Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
факультет Почвоведения

УТВЕРЖДАЮ

и.о. декана П.В.Красильников /_____ /

«___» _____20__ г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

Наименование дисциплины:

Изотопные методы в почвенной микробиологии

Уровень высшего образования:

Магистратура

Направление подготовки (специальность):

05.04.06 Экология и природопользование

Направленность (профиль) ОПОП:

Экотехнологии

Форма обучения: очная

Москва 2023

Рабочая программа дисциплины разработана в соответствии с самостоятельно установленным МГУ образовательным стандартом (ОС МГУ) для реализуемых основных профессиональных образовательных программ высшего образования по направлению подготовки 05.04.06 «Экология и природопользование» программы магистратуры

ОС МГУ, утвержденный решением Ученого совета МГУ имени М.В.Ломоносова от 28 декабря 2020 года (протокол №7).

1. **Место дисциплины в структуре ОПОП:** вариативная часть, по выбору.

2. **Входные требования для освоения дисциплины, предварительные условия:** общепрофессиональные и общенаучные дисциплины базовой части программы бакалавра по специальности «Почвоведение», в том числе – «Физика», «Физическая химия», «Основы почвоведения», а также – «Биохимия почвенных микроорганизмов», «Молекулярные методы в почвоведении».

3. **Планируемые результаты обучения в результате освоения дисциплины, соотнесенные с требуемыми компетенциями выпускников:**

Компетенции выпускников (коды)	**Индикаторы (показатели) достижения компетенций**	**Планируемые результаты обучения по дисциплине, сопряженные с компетенциями**
МПК-2 **МПК-3**	**МПК-2.1** **МПК-3.1**	Знать процессы трансформации соединений углерода, азота, серы и др. биологически значимых элементов почвенными микроорганизмами, животными и растениями, а также связанные с ними изотопные эффекты. Уметь использовать эти знания при решении собственных практических задач. Знать область применения изотопных методов для решения актуальных задач почвенной микробиологии и зоологии. Знать историю развития данных методов, а также подходы, применяемые в смежных научных направлениях: почвоведении, экологии, геологии и т.д. Знать методы определения изотопного состава биомаркеров (фосфолипиды, ДНК, РНК, белки), уметь планировать эксперимент с внесением меченого субстрата и интерпретировать полученные результаты: выявлять и идентифицировать микроорганизмы, участвующие в поглощении и трансформации субстрата, знать ограничения

		применимости метода. Владеть базовыми навыками планирования экспериментов с использованием методов изотопного анализа; знать принципы работы приборов для определения изотопного состава вещества; уметь рассчитать величины коэффициента фракционирования изотопов в ходе биохимической реакции, определять по изотопному составу происхождение вещества и оценивать вклад отдельных его источников. Использовать современные компьютерные технологии и международные базы данных для идентификации микроорганизмов, осуществляющих фракционирование изотопов в ходе поставленных экспериментов. Владеть навыками самостоятельного поиска научных публикаций, относящихся к решению собственной научной или практической задачи и анализа применимости описанных там методов для ее решения. Уметь оценивать статистическую достоверность полученных выводов. Знать особенности изотопного состава минеральных и органических удобрений, органических и неорганических поллютантов, климатически активных газов антропогенного и природного происхождения, знать изотопные эффекты, которые наблюдаются при их микробной трансформации, поглощении или иммобилизации. Знать изотопные показатели, которые используются для

		оценки эффективности фотосинтеза и активности микроорганизмов в почвенном профиле и т.д. Уметь применять полученные знания при разработке и апробации методов очистки и рекультивации загрязненных территорий и при изучении баланса парниковых газов в наземных экосистемах.

4. **Объем дисциплины** 3 з.е., в том числе 36 академических часов на контактную работу обучающихся с преподавателем, 72 академических часов на самостоятельную работу обучающихся.

5. **Формат обучения** очный

6. **Содержание дисциплины, структурированное по разделам и темам, с указанием отведенного на них количества академических часов, и виды учебных занятий**:

Наименование и краткое содержание разделов и тем дисциплины / форма текущей аттестации	**Всего (часы)**	В том числе							
		Контактная работа (работа во взаимодействии с преподавателем)					**Самостоятельная работа обучающегося**		
		Занятия лекционного типа	Занятия семинарского типа (семинары)	Занятия семинарского типа (лабораторные)	Занятия семинарского типа (практические)	**Всего**	Подбор и анализ литературы	Решение расчетных задач	**Всего**
Раздел 1. Введение в изотопные методы									
Тема 1. Исторический очерк: открытие изотопов и изучение их физико-химических особенностей			2			2	2		2
Тема 2. Стабильные и радиоактивные изотопы, радиоактивный распад			2			2	4		4
Тема 3. Аналитические методы определения изотопного состава вещества			2			2	2	2	4
Тема 4. Фракционирование изотопов и смешивание			4			4	4	4	8

изотопов									
Форма текущей аттестации по разделу – контрольная работа									
Раздел 2. Применение изотопных методов для решения исследовательских задач									
Тема 5. Геохимия стабильных изотопов биологически значимых элементов			14			14	20	8	28
Тема 6. Изотопный состав биомаркеров, способы связать таксономическую принадлежность и функции микроорганизмов *in situ*			6			6	12		12
Тема 7. Использование изотопных данных в палеоэкологических и палеоклиматических реконструкциях			6			6	6	2	8
Форма текущей аттестации по разделу – контрольная работа									
Промежуточная аттестация	*Зачёт*						6		
Итого:	108	36					72		

Подробное содержание разделов и тем дисциплины:

Раздел 1. Введение в изотопные методы

Тема 1. Исторический очерк: открытие изотопов и изучение их физико-химических особенностей

Возникновение атомной теории. Работы Дж. Дальтона, открытие закона кратных соотношений в химических реакциях и введение понятия относительной атомной массы. Периодическая система Д.И. Менделеева и появление атомного номера. Эксперимент Гейгера-Марсдена и теория строения атома Э. Резерфорда. Его работы в области теории радиоактивного распада. Открытие протона и нейтрона. Открытие Ф. Содди изотопа ^{228}Ra в продуктах радиоактивного распада тория и появление понятия «изотоп». Работы Дж. Томпсона и Ф. Астона, первое экспериментальное разделение изотопов, создание масс-спектрометрии. Вклад Ф. Астона, А. Демпстера, У. Джиока, Г. Джонстона, Г. Юри, Ф. Брикведде и Г. Мэрфи в обнаружение стабильных изотопов химических элементов. Разработка теоретических основ фракционирования изотопов в ходе химических реакций и физических процессов Дж. Бигелейзеном и Г. Юри.

Тема 2. Стабильные и радиоактивные изотопы, радиоактивный распад

Закономерности распространения стабильных изотопов в природе, «долина стабильности». Принципиальные подходы к построению экспериментов со стабильными и радиоактивными изотопами. Понятие о радиоактивном распаде. Альфа и бета-распад. Гамма-излучение. Кинетика радиоактивного распада, использование радиоактивных изотопов для датировки осадочных пород, палеопочв и биологических объектов. Особенности экспериментов с радиоизотопами. Сцинтиграфия, FISH-микроавторадиография.

Тема 3. Аналитические методы определения изотопного состава вещества

Принципиальное устройство масс-спектрометра. Формы выражения изотопного состава, изотопные отношения и их определение, изотопные стандарты. Способы пересчета разных форм выражения изотопного состава, пересчеты величин, полученных относительно разных стандартов. Виды ионных источников масс-спектрометра: ионизация электронным ударом, химическая ионизация, ионизация в электроспрее, химическая ионизация при атмосферном давлении, ионизация в индуктивно-связанной плазме, термоионизация. Основное уравнение масс-спектрометра. Квадруполь и квадрупольная ионная ловушка. Времяпролетный масс-анализатор. Масс-спектрометры непрерывного потока, хромато-масс-спектрометрия. Использования абсорбционной инфракрасной спектроскопии для определения изотопного состава вещества. Микроаналитическая техника: SIMS и NanoSIMS.

Тема 4. Фракционирование изотопов и смешивание изотопов

Понятие об изотопном эффекте. Прочность химической связи с участием легкого и тяжелого изотопов. Термодинамический (равновесный) и кинетический изотопный эффект: количественный расчет и свойства. Уравнение масс-баланса. Модели фракционирования изотопов при обратимых и необратимых реакциях в открытых и закрытых системах. Смешивание изотопов. Изотопные эффекты в природе.

Раздел 2. Применение изотопных методов для решения исследовательских задач

Тема 5. Геохимия стабильных изотопов биологически значимых элементов

Стабильные изотопы углерода. Изотопный состав ювенильного углерода, органического углерода и углерода карбонатов. Изотопный состав CO_2 и CH_4 атмосферы и их динамика. Фракционирование изотопов при фотосинтезе: механизм и особенности у разных растений. Отличия С3 и С4 фотосинтеза, использование этих отличий в почвенных и экологических исследованиях. Изотопный состав отдельных компонентов растительной биомассы. Изотопный состав микробной биомассы и почвенного CO_2 при разложении растительных остатков. Фракционирование изотопов при метаногенезе.

Стабильные изотопы азота. Фракционирование изотопов в биологическом цикле азота. Явление обратного фракционирования изотопов при нитрификации. Фракционирование изотопов азота в почвенном профиле. Фракционирование изотопов азота в трофических цепях, трофическое обогащение. Совместное использование изотопов азота и углерода для изучения трофических связей в экосистемах. Изотопный состав N_2O, NO и NO_2 в атмосфере.

Стабильные изотопы серы. Фракционирование изотопов в биологическом цикле серы. Изотопный состав серосодержащих газов в атмосфере. Понятие о масс-независимом фракционировании, масс-независимое фракционирование изотопов серы.

Стабильные изотопы кислорода. Фракционирование изотопов кислорода при испарении и конденсации воды. Фракционирование изотопов кислорода в процессе фотосинтеза, изотопный состав кислорода нитратов и сульфатов. Масс-независимое фракционирование изотопов кислорода. Использование изотопов кислорода для уточнения источников азота и серы в экосистемах.

Стабильные изотопы водорода. Фракционирование изотопов водорода при испарении и конденсации воды. Изотопный состав атмосферного водорода и контролирующие его факторы. Использование изотопов кислорода и водорода для изучения географического происхождения органического вещества и путей миграции животных.

Перспективы использования в биологии, почвоведении и экологии изотопов лития, бора, магния, кремния, хлора, кальция, хрома, железа, меди, никеля и молибдена.

Тема 6. Изотопный состав биомаркеров, способы связать таксономическую принадлежность и функции микроорганизмов *in situ*

Метод включения изотопной метки в состав фосфолипидных жирных кислот (PLFA-SIP): достоинства и недостатки. Метод stable isotope switching для изучения и путей переработки субстрата в экосистеме. Изучение метаболизма и таксономической принадлежности некультивируемых организмов, исследование анаэробного окисления метана.

Метод включения изотопной метки в состав ДНК (DNA-SIP). Центрифугирование в градиенте плотности для разделения меченого и не меченого ДНК. Подходы к исследованию метило- и метанотрофных организмов, деструкторов органических поллютантов, микроорганизмов ризосферы. Использование изотопных меток в метагеномных исследованиях. Ограничения методов.

Анализ РНК и белков в экспериментах с изотопной меткой.

Тема 7. Использование изотопных данных в палеоэкологических и палеоклиматических реконструкциях

Развитие представлений о возрасте Земли и истории жизни на ней. Использование изотопного состава осадочных пород для доказательств существования жизни 3,45-3,85 млрд лет назад. Использование метода NanoSIMS для анализа микрофоссилий, изучение биохимического разнообразия жизни Архея и Протерозоя.

Реконструкция климата и состава атмосферы по изотопному составу осадочных пород. Использование следов масс-независимого фракционирования серы и изотопов хрома для датирования «кислородной революции». Гипотеза «Snowball Earth» и изотопные свидетельства планетарных оледенений в Протерозое. Изучение изменений климата в четвертичном периоде и, в частности, в голоцене на основании изотопного состава кернов из полярных ледников и донных морских отложений. Морские изотопные стадии. Изотопные методы оценки источников парниковых газов в атмосфере (деятельность почвенных микроорганизмов, сжигание ископаемого топлива и т.д.).

7. **Фонд оценочных средств для оценивания результатов обучения по дисциплине**:

7.1. **Типовые контрольные задания или иные материалы для проведения текущего контроля:**

Задача 1.

В накопительную культуры внесены нитраты, после чего в среде был обнаружен нитрит-анион: $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$

Для внесенных нитратов $\delta^{15}N$ = 0‰, $^{15}N/^{14}N = 3{,}6764 \cdot 10^{-3}$. Изотопный состав нитритов в момент обнаружения оказался легче, $\delta^{15}N$ = - 30‰ и $^{15}N/^{14}N = 3{,}5661 \cdot 10^{-3}$. Рассчитайте для данного биохимического процесса α (согласно определению данной величины в химии), Δ, ε, [1000·ln α]. Сравните их с $\delta_{продукт} - \delta_{субстрат}$.

Задача 2.

В эксперименте на поле в Швеции впервые была высажена кукуруза. $\delta^{13}C_{CO2}$, образуемого при дыхании растений кукурузы, составил -12‰. $\delta^{13}C_{CO2}$ для почвенного дыхания на контрольной делянке составил -24‰. В августе на опытном поле выделяющийся из почвы CO_2 имел $\delta^{13}C$ = -16‰. Объясните это явление и дайте ему количественную оценку.

Задача 3.

Органическое вещество с $\delta^{13}C$ = -25‰ используется микрорганизмами в анаэробных условиях. Часть его перерабатывается бродильщиками в CO_2 (Δ = +12‰), а часть – в уксусную кислоту (для углерода метильной группы Δ = -25‰). CO_2 накапливается в растворенном виде в среде, тогда как концентрация уксусной кислоты в среде крайне низка.

Оба субстрата используются метаногенами, и для образующегося метана $\delta^{13}C$ = -58,8‰. Известно, что при использовании CO_2 для метаногенеза Δ = -72‰, а для использующих уксусную кислоту *Methanosarcina*, обнаруженных в местообитании, Δ = -25‰. Оцените вклад каждого из двух субстратов в образовании метана.

7.2. **Типовые контрольные вопросы, задания или иные материалы для проведения промежуточной аттестации:**

1. История открытия изотопов и исследований изотопных эффектов.
2. Стабильные изотопы. «Долина стабильности».
3. Виды и кинетика радиоактивного распада.
4. Формы выражения и записи изотопного состава.
5. Изотопные стандарты.
6. Устройство и принцип работы масс-спектрометра.
7. Понятие об изотопных эффектах, причины их формирования.
8. Термодинамический (равновесный) изотопный эффект.
9. Кинетический изотопный эффект.
10. Фракционирование изотопов углерода при фотосинтезе.
11. Фракционирование изотопов углерода при деструкции органического вещества в аэробных и анаэробных условиях.
12. Фракционирование изотопов в биологическом цикле азота.
13. Фракционирование изотопов азота в трофических цепях
14. Фракционирование изотопов в почвенном профиле.
15. Фракционирование изотопов в биологическом цикле серы.
16. Масс-зависимое и масс-независимое фракционирование изотопов. Примеры использования в исследовательской работе.
17. Фракционирование изотопов водорода и кислорода при формировании атмосферных осадков.
18. Эксперименты по включению изотопной метки в состав биомаркеров. Достоинства и недостатки анализа липидов, ДНК, РНК, белков.
19. Подходы к изучению метаболизма некультивируемых организмов.
20. Основные направления исследований, сочетающих изотопные и молекулярно-биологические методы.
21. FISH-микроавторадиография.
22. Микроаналитическая техника: SIMSи NanoSIMS.
23. Изотопный состав парниковых газов.
24. Реконструкция изменений климата с использованием изотопных данных.
25. Изотопные методы датирования. Радиоуглеродный анализ.

8. **Шкала и критерии оценивания результатов обучения по дисциплине:**

В таблице представлена шкала оценивания результатов обучения по дисциплине. Уровень знаний обучающегося оценивается на "отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно".

Оценка "отлично" выставляется, если обучающийся демонстрирует сформированные систематические знания, умения и навыки их практического использования. Оценка "хорошо" ставится, если при демонстрации знаний, умений и навыков студент допускает отдельные неточности (пробелы, ошибочные действия) непринципиального характера. При несистематических знаниях, демонстрации отдельных (но принципиально значимых навыков) и затруднениях в демонстрации других навыков выставляется оценка

«удовлетворительно». Оценка "неудовлетворительно" ставится, если знания и умения фрагментарны, а навыки отсутствуют.

ШКАЛА И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ результатов обучения (РО) по дисциплине				
Оценка РО и соответствующие виды оценочных средств	**2**	**3**	**4**	**5**
Знания (виды оценочных средств: устные и письменные опросы и контрольные работы)	Отсутствие знаний	Фрагментарные знания	Общие, но не структурированные знания	Сформированные систематические знания
Умения (виды оценочных средств: устные и письменные опросы и контрольные работы)	Отсутствие умений	В целом успешное, но не систематическое умение	В целом успешное, но содержащее отдельные пробелы умение (допускает неточности непринципиального характера)	Успешное и систематическое умение
Навыки (владения, опыт деятельности) (виды оценочных средств: устные и письменные опросы и контрольные работы)	Отсутствие навыков (владений, опыта)	Наличие отдельных навыков (наличие фрагментарного опыта)	В целом, сформированные навыки (владения), но используемые не в активной форме	Сформированные навыки (владения), применяемые при решении задач

9. **Ресурсное обеспечение:**

- Перечень основной и дополнительной учебной литературы

Основная литература:

- *Fry B.* Stable Isotope Ecology. New York: Springer. 2006. Свободный доступ онлайн: https://link.springer.com/book/10.1007/0-387-33745-8
- *Hoefs J.* Stable Isotope Geochemistry (7th edition). Cham – Heidelberg – New York – Dordrecht – London: Springer. 2015.
- Isotopic Analysis: Fundamentals and Applications Using ICP-MS (ed. F. Vanhaecke, P. Degryse). - Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA,Boschstr. Weinheim, Germany, 2012 DOI:10.1002/9783527650484
- Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science (ed. R. Michener, K. Lajtha). Malden – Oxford – Carlton: Blackwell Publishing. 2007. Свободный доступ онлайн: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.469.3198&rep=rep1&type=pdf

Дополнительная литература:

- *Галимов Э.М.* Природа биологического фракционирования изотопов. М.: Наука. 1981.
- *Галимов Э.М.* Геохимия стабильных изотопов углерода. М.: Недра. 1968. Свободный доступ онлайн: https://www.geokniga.org/books/11240
- *Гриненко В.А., Гриненко Л.Н.* Геохимия изотопов серы. М.: Наука. 1974.
- *Conrad R., Noll M., Claus P. et al.* Stable carbon isotope discrimination and microbiology of methane formation in tropical anoxic lake sediments // Biogeosciences, 2011, 8, pp. 795–814. https://doi.org/10.5194/bg-8-795-2011
- *Michalski G., Kolanowski M., Riha K.M.* Oxygen and nitrogen isotopic composition of nitrate in commercial fertilizers, nitric acid, and reagent salts // Isotopes in Environmental and Health Studies, 2015, Vol. 51, Iss. 3. p. 382-391. https://doi.org/10.1080/10256016.2015.1054821
- *Hundey E., Russell S., Longstaffe F. et al.* Agriculture causes nitrate fertilization of remote alpine lakes // Nature Communications, 2016, 7, 10571. https://doi.org/10.1038/ncomms10571

- Перечень лицензионного программного обеспечения
- Перечень профессиональных баз данных и информационных справочных систем
- Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» (при необходимости)
- Описание материально-технической базы

А. Помещения:

- аудитория, рассчитанная на стандартную группу учащихся (10-15 человек);
- аудитория с выходом в Интернет для самостоятельной работы.

Б. Оборудование:

- мультимедийный проектор, компьютер, экран для учебной аудитории.

10. **Язык преподавания:** русский

11. **Преподаватель (преподаватели):**
Поздняков Лев Анатольевич
доцент кафедры биологии почв,
к.б.н. (2011, Д 501.002.13)

12. **Разработчики программы:**
Поздняков Лев Анатольевич
доцент кафедры биологии почв,
к.б.н. (2011, Д 501.002.13)

13. **Краткая аннотация дисциплины:**

Курс формирует представление о возможностях изотопных методов в почвенно-экологических исследованиях. Дается понятийная база и математический аппарат, рассказывается о механизмах фракционирования изотопов, моделировании изменения изотопного состава в открытых и закрытых системах. Полученные знания закрепляются при решении задач, основанных на результатах реальных исследований. Анализируется

история изучения масс-зависимого и масс-независимого фракционирования изотопов, усовершенствования аналитических методов и приборной базы, указываются перспективы их дальнейшего развития. Подробно рассматривается геохимия стабильных изотопов биологически значимых элементов: углерода, азота, серы, кислорода, водорода и др. Дается представление о том, какие процессы приводят к изменению изотопного состава вещества, и какая может быть получена информация из его анализа. Рассказывается об использовании меченых субстратов в почвенно-экологических исследованиях, особое внимание уделяется методам PLFA-SIP и DNA-SIP, позволяющим напрямую связать определенный биохимический процесс с проводящей его группой микроорганизмов. Рассмотрены вопросы применения изотопных методов для изучения вклада почвенной микробиоты в процессы образования и поглощения парниковых газов; для изучения изменений климата, эволюции биосферы, а также для целей датирования в палеопочвоведении и геологии.