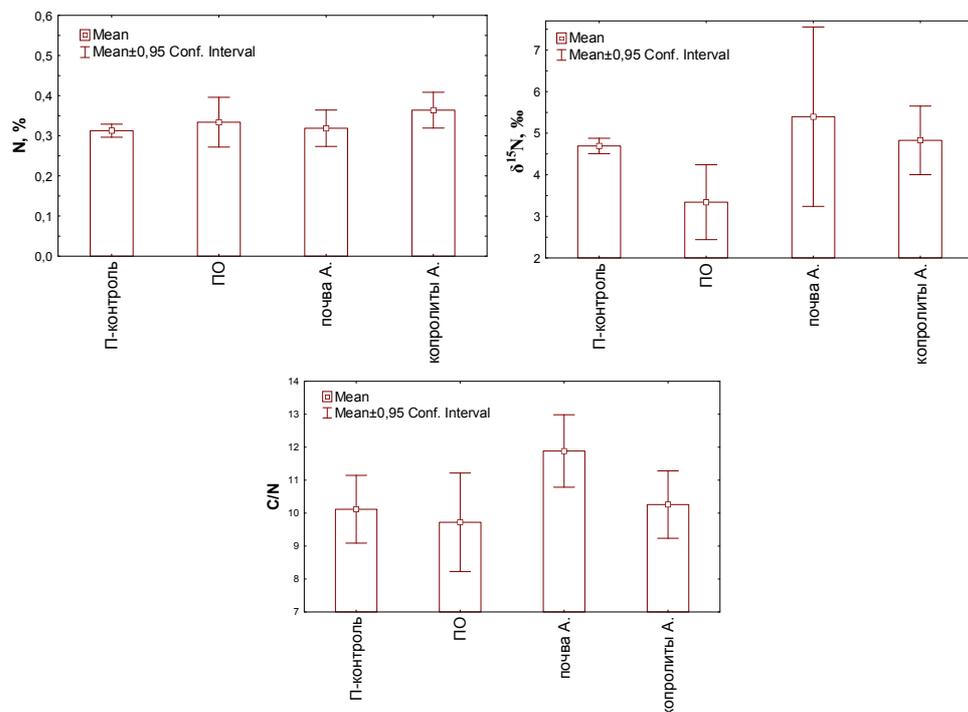


Рисунок 4. Содержание азота (N,%), соотношение углерода к азоту (C/N), изотопная подпись азота ( $\delta^{15}\text{N}$ ,‰) в объектах эксперимента №3. Обозначения как на рис.3.

Проведенные исследования показали возрастание содержания углерода во всех копролитах по сравнению с контролем, что согласуется с литературными данными (Brown et al., 2000; Lavelle, Spain, 2001; Schmidt et al., 2011). В копролитах увеличивалось количество органических частиц разного размера (на это указывает эксперименты с изотопом  $^{13}\text{C}$ , а также увеличение  $\%C_{\text{орг}}$ ). Полученные результаты косвенным образом согласуются с работой (Шиленкова, Тиунов, 2014), где было показано, что доля ассимилированного углерода в тканях почвенных червей составляет менее 10% углерода из опада. Большее значение  $\delta^{15}\text{N}$  в копролитах *A. caliginosa* чем в копролитах *L. rubellus* связано с принадлежностью разным морфо-экологическим группам (Гераськина, 2020).

**Гранулометрический состав (ГС).** Общей закономерностью изменения содержания гранулометрических фракций ила, мелкой пыли и мелкого песка в образцах почвы и копролитов (после окисления в них почвенного органического вещества (ПОВ)) является снижение относительного содержания данных фракций в ГС (таблица. 1). Исключение составляют ЭПЧ размером 2–20 мкм в составе копролитов *L. rubellus*, содержание которых достоверно увеличивается с 49.1 до 53.4% после окисления ОВ пероксидом водорода. При низком относительном содержании фракций песка размером 100 – 250, 250 – 500 и 500 – 1000 мкм, для них четко прослеживается тенденция к снижению концентрации частиц после удаления ОВ. Необходимо отметить, что максимальный размер частиц (при очень низком содержании) в контрольной почве составляет меньше 250 мкм. Однако в образцах копролитов и почве из варианта «подстилка-почва» достоверно присутствуют ЭПЧ большего размера, как в исходных образцах, так и прошедших обработку  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Таблица 1. Сравнение средних % содержания гранулометрических фракций по У-критерию Манна-Уитни, где  $p$  – вероятность справедливости гипотезы о том, что сравниваемые средние значения не различаются.  $p^1$  – сравнение с копролитами *A.caliginosa*,  $p^2$  – сравнение с копролитами *L.rubellus*.\*

Фракция	Окисление ОВ	копролиты	копролиты		Опад и почва			Почва		
		<i>A. caliginosa</i>	Среднее	$p^1$	Среднее	$p^1$	$p^2$	среднее	$p^1$	$p^2$
0-2	до	18,8	14,6	0	18,2	0,	0	20,4	0	0
	после	12,3	11,8	0	12,3	0	0	12,5	0,0	0
2-20	до	53,3	49,1	0	54,0	0,	0	55,0	0	0
	после	49,7	53,4	0,23	49,1	0,	0,98	49,6	0	0,4
20-50	до	21,9	21,7	0	21,8	0,	0	21,4	0,0	0
	после	30,7	30,0	0,28	31,1	0,	0,03	31,5	0,0	0,0
50-100	до	4,3	6,6	0	4,9	0,	0	3,2	0,0	0
	после	6,4	4,4	0,28	7,3	0,	0,03	6,5	0,0	0,0
100-250	до	1,1	4,7	0	0,9	0,	0	0,0	0,0	0
	после	0,5	0,4	0,55	0,2	0,	0,86	0,0	0,0	0,0
250-500	до	0,4	2,2	0	0,1	0,	0	0,0	0,0	0
	после	0,4	0,0	0,21	0,1	0,	0,93	0,0	0	0,0
500-1000	до	0,2	1,0	0	0,0	0,	0	0,0	0	0
	после	0,1	0,0	0,03	0,0	0	1	0,0	0	1

\*Жирный шрифт - достоверно различающиеся пары при  $p < 0,05$

В копролитах *A.caliginosa* и *L.rubellus* существенно увеличивается доля крупных (>100 мкм) частиц. Отличия в ГС с удалением ПОВ вызвано преобразованием опада микроорганизмами и дождевыми червям, внесением фитоцитов в почву. После окисления  $H_2O_2$  органических частиц > 100 мкм, освобождаются присутствующие в них минеральные частицы, фитоциты, которые в зависимости от своего размера попадают в разные гранулометрические фракции. Отличие в ГС копролитов *A.caliginosa* и *L.rubellus* объясняется разными эколого-физиологическими группами. Подстилочные черви *L.rubellus* сильнее, чем почвенные черви *A.caliginosa* преобразуют растительные остатки. Возможно, с разрушением сочлененных фитоцитов в кишечнике *L.rubellus* связано увеличение частиц тонкой пыли в ГС<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>.

**Морфология гранулометрических фракций.** Результаты микроскопических исследований показали, что частицы  $>50$  мкм в ГС исходных образцов копролитов обусловлены в основном органическими частицами из подстилки, преобразуемой дождевыми червями. Фитолиты из листьев клёна сохранялись при прохождении через кишечник дождевых червей, образуя аморфные скопления в копролитах *L.rubellus* и *A.caliginosa*. Согласно результатам ЭДС аморфные структуры состоят из оксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ) с примесью других оксидов ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{FeO}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ). Обнаруженные в ГС копролитов после окисления органического вещества ЭПЧ  $>100$  мкм связаны с наличием окатанных минеральных частиц и биогенного кремнезема (фитолитов), находящихся исходно в составе листьев клена.

**Микроагрегатный состав.** Микроагрегаты в составе почвы и почвы с опадом представлены в основном двумя фракциями с диаметрами частиц преимущественно 15-30 мкм и 100-200 мкм. Диаметр частиц фракции микроагрегатов (15-30 мкм) сохранялся во всех вариантах почв и копролитов с увеличением доли для копролитов и почвы с червями относительно контроля. Фракция микроагрегатов (100-200 мкм) характерна только для контрольной почвы и почвы с опадом. В эксперименте наблюдалось уменьшение размеров микроагрегатов исходной почвы при прохождении через кишечник дождевых червей, увеличивалась доля меньших микроагрегатов относительно больших. Изменения затрагивали весь диапазон (неизменной оставалась в копролитах фракция 500-1000 мкм). Для *L.rubellus* происходило увеличение доли микроагрегатов во фракциях  $>2$ ; 2-20 мкм и уменьшение во фракциях 20-50; 50-100; 100-250; 250-500 мкм. Для *A.caliginosa* происходило увеличение доли микроагрегатов во фракциях 20-50; 50-100 мкм и уменьшение во фракциях 100-250; 250-500 мкм.

**Удельная поверхность.** Удельная поверхность (УП) увеличивалась в ряду: исходная почва ( $1,6 \text{ м}^2/\text{г}$ ) < исходная почва с опадом ( $2,3 \text{ м}^2/\text{г}$ ); копролиты *L.rubellus* ( $2,3 \text{ м}^2/\text{г}$ ) < копролиты *A.caliginosa* ( $2,7 \text{ м}^2/\text{г}$ ) < почва *A.caliginosa* ( $4,9 \text{ м}^2/\text{г}$ ) < почва *L.rubellus* ( $7,0 \text{ м}^2/\text{г}$ ) (рис. 5).

В копролитах увеличивалось количество органических частиц разного размера (на это указывает эксперименты с изотопом углерода, а также увеличение  $C_{\text{орг}}$ , подтверждается визуально при микроскопировании). Отмечается, что с ростом  $C_{\text{орг}}$  площадь удельной поверхности по  $N_2$  обычно снижается (Bartoli et al., 2007 и др.; Zhu et al., 2013). В нашем случае этого не происходило. Причиной этого может быть то, что в копролитах появляются органоминеральные комплексы, а также фитолиты из листьев клёна (Ge et al., 2020). Увеличение удельной поверхности в почве, где жили дождевые черви, связано с избирательным поглощением, концентрацией минеральных частиц в копролитах (на это указывают данные ГС анализа, результаты электронной микроскопии).

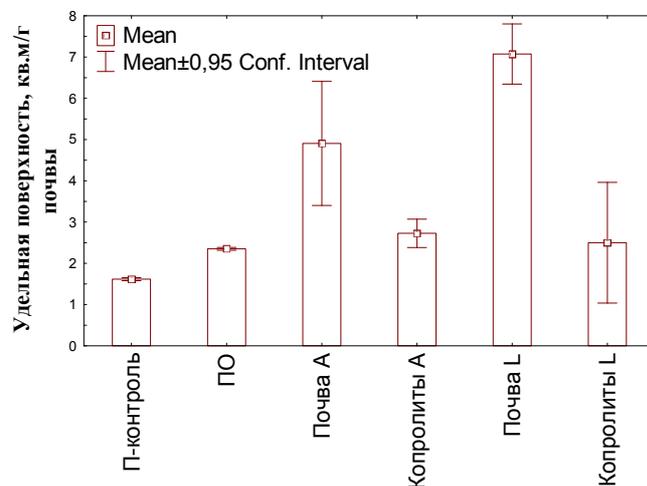


Рисунок 5. Удельная поверхность почвы и копролитов. Обозначения как на рис. 1.

**Краевой угол смачивания.** Смачиваемость водой поверхности твердой фазы (ТФ) возрастает в ряду: опад клёна  $138 \pm 3 \ll$  копролиты *A.caliginosa*  $42 \pm 1^\circ$ ; исходная почва  $44^\circ \pm 1^\circ$  < исходная почва с опадом  $46^\circ \pm 2^\circ$ ; копролиты *L.rubellus*  $48^\circ \pm 1^\circ$ . Краевой угол копролитов *A.caliginosa* не отличается от исходной почвы ( $p = 0,087$ , сравнение по t-

критерию), но отличается от почвы с опадом ( $p=0,013$ ), копролиты *L.rubellus* не отличается от почвы с опадом ( $p=0,107$ ), но отличается от исходной почвы ( $p=0,001$ ).

Исходный опад листьев клёна обладает гидрофобной поверхностью (КУС  $138\pm 3^\circ$ ), а КУС исходной почвы  $44^\circ\pm 1$ . Небольшое снижение смачиваемости ТФ почвы с опадом может обуславливать сорбция водорастворимых органических соединений, поступающих в почву из подстилки. Для копролитов отличия в смачиваемости ТФ определяются количеством потребленного опада, степенью преобразования органических остатков при прохождении через кишечник. Преобразование дождевыми червями опада видоспецифично, что подтверждается данными гранулометрического анализа до и после окисления ОВ, а также содержанием  $C_{орг}$  и его изотопов. Именно с этим связана отмеченная в литературе (Осадчий, 2017 и др.; Le Mer et al., 2021) вариабельность значений КУС для разных видов дождевых червей.

**Реологические параметры.** Наличие опада (по сравнению с вариантом исходная почва) оказывает влияние на изменение модуля накопления [Pa] (с  $2,5\pm 0,1\cdot 10^5$  до  $2\pm 0,2\cdot 10^5$ ) и предела пластичной деформации [%] (с  $1,5\pm 0,1$  до  $1,7\pm 0,2$ ). По сравнению с контрольной почвой в копролитах *L.rubellus* увеличивается LVE-range [%] (с  $6,5\pm 0,4\cdot 10^{-3}$  до  $7,2\pm 0,0\cdot 10^{-3}$ ) и уменьшаются LVE-range в копролитах *A.caliginosa* (с  $6,5\pm 0,4\cdot 10^{-3}$  до  $5,7\pm 0,4\cdot 10^{-3}$ ) и модуль потерь [Pa] (с  $3,3\pm 0,1\cdot 10^4$  до  $3,1\pm 0,1\cdot 10^4$ ). От почвы с опадом отличаются копролиты L по LVE-range (с  $9,0\pm 2\cdot 10^{-3}$  до  $7,2\pm 0,0\cdot 10^{-3}$ ), по модулю накопления (с  $2,0\pm 0,2\cdot 10^5$  до  $1,8\pm 0,1\cdot 10^5$ ), по модуль потерь (с  $2,3\pm 0,3\cdot 10^4$  до  $2,7\pm 0,1\cdot 10^4$ ) и пределу пластичной деформации (с  $1,7\pm 0,2$  до  $2,2\pm 0,0$ ). От почвы с опадом отличаются копролиты A по модулю накопления (с  $2,0\pm 0,2\cdot 10^5$  до  $2,2\pm 0,1\cdot 10^5$ ), по модуль потерь (с  $2,3\pm 0,3\cdot 10^4$  до  $3,1\pm 0,1\cdot 10^4$ ) и пределу пластичной деформации (с  $1,7\pm 0,2$  до  $2,1\pm 0,2$ ). Между собой копролиты L и A отличаются по модулю потерь (*A.caliginosa* ( $3,1\pm 0,1\cdot 10^4$ ) и *L.rubellus*

( $2,7 \pm 0,1 \cdot 10^4$ ); пределу пластичной деформации (*A.caliginosa* ( $2,1 \pm 0,2$ ) и *L.rubellus* ( $2,2 \pm 0,0$ )). Почва с L не отличается от копролитов L. Почва A отличается от копролитов A по LVE–range (почва A ( $6,5 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ ) и *A.caliginosa* ( $5,7 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ )), по модулю накопления (почва A ( $2,3 \pm 0,1 \cdot 10^5$ ) и *A.caliginosa* ( $2,2 \pm 0,1 \cdot 10^5$ )), по модуль потерь (почва A ( $2,9 \pm 0,1 \cdot 10^4$ ) и *A.caliginosa* ( $3,1 \pm 0,1 \cdot 10^4$ )).

Копролиты характеризуются большим значением предела пластичной деформации и меньшими значениями модуля накопления по сравнению с исходной почвой. Как показано в работе В.В.Клюевой (2019), значение модуля накопления в диапазоне линейной вязкоупругости при малых амплитудах характеризует жесткость межчастичных связей в образце. При прохождении через кишечник дождевого червя в почве уменьшается жесткость межчастичных связей, что приводит к уменьшению значения модуля накопления в копролитах. Увеличение предела пластичной деформации свидетельствует о том, что общая устойчивость к деформации у копролитов выше, в то время как почвенные образцы более хрупкие. Одним из ключевых факторов, влияющих на увеличение предела пластичной деформации, является органическое вещество почвы (Клюева, 2019). Копролиты разных видов дождевых червей имеют схожие реологические свойства. Из реологических характеристик объекты лучше всего разделяет согласно анализу МГК (корреляция -0,69) параметр – предел пластичной деформации.

**Численность бактерий** методом прямой люминесцентной микроскопии показывает, что уменьшение происходит в ряду: копролиты *L.rubellus* ( $1 \cdot 10^9$  кл/г почвы) > копролиты *A.caliginosa* ( $3,4 \cdot 10^8$ ) > исходная почва ( $1,9 \cdot 10^8$ ); исходная почва с опадом ( $2,3 \cdot 10^8$ ). Оценка методом Коха показывает аналогичную тенденцию. Увеличение численности бактерий согласуется с литературными данными (Schmidt et al., 1997 и др.; Бызов, 2005), где указывается возрастание численности микроорганизмов в

копролитах, а также отмечается, что увеличение может составлять от 2-х кратного и до увеличения на порядок.

### Ферментативная активность

**Дегидрогеназная активность** повышалась в копролитах, о чем свидетельствовало накопление трифенилформазана (тфф). Копролиты *A.caliginosa* (0,08[мг тфф/г в стуки]); копролиты *L.rubellus* (0,08[мг тфф/г в стуки])) < (исходная почва (0,05[мг тфф/г в стуки])); исходная почва с опадом (0,05[мг тфф/г в стуки])). Дегидрогеназная активность в эксперименте 1 этап I показывает, что копролиты (1,1[мг тфф/г в стуки]) дают большую ферментативную активность, чем копролиты при содержании двух видов отдельно. Работы других авторов (Олейник, Бызов, 2008; Бызов и др., 2015) подтверждают эту закономерность.

**Эстеразная активность** повышалась в копролитах (рис. 6). Максимальная скорость реакции ( $V_m$ ) показывает, что копролиты при содержании вместе двух видов давали большие значения параметра, чем копролиты при содержании двух видов отдельно. Уменьшение максимальной скорости реакции происходит в ряду: копролиты *A.caliginosa* > исходная почва; исходная почва с опадом > копролиты *L.rubellus*; почва L > почва A).

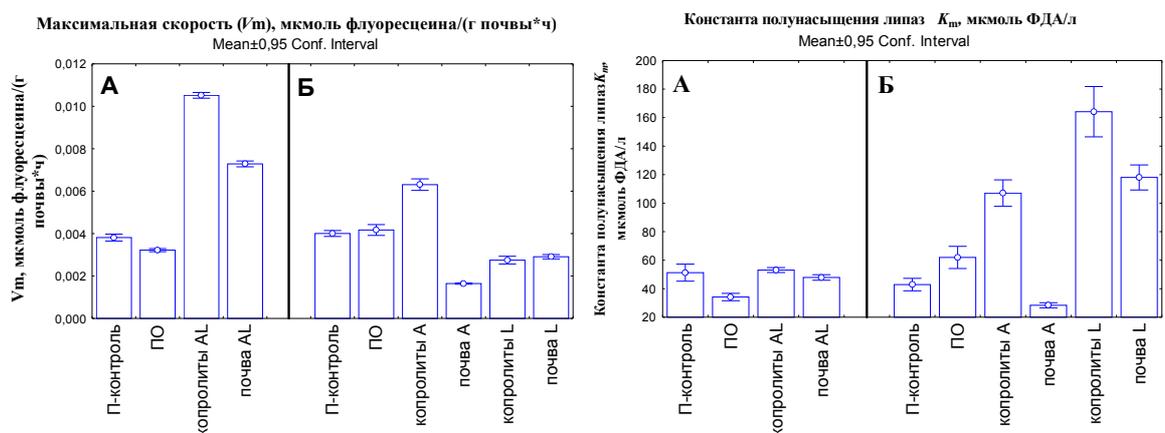


Рисунок 6. Значения максимальной скорости реакции ( $V_m$ ) – левый рисунок, константы Михаэлиса ( $K_m$ ) – правый рисунок. А – данные для эксперимента №1 этап I (при совместном содержании дождевых червей), Б – данные для эксперимента №1 этап II, эксперимента №2. Обозначения как на рис. 1.

Константа Михаэлиса ( $K_m$ ) ниже для копролитов при содержании вместе двух видов. Уменьшение константы происходит в ряду: копролиты *L.rubellus* > почва L > копролиты *A.caliginosa* > исходная почва с опадом > исходная почва > почва А.

Сродство к субстрату ниже в копролитах дождевых червей относительно контроля, что означает меньшую начальную скорость ферментативной реакции. Максимально возможная скорость реакции для копролитов *A.caliginosa* выше относительно контроля, для копролитов *L.rubellus* ниже.

**Кривые роста.** Сравнение средних по U-критерий Манна-Уитни для численности микроорганизмов на субстратах достоверно отличается для почвы и почвы с опадом (на пектине), копролитов А и почвы (на кератине), копролиты L и почву с опадом (на пектине), почвы L и почвы с опадом (на пектине). Для копролитов *A.caliginosa* численность микроорганизмов возрастает на кератине с  $1,3 \cdot 10^8$  до  $1,5 \cdot 10^9$  КОЕ/г. Для копролитов *L.rubellus* численность микроорганизмов не изменяется относительно контрольной почвы.

### **Определение ключевых факторов для разделения объектов методами многомерной статистики**

**Дисперсионный анализ (ANOVA).** Наличие на поверхности почвы опада не играет ключевой роли для объяснения различия параметров в изученных объектах. Различие в свойствах копролитов разных видов дождевых червей столь велико, что не позволяет говорить о факторе наличия дождевых червей как объясняющем все различия (таблица 2). Ключевым является вид дождевых червей, а также совокупность двух факторов: вида и наличие опада.

Таблица 2 Дисперсионный анализ (ANOVA). Многомерный тест значимости, основанный на 47 измеренных параметрах. Уровень значимости (p), различия между средними значениями выборки (F). Сигма-ограниченная параметризация.

Фактор	P	F
присутствие червей	0,392	3,529
наличие опада	0,616	1,193
<i>вид червей</i>	<i>0,001</i>	<i>836,6</i>
<i>Объекты</i>	<i>0,028</i>	<i>9,944</i>

**Метод главных компонент (МГК).** Всего в анализе оценивалось 47 параметров. По результатам анализа массива данных методом главных компонент выделены 4 главных компоненты (ГК) (рис. 7). Первая и вторая ГК обеспечивает выделение группы копролитов *A.caliginosa*, почву с опадом и исходную почву. Ключевые параметры 1 ГК: численность бактерий, определенная методом посева и методом люминесцентной микроскопии; Сорг %, процент фракций гранулометрического состава с ПОВ (<2; 2-20; 50-100; 100-250; 250-500; 500-1000 мкм); % фракции микроагрегатного состава (100-250 мкм); эстеразная активность (*Km*); соотношение C/N;  $\delta^{13}\text{C}$  (VPDB). Ключевые параметры 2 ГК: % фракций гранулометрического состава без ПОВ (250-500; 500-1000 мкм); % содержания микроагрегатов (<2 мкм); эстеразная активность (*Vm*); обилие ассоциаций микроорганизмов на целлюлозе. Третья и четвертая ГК разделяют только почву с опадом и исходную почву. Ключевые параметры: обилие ассоциаций микроорганизмов на субстратах (декстран 500; инулин; кератин; твин 20) для 3-ей ГК и (ксилан; нуклеиновая кислота) для 4-ой ГК.

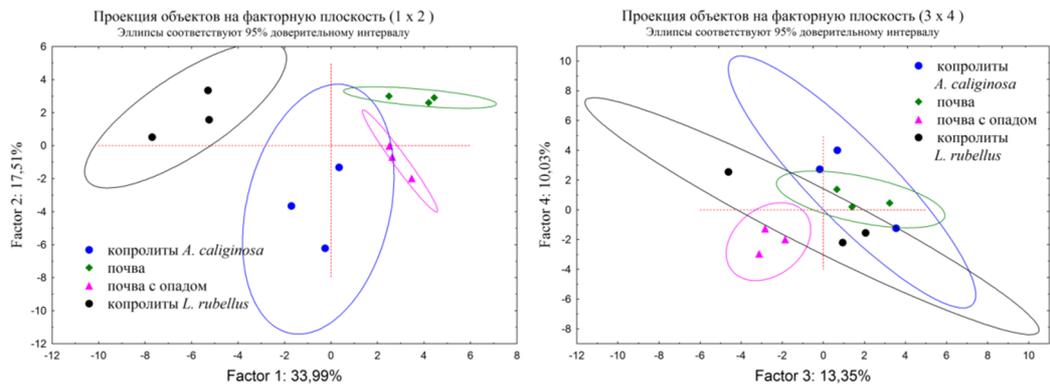


Рисунок 7. Метод главных компонент (МГК): проекция на факторную плоскость первой и второй компоненты (слева), третьей и четвертой компоненты (справа) для различных образцов (почва, почва с опадом, копролиты *A. caliginosa*, копролиты *L. rubellus*).

**Корреляционный анализ** проведен по изменению свойств в 4-х объектах: копролитов (двух видов дождевых червей), исходной почвы и исходной почвы с опадом. В рамках одной точки бралось среднее значение выбранного параметра для одного мезокозма. Корреляция построена на 12 точках. Для многих параметров характерно скачкообразное изменение, т.е. наблюдается резкое изменение для одного объекта, в то время как для остальных объектов изменения слабые или же вообще отсутствуют. Корреляционный анализ подтверждает взаимосвязь параметров, которые частично дублируют друг друга. Например, полученные разными методами данные о численности микроорганизмов  $R=0.95$  (методом посева и методом люминесцентной микроскопии) и содержание органического углерода, полученное в разных лабораториях на разных приборах  $R=0,92$ . Корреляционный анализ показал наличие слабой линейной связи для содержания углерода, азота и микробиологических, физических и агрофизических свойств в ряду изученных объектов.

### Заключение

Определено 47 параметров, дающих комплексную оценку свойств копролитов дождевых червей (*A. caliginosa* и *L. rubellus*). По результатам статистического анализа выбранные параметры имеют меньший разброс

внутри одного объекта, чем между собой. На основании методов многомерной статистики выделены параметры, разделяющие копролиты дождевых червей, почву, где жили черви, исходную почву с опадом и без него. Дождевые черви разных эколого-физиологических групп оказывают существенное влияние на абсолютные значения изученных параметров. Показано отсутствие линейной связи для большинства определенных параметров.

На основании проведенных анализов выделены два основных механизма, возникающих при прохождении почвы сквозь кишечник дождевых червей. Первый – увеличение содержания органического вещества за счёт преобразования опада (влияет напрямую на содержание  $C_{\text{орг}}$ , изотопов (C, N), ГС и на микробиологические параметры (ферментативная активность микроорганизмов, их численность, скорость потребления субстрата)). Второй – появление крупных минеральных частиц в ГС, что приводит к изменению параметров ГС состава без ОВ, удельной поверхности. Причиной этого, с одной стороны, является селективный отбор дождевыми червями крупных частиц из почвы, с другой стороны образование минеральных частиц из фитолитов. Совместное действие этих двух механизмов приводит к изменению остальных исследованных в работе свойств.

### **Выводы:**

1. Копролиты дождевых червей выполняют важную экологическую роль в поступлении и сохранении углерода в почву. В копролитах *A.caliginosa* увеличивается содержание органического углерода на  $0,4\pm 0,1\%$  в эксперименте с кленовым опадом и на  $0,6\pm 0,1\%$  в эксперименте с пожнивными остатками кукурузы. В копролитах *L.rubellus* увеличивается содержания органического углерода на  $1,4\pm 0,1\%$  по сравнению с исходной почвой. Дождевые черви *L.rubellus* больше способствуют увеличению органического углерода в почве, чем *A.caliginosa*.

2. Дождевые черви способны изменять гранулометрический состав исходной почвы. Органические частицы в составе копролитов распределены по фракциям песка. Несмотря на незначительное количество и/или отсутствие минеральных частиц размером более 100 мкм в исходной почве без дождевых червей и опада, такие ЭПЧ идентифицированы в составе копролитов. Впервые описано, что гранулометрический состав копролитов включает ЭПЧ песчаных фракций, отсутствующих в исходной почве, содержащих в своем составе частицы размером до 500 мкм. При прохождении через кишечник дождевых червей происходит объединение минеральных ЭПЧ почвы и фитоцитов клёна (предположительно за счет работы кальциевых желез дождевых червей).
3. Агрофизические свойства копролитов *A.caliginosa* и *L.rubellus* существенно различаются. В копролитах *A.caliginosa* возрастает доля микроагрегатов 20-100 мкм на  $9,2 \pm 0,5\%$  за счёт уменьшения доли микроагрегатов  $>100$  мкм, в копролитах *L.rubellus* возрастает доля микроагрегатов 2-20 мкм на  $7,0 \pm 0,5\%$  и частиц  $<2$  мкм на  $1,6 \pm 0,1\%$  за счёт уменьшения доли микроагрегатов  $>20$  мкм.
4. Дождевые черви играют важную экологическую роль для почвенных микроорганизмов, повышают биологическую активность. При этом наблюдаются отличия для разных экологических групп: при меньшей численности бактерий в копролитах *A.caliginosa* относительно копролитов *L.rubellus*, ферментативная активность выше в копролитах *A.caliginosa*. Численность микроорганизмов в копролитах *A.caliginosa* увеличивается с  $3 \cdot 10^6$  до  $2,4 \cdot 10^7$  КОЕ/г почвы и с  $1,9 \cdot 10^8$  до  $3,4 \cdot 10^8$  кл/г почвы. В копролитах *L.rubellus* увеличивается с  $3 \cdot 10^6$  до  $1,45 \cdot 10^7$  КОЕ/г почвы, с  $1,9 \cdot 10^8$  до  $1 \cdot 10^9$  кл/г почвы. Константа Михаэлиса ( $K_m$ ) для эстеразной активности показывает уменьшение в копролитах начальной скорости реакции. Максимальная скорость реакции ( $V_m$ )

увеличивается в копролитах *A.caliginosa* и уменьшается в копролитах *L.rubellus* относительно контрольной почвы.

5. Впервые выделены характеристики, отличающие копролиты представителей двух разных экологических групп дождевых червей друг от друга и фоновой почвы:
- Для копролитов *A.caliginosa* это: наличие в гранулометрическом составе ЭПЧ 250-500, 500-1000 мкм, не агрегированные частицы < 2 мкм в микроагрегатах, параметр для эстеразной активности – максимальная скорость реакции ( $V_m$ ), обилие ассоциаций микроорганизмов на субстрате с целлюлозой.
  - Для копролитов *L.rubellus* это: изменение в гранулометрическом составе соотношения ЭПЧ (до окисления органического вещества), снижение доли микроагрегатов размером 100-250 мкм, параметр для эстеразной активности – константа Михаэлиса ( $K_m$ ), увеличение содержания органического углерода, изотопов углерода, увеличение насыщенности органического вещества азотом.

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ,**  
опубликованных в журналах Scopus, WoS, RSCI.

1. **Фролов О.А.**, Якушев А.В. Влияние на бактериальный гидролитический комплекс гумусо-аккумулятивного горизонта техноурбанозема пассажа через кишечник дождевого червя *Aporrectodea caliginosa* // Бюллетень Почвенного института им. В.В.Докучаева. – 2018. – №. 94. – С. 57-73. – DOI: 10.19047/0136-1694-2018-92-57-73 – ИФ по РИНЦ (2022) – 1, 411, количество печатных листов (п.л.) – 1, личный вклад – 0,5 п.л.
2. **Фролов О.А.**, Якушев А.В., Милановский Е. Ю. Гетерогенность свойств копролитов дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* и *Lumbricus rubellus* в модельном опыте на черноземе // Бюллетень Почвенного института им. В.В.Докучаева. – 2019. – №. 99. – С. 92-116. – DOI: 10.19047/0136-1694-2019-99-92-116 – ИФ по РИНЦ (2022) – 1,411, 1,4 п.л., 0,7 п.л.
3. **Фролов О.А.**, Милановский Е.Ю. Размер и содержание органических частиц в копролитах *Aporrectodea caliginosa* и *Lumbricus rubellus* // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2022. – №. 58. – С. 6-27. – DOI: 10.17223/19988591/58/1 – Q4 – SRJ– 0,17, 1,9 п.л., 1,2 п.л.

**Публикаций в прочих научных изданиях:**

4. **Фролов О.А.**, Терехин А.В., Якушев А.В., Милановский Е.Ю. Method for determining microbial activity (hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA), 490 nm) // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2022. – Т. 1093. – №. 1. – С. 012016. – DOI: 10.1088/1755-1315/1093/1/012016 - количество печатных листов (п.л.) – SRJ – 0,2 – 0,57, личный вклад – 0,3 п.л.

Полный список опубликованных работ имеется на странице соискателя в ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/workers/60028609/>