

ПЛАСТИНКИ ОБРАСТАНИЯ-ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ЭКОМОНИТОРИНГА ПОДСТИЛОК ГОРОДСКИХ ПОЧВ

Гречина Виктория Борисовна, студентка 1-го курса института агробιοтехнологии ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет -МСХА им. К.А. Тимирязева

Якушев Андрей Владимирович, Научный сотрудник лаборатории Почвенной микробиологии, кафедры биологии почв факультета Почвоведения МГУ

Полин Валерий Дмитриевич, к.с.-х.н., доцент кафедры земледелия и методики опытного дела, ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет -МСХА им. К.А. Тимирязева

Аннотация: В статье приведены результаты применения модернизированного метода пластинок обрастания Росси-Холодного для биоиндикации почвенной микробиоты. Для выполнения поставленной задачи был проведён модельный эксперимент по инкубации листового опада деревьев.

Ключевые слова: пластинки обрастания, листовой опад, биоиндикация.

Введение: Почва является ключевым компонентом наземных экосистем [2]. В ходе проведения почвенно-экологического мониторинга важно знать не только степень загрязнения почв, эродированности или уплотнённости, но и состояние почвенной микробиоты - ключевого компонента почвы, ответственного за восстановление антропогенно-нарушенных почв. В отличие от физических и химических показателей для микробиологических показателей почв не разработаны общепринятые методы мониторингового анализа [1]. Поэтому остаётся актуальной проблема разработки инновационных методов и методик экологического мониторинга микробного сообщества почв.

Для того чтобы проверить как работает метод, была выбрана почвенная подстилка — поверхностный горизонт почвы, состоящий из органических остатков (мортмассы). Подстилка является местообитанием огромного числа организмов, обеспечивает образование гумуса, защищает почву от размыва и механического уплотнения, регулирует водно-воздушный режим почв, концентрирует элементы минерального питания растений.

Антропогенные нарушения в наземных экосистемах вызывают изменения в подстилке: в её массе, толщине и плотности, запасе питательных веществ. Значение ботанического состава опада в скорости его разложения и обилия грибов (основных деструкторов растительных остатков) не до конца известно [1]. Например, дубовый опад содержит дубильные вещества. Дубильные вещества или танины - высокомолекулярные природные фенольные соединения, производные пирогаллола, пирокатехина, флороглюцина. Они обладают бактерицидными и фунгицидными свойствами, препятствуют гниению растительных остатков, защищают растение от фитопатогенных

микроорганизмов. Хвоя лиственницы содержит микробостатические и микробоцидные вещества, замедляющие скорость её разложения: смоляные кислоты, бициклические спирты лабданового ряда, дитерпеновые соединения, полифенолы, лигнаны, бензолкарбоновые кислоты. Кленовый опад не содержит микробоподавляющих веществ.

Цель и задачи Целью нашего исследования было изучить возможность применения модернизированного устаревшего метода почвенной микробиологии - пластинок обрастания Росси-Холодного [3] для инновационного экологического мониторинга микробного сообщества городских почв. На основании анализа литературы [1, 2] мы можем сформулировать нашу **рабочую гипотезу** о том, что влияние биоразлагаемости опада на скорость его разложения и обилие микроорганизмов очень велико, что надо учитывать при экомониторинге подстилок и опадов.

Задачи исследования: 1) поставить модельный лабораторный эксперимент по изучению почвенной микробной сукцессии; 2) изучить изменение биомассы грибов и бактерий в динамике; 3) исследовать изменение качественного состава микроорганизмов по ходу микробной сукцессии; 4) сделать заключение о возможности применения метода в экологическом мониторинге почв.

Методика выполнения работы: Для выполнения поставленных задач был проведён модельный эксперимент в условиях лабораторных почвенных микрососмов по инкубации листового опада деревьев. В парковой зоне на территории МГУ имени М.В. Ломоносова на Воробьёвых горах в г. Москве в середине октября 2020 и 2021 гг. собрали и затем высушили свежееопавший лиственный опад клена остролистного (*Acer platanoides*), дуба канадского (*Quercus rubra*), лиственницы европейской (*Larix decidua*). Данные виды деревьев были выбраны в качестве объектов исследования как распространённые и используемые в озеленении в г. Москве. Кроме того, опад этих деревьев отличается по биодоступности для микробного разложения.

Методы исследования. Ежемесячно измерялась на весах масса абсолютно сухого опада после высушивания при 105° С в сушильном шкафу. Пластины обрастания (покровные стекла 18 на 18 мм) закладывались по 4 штуки в пластиковые сосуды, содержащие 10 г (в пересчете на абс. сух. вещество) переувлажненного опада (по 10 баночек на опад каждого вида деревьев), и инкубировались 3 месяца при температуре 23-25° С и постоянной весовой влажности 200%. Окраска микроорганизмов проводилась прижизненно флюоресцентным красителем SYBR Green I, селективно окрашивающим в клетках нуклеиновые кислоты. Обилие микроорганизмов на пластинках подсчитывали каждые 7 дней в программе «ScopePhoto» по сделанным в случайном порядке фотографиям, полученным в ходе флюоресцентной микроскопии на микроскопе «Биомед 6 пр. Люм» (объектив 40×) на цифровую камеру «ДСМ-510» при окраске микроорганизмов SYBR Green I (рис.1) и в ходе безартефактной микроскопии в свете по Келеру. Биомассу микроорганизмов (г/см² стекла обрастания) определяли исходя из её объёма, определенного по ходу микроскопии. Объём грибного мицелия рассчитывали как объём цилиндра, объём бактерий рассчитывали как объём эллипса. Плотность микробной биомассы

принимали равной $1,1 \text{ г/см}^3$ [1]. Модернизация методики стекол обрастания, таким образом, включала в себя: 1. использование покровных, а не предметных стекол; 2. динамическое наблюдение; 3. прижизненное окрашивание селективным флуоресцентным красителем; 4. отсутствие фиксации и отмывки стекла перед микроскопией, что позволяло сохранить почвенный раствор и наблюдать не адгезированные микроорганизмы; 5. получение количественной информации о величине микробной биомассы на стекле.

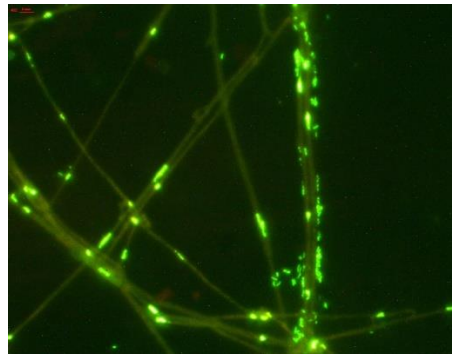


Рисунок 1 - Грибной мицелий на пластинках обрастания Росси-Холодного, окрашенный прижизненно флуоресцентным красителем SYBR Green I. Ядра окрашены в ярко-зелёный цвет

Результаты и обсуждение. Измерение массы опада по ходу его разложения показало, что в первый месяц скорости разложения лиственничного, дубового и кленового опада не сильно различаются. После первого месяца кленовый опад разлагается быстрее, чем дубовый и лиственничный (рис.2).

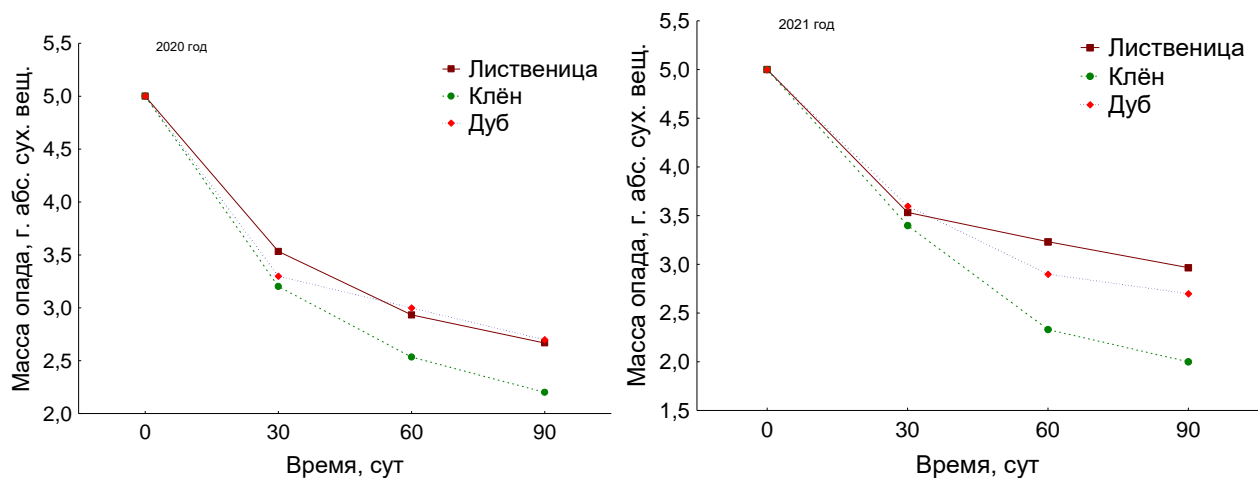


Рисунок 2 - Динамика массы опада по ходу разложения опада в 2020 и 2021 гг..

Видимо, когда легкоразлагаемые вещества уже утилизированы микроорганизмами, биодоступность становится основным фактором, определяющим скорость разложения. Анализ данных динамики живой микробной биомассы (с нативной цитоплазмой) по ходу разложения опада представленных в таблице показал, что в первые 7 дней биомасса грибного мицелия в кленовом опаде, как наиболее биодоступном, на порядок больше, чем в других опадах, после чего она резко уменьшается. В это же время биомасса мицелия в лиственничном и дубовом опаде сохраняется на высоком уровне из-за более

медленного разложения растительных остатков. Биомасса же грибных спор начинает расти после 21 суток сукцессии во всех трёх типах опада, указывая на переход грибов, доминировавших на начальных этапах сукцессии в состояние покоя. В дубовом опаде на 7 сутки сукцессии так же обильно разрастались дрожжи, которые потребляли простые питательные вещества и легко разлагаемые полимеры, такие как крахмал и белки. Динамика бактериальной биомассы имеет пик численности на 7 сутки и затем снижается по мере уменьшения количества легкодоступного пищевого субстрата. При этом бактерий больше всего в легкоразлагаемом кленовом опаде, а меньше всего в трудно разлагаемом лиственничном.

Таблица. Динамика микробной биомассы на пластинках обрастания Росси-Холодного в опаде по ходу микробной сукцессии, вызванной его разложением, ($\cdot 10^{18}$ г/см²)

Вид опада	Сутки				
	7	14	21	28	35
биомасса грибного мицелия					
Дуб	3	5	3	7	3
Клён	140	0	0	20	60
Лиственница	2,5	2,6	2,3	3	1,5
биомасса бактерий					
Дуб	6	0	0	0	1
Клён	12,5	0	0	0	3
Лиственница	1,5	1	0	0,2	0
биомасса грибных спор					
Дуб	0	0	0	55	10
Клён	0	0	18	19	24
Лиственница	0	0	17	18	28

Качественный анализ картины микробных обрастаний выявил, что на раннем этапе сукцессии преобладал меланизированный мицелий, защищающийся от света, падающего на опад, выделением меланоидных пигментов, и во множестве встречались планктонные бактерии и инфузории. Обилие легкодоступных питательных веществ привело к обильному конидиальному спороношению грибов, что позволило провести идентификацию грибного мицелия. Из грибов доминировал *Arthrobotrys oligospora*. От исходного микробного сообщества, обитавшего на живых листьях, опад унаследовал обилие дрожжей, дрожжеподобных грибов и фитопатогенных грибов (в первую очередь из рода *Alternaria*). Установлено, что на среднем этапе сукцессии спороношение остаётся активным только у целлюлозолитических грибов (*Rhinacladiella anceps*, *Acremonium fusidioides*) распространение получает гиалиновый мицелий и медленно растущий мицелий базидиомицетовых грибов в дикариотической стадии, о чем свидетельствует обильный «пряжковый» мицелий; активно развиваются нематоды. На позднем этапе сукцессии грибной мицелий в основном уже мертвый и активно разлагается колонизирующими его бактериями.

Выводы

1. В начале разложения опада (7 суток) большая биодоступность кленового опада приводит к существенно большей величине мицелия грибов (главных

деструкторов опада) в самом легко доступном для разложения кленовом опаде, там же больше всего и бактерий.

2. Биомасса грибных спор начинает расти на поздних этапах сукцессии (после 21 суток) во всех трёх типах опада, указывая на переход грибов, доминировавших на начальных этапах сукцессии в состояние покоя.

3. Модернизированный метод даёт оригинальную информацию о морфологии, о скорости колонизации микроорганизмами новых субстратов, физиологии почвенных микроорганизмов, особенностей межорганизменных взаимодействий, что важно при экомониторинге почв. Однако для большей информативности и правильной интерпретации обрастаний необходимо учитывать исходный ботанический состав опада.

Библиографический список

1. Бабьева И.П., Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Биология почв. Издательство Московского университета. М. 2005. 445 с.
2. Холодный Н. Г. Методы непосредственного наблюдения почвенной микрофлоры // Микробиология. 1935. Т. 4, вып. 2. С. 153—164.
3. Mergelov N. , Dolgikh A. , Shorkunov I. , Zazovskaya E. , Soina V., Yakushev A. , Fedorov-Davydov D. Pryakhin S. , Dobryansky A. Hypolithic communities shape soils and organic matter reservoirs in the ice-free landscapes of east antarctica. // *Scientific reports*. 2020. Vol. 10, no. 1. P. 10277
4. Агробиотехнология-2021 : Сборник статей Международной научной конференции, Москва, 24–25 ноября 2021 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2021. – 1320 с. – ISBN 978-5-9675-1855-3. – EDN NWTQEX.
5. Вклад студентов в развитие аграрной науки : Сборник статей студенческой научно-практической конференции, Москва, 31 октября 2018 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2018. – 134 с. – ISBN 978-5-9675-1702-0. – EDN YTLELB.
6. Вклад студентов в развитие аграрной науки : Сборник статей студенческой научно-практической конференции, Москва, 30 октября 2019 года. – Москва: Редакция журнала "Механизация и электрификация сельского хозяйства", 2019. – 170 с. – EDN WFMJGQ.