

СТРУКТУРНОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКОБИОТЫ ГОРОДСКИХ ПОЧВ В УСЛОВИЯХ ПОНИЖЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР

Тепеева А.Н.¹, **Марфенина О.Е.**

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: sasha211092@inbox.ru

В данной статье авторами проведен анализ функционального и видового разнообразия микроскопических грибов городских почв при различных уровнях промораживания (-18, -2, +2 °С). Показано, что снижение функционального разнообразия микобиоты наблюдается при сильном промораживании (при -18 °С), а при температурах, характерных для зональных зимних условий (при -2, +2 °С), отличий не наблюдалось. При +2 °С наблюдалось более быстрое начало потребления микроскопическими грибами ряда аминокислот и интенсивности нарастания мицелия. В контрольном варианте без температурного воздействия в городских почвах доминировали представители р. *Penicillium*, а после промораживания часто выделялись представители р. *Clonostachys*. При +2 °С отмечалось более частое выделение из них энтомо- и фитопатогенных микроскопических грибов (*Beauveria bassiana*, *Fusarium graminearum*).

Ключевые слова: микроскопические грибы, урбанозем, температурное воздействие, *Beauveria bassiana*, *Fusarium graminearum*.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF URBAN SOILS' FUNGAL COMMUNITIES UNDER THE LOW TEMPERATURE CONDITIONS

Тепеева А.Н.¹, **Marfenina O.E.**

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: sasha211092@inbox.ru

The analysis of the functional and structural diversity of microscopic fungi of urban soils at different levels of freezing (-18 °C, -2 °C, + 2 °C) was carried out. It is shown that a decrease in functional diversity is observed with strong freezing, and at temperatures of zonal winter conditions, no differences were observed. At + 2 °C, a rapid onset of consumption of a number of amino acids and the intensity of mycelium growth occurs with fungi. In the control variant, without a temperature effect, *Penicillium* species were dominated and after freezing, *Clonostachys* species were dominated. At +2 °C, there was a more frequent separation of entomo- and phytopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*, *Fusarium graminearum*).

Keywords: microscopic fungi, urban soil, temperature effect, *Beauveria bassiana*, *Fusarium graminearum*,

Микробные сообщества, являясь одним из основных элементов почвенного покрова, играют ключевую роль в круговороте веществ в природе и являются важнейшим индикатором любых изменений в биосфере [1]. Большинство исследований свойств почвенной микобиоты в настоящее время проводится в условиях положительных температур почвы (с весны до осени) [2]. Однако в ряде работ показано, что и зимой отмечается активная жизнедеятельность почвенной биоты [3; 4].

До сих пор основное внимание в почвенно-микологических исследованиях уделялось изучению изменения видового разнообразия микобиоты, а исследований функционального разнообразия почвенных грибов практически не проводилось из-за отсутствия отработанных методов. Понятие функционального разнообразия определяется как общий совокупный результат взаимодействий организмов в экосистеме. Функциональное разнообразие организмов является показателем стабильности и устойчивости экосистемы [5].

Исследований изменения функционального разнообразия почвенной микобиоты при низких температурах до настоящего времени не проводилось.

Целью данной работы является оценка изменения структурного и функционального разнообразия микобиоты городских почв в условиях зимних температур. В фокусе данного исследования стоит вопрос изучения видовой и функциональной структуры сообществ микроскопических грибов городских почв при различных уровнях промораживания (-18, -2, +2 °C).

Объекты и методы

В качестве объекта исследования был выбран урбанозем (почвенно-мониторинговая площадка в СЗАО г. Москвы, ул. Виллиса Лациса). Содержание гумуса в верхнем горизонте А составляет 2,75%, рН (водн.)=6,4. Отбор и анализ почвенных образцов урбанозема проводился в начале ноября 2012 и 2013 гг. Лабораторные эксперименты проводили в термостате, где проводилось промораживание и оттаивание почвы в течение трех суток при температурах -18, -2, +2 °C. Температура -18 °C была взята как экстремальная; такое промораживание потенциально возможно для почв открытых пространств без снегового покрова. Температура -2 °C соответствует типичному значению для поверхностных горизонтов зональных дерново-подзолистых почв в зимний период. +2 °C – температура оттаивания почв исследуемого региона.

Оценку функционального разнообразия микроскопических грибов проводили методом мультисубстратного тестирования [6]. Набор субстратов, использованных в экспериментах, включал следующие вещества: арабиноза, галактоза, глюкоза, мальтоза, рибоза, сахароза, ксилоза, целлобиоза, аланин, цистеин, изолейцин, фенилаланин, гистидин, глутамин, лизин, серин, аспаргин, креатин, N-ацетилглюкозамин, дульцит, маннит, янтарная кислота. Приготовление планшетов с субстратами для анализов проводили самостоятельно. Предварительно в каждую лунку была внесена жидкая смесь среды Чапека (двойная стандартная концентрация, объем 100 мкл) с определённым органическим субстратом в концентрации 0,02 г/мл. Для проведения анализа из каждого смешанного образца готовили 25 мл почвенной суспензии с разведением 1:50, встряхивали на вортексе 2 мин, а затем центрифугировали в течение 3 мин (1000 оборотов/мин). Для предотвращения роста бактерий использовали раствор стрептомицина с концентрацией 70 мг/мл, 300 мкл которого смешивали с отобранным супернатантом. Приготовленную для анализа смесь вносили с помощью многоканального дозатора в лунки планшета с сухими субстратами в объёме 100 мкл. Для оценки роста грибов был использован кинетический подход: измерение оптической плотности (при 405 нм) вели каждые полчаса в течение 70-72 часов инкубации непосредственно в фотометре Sunrise (Tecan) при режиме встряхивания в течение 5 секунд

перед измерением. Для сравнения полученных данных был использован метод трапеций для подсчета площадей под кривыми потребления субстратов. После регистрации в фотометре оптической плотности, проводили просмотр ячеек под оптическим микроскопом для оценки роста грибов и исключения возможности бактериального заражения. Из ячеек с наиболее интенсивным развитием грибов делали посев на агаризованную питательную среду Чапека (сахароза 30 г/л, натрия нитрат 2,0 г/л, калия гидрофосфат 1,0 г/л, магния сульфат 0,5 г/л, калия хлорид 0,5 г/л, железа сульфат 0,01 г/л, агар-агар 15,0 г/л) (с добавлением стрептомицина в качестве бактериального ингибитора).

Оценку видовой структуры сообществ культивируемых микроскопических грибов в лабораторных экспериментах с урбаноземом проводили методом посева из почвы на твердую агаризованную среду Чапека разведением 1:100. Все засеянные чашки инкубировали при температуре 25-27 °С в течение 7-10 дней, после чего проводили идентификацию культур. Определение видов производилось по культурально-морфологическим признакам [7]. Структуру, а также изменение функционального разнообразия грибных комплексов урбанозема характеризовали при помощи показателей обилия основных групп видов и индекса Шеннона.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

В результате исследования установлено, что грибами исследуемого урбанозема потребляется довольно широкий спектр органических веществ: глюкоза, мальтоза, ксилоза, сахароза, целлобиоза, арабиноза, глутамин и аспарагин, маннит, N-ацетилглюкозамин. Промораживание почвы при -18 °С дает отчетливое снижение функционального разнообразия потребляемых субстратов. В то же время при обычной температуре промораживания почвы (-2 °С) существенных отличий в разнообразии потребляемых грибами субстратов не отмечается (табл. 1). Таким образом, серьезные изменения в функциональном разнообразии потребляемых субстратов потенциально могут произойти в зимний период в почвах открытых пространств, не защищенных снежным покровом.

Таблица 1

Изменение индексов функционального разнообразия (Шеннона) грибных комплексов урбанозема в лабораторных экспериментах (70 часов инкубации)

Год	Контроль	-18 °С	-2 °С	+2 °С
2012	3,34	1,98	-	2,21
2013	3,68	-	3,34	3,52

После промерзания исследуемых образцов почв при их оттаивании в лабораторных экспериментах (+2 °С) в целом наблюдается некоторое увеличение набора потребляемых субстратов по интенсивности развития на них грибов, при этом в наибольшей степени это видно по развитию грибов на ксилозе и N-ацетилглюкозамине (рис. 1).

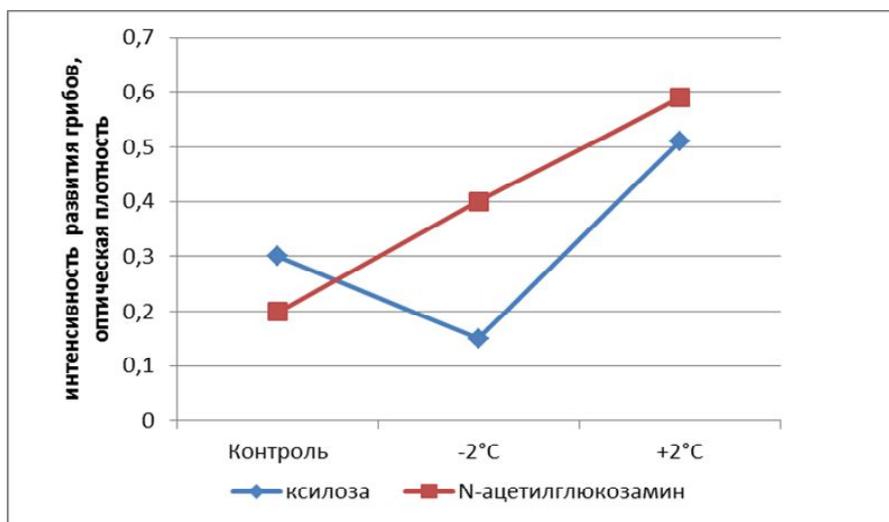


Рис. 1. Интенсивность развития грибов на ксилозе и N-ацетилглюкозамине в лабораторных экспериментах с промораживанием-оттаиванием городских почв

Это подтверждается и при подсчете площадей с помощью метода трапеций под кривыми потребления грибами субстратов. Данный метод применяется для оценки реакции популяций на воздействие экологических факторов, например для подсчета повременной суммарной численности клеток популяции в качестве интегрального способа оценки эффекта токсиканта [8] (табл. 2, рис. 2).

Таблица 2

Значение площадей под кривыми потребления некоторых субстратов в лабораторных экспериментах (оптическая плотность)

Субстрат	Исходный вариант	При -2 °С	При +2 °С
Ксилоза	5,0	3,4	9,8
N-ацетилглюкозамин	3,3	6,3	13,6

Таким образом, показано, что в результате промораживания-оттаивания может происходить стимуляция развития грибов, потребляющих эти субстраты (рис. 2). Данный аспект интересен с точки зрения экологии городских почв, поскольку эти вещества содержатся в определенных компонентах экосистем. Источником поступления ксилозы в почву может быть растительный опад или вещество клеточных стенок ряда базидиальных

грибов, поскольку ксилоза входит в состав полисахаридов гемицеллюлозы матрикса клеточной стенки. N-ацетилглюкозамин является мономером хитина – основного компонента экзоскелета членистоногих и ряда других беспозвоночных, а также входит в состав клеточной стенки грибов. Показано, что при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ не происходит потребления N-ацетилглюкозамина, тогда как при -2 и $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ данный субстрат потребляется грибами активно. В экспериментах с урбаноземом 2013 г. отмечается даже увеличение интенсивности потребления N-ацетилглюкозамина с увеличением температуры (табл. 2).

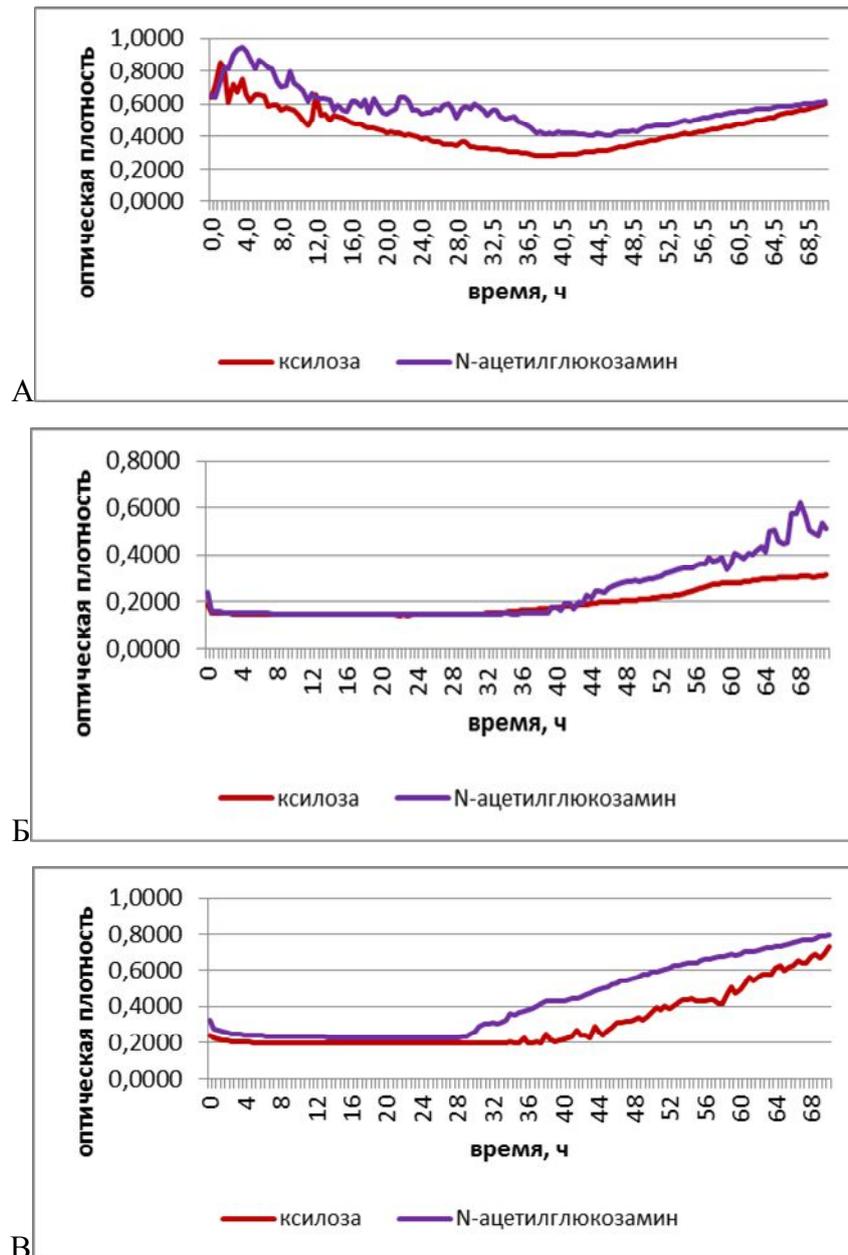


Рис. 2. Развитие грибов на ксилозе и N-ацетилглюкозамине при промораживании-оттаивании городских почв. А – потребление субстратов в исходном варианте. Б – потребление субстратов при $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. В – потребление субстратов при $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Помимо прочего, одним из чувствительных показателей на температурное воздействие было изменение длительности лаг фазы при потреблении субстратов грибами. При промораживании-оттаивании в эксперименте наблюдалось отчетливое отличие по изменению времени начала потребления субстратов. По сравнению с замороженными почвами для оттаивающих наблюдалась меньшая лаг-фаза. Особенно четко это прослеживается по развитию грибов на аминокислотах (рис. 3).

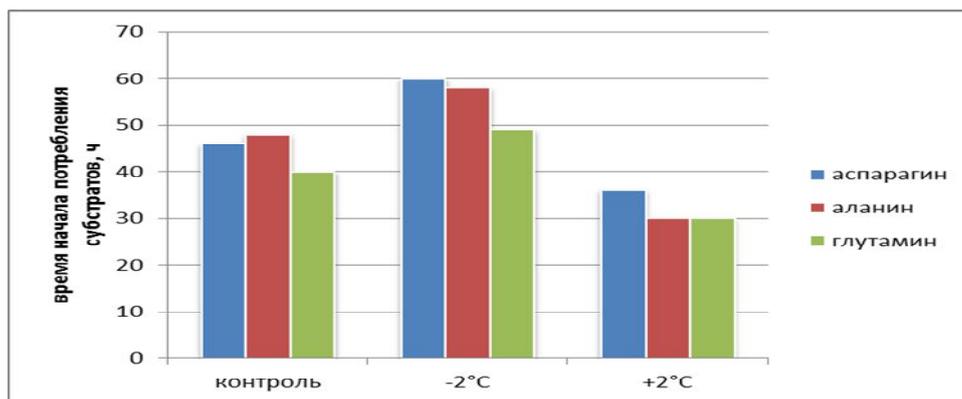


Рис. 3. Время начала потребления ряда органических субстратов грибами в экспериментах с промораживанием и оттаиванием урбаноземов

Таким образом, в результате оттаивания возможно более быстрое начало развития грибов, растущих на аминокислотах. Полностью объяснить наблюдаемые явления пока сложно. Возможно, более быстрое и активное потребление аминокислот определяется более выгодным использованием в стрессовых условиях более богатых по питательным веществам субстратов. Более быстрое начало потребления субстратов может быть связано со снятием явления фунгистазиса. Фунгистазис определяется экзогенным (зависящим от внешних факторов) и конститутивным (внутренним) покоем грибных спор. В данной ситуации воздействия низких температур, возможно, могут работать оба механизма.

При анализе видовой структуры показано, что наибольшее ее изменение происходит в почвах при оттаивании (+2 °C), при этом выделяется ряд фито- и энтомопатогенных видов родов *Beauveria*, *Fusarium* (табл. 3).

Таблица 3

Видовой состав и обилие (%) культивируемых микроскопических грибов в урбаноземмах в эксперименте замораживания-оттаивания (-2, +2 °C)

Виды	Обилие, %		
	Контроль	-2 °C	+2 °C
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	0,5	-	3,1

<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	1,4
<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	-	22,2	16,9
<i>Fusarium graminearum</i> (Schwein) Petch	-	4,9	6,5
<i>Humicola</i> sp.	-	14,6	-
<i>Mortierella</i> sp.	10,4	6,0	13,8
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	11,9	10,2	6,7
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	2,5	2,5	6,9
<i>P. decumbens</i> Thom	-	3,6	-
<i>P. janczewskii</i> K.M. Zalessky	1,8	14,4	-
<i>P. jantinellium</i> Biourge	-	-	16,8
<i>P. melinii</i> Thom	47,4	-	-
<i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	11,6	-	-
<i>Penicillium</i> spp.	0,5	-	-
<i>P. waksmanii</i> K.M. Zalessky	-	13,5	19,0
<i>Phoma</i> sp.	0,6	1,0	-
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai	4,2	-	-
<i>Verticillium tenerum</i> Nees	2,8	-	-
Стерильный мицелий	5,8	7,1	8,9

При выделении на питательную среду в контрольном варианте без температурного воздействия доминируют виды рода *Penicillium* (*P. melinii*, *P. simplicissimum* и др.), а также представители р. *Mortierella*. Показано, что они сохраняются в почвах и после замораживания-оттаивания, но виды рода *Penicillium* выделяются в меньшей степени. В экспериментах отмечалось, что после промораживания из почв обильно (до 22,2%) начинает выделяться *Clonostachys rosea*. Из почв после промораживания также выделяются *Humicola* sp., *P. janczewskii*, *Fusarium graminearum*. При оттаивании после замораживания, из образцов урбаноземов обильно выделяется *Clonostachys rosea* (16,9%), а также *P. jantinellium*, *P. waksmanii* (табл. 3).

Таким образом, в модельных экспериментах выявлено, что процессы промораживания-оттаивания могут оказывать влияние на функциональное разнообразие комплексов микроскопических грибов, что выражается в снижении индексов разнообразия потребляемых субстратов, задержки их потребления грибами в результате промораживания образцов. По сравнению с замороженными почвами при оттаивании отмечалась меньшая лаг-фаза начала потребления ряда субстратов почвенными грибами. Особенно четко это

прослеживается по развитию грибов на аминокислотах и сильнее проявляется после промораживания при низкой температуре -18 °С. В оттаивающих почвах отмечается активное развитие грибов на таких субстратах, как ксилоза и N-ацетилглюкозамин. Стоит также отметить, что одновременно как при выделении на наборе субстратов (на планшетах), так и при выделении посевом на питательную среду в урбаноземах при оттаивании отмечалось некоторое увеличение выделения фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* и энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana*.

Заключение

В ходе проведенного исследования показано, что снижение функционального разнообразия наблюдается при сильном промораживании (-18 °С), а при температурах, характерных для зональных зимних условий (-2 °С), отличий не выявлено. При оттаивании (+2 °С) промороженных почв происходит быстрое начало потребления грибами ряда аминокислот и интенсивности нарастания мицелия. В отличие от летнего периода, когда в урбаноземах доминировали представители р. *Penicillium*, зимой часто выделялись представители р. *Clonostachys*. После оттаивания исследованных городских почв отмечено более частое выделение из них энтомо- и фитопатогенных грибов (*Beauveria bassiana*, *Fusarium graminearum*).

Список литературы

1. Роль микроорганизмов в экологических функциях почв / Т.Г. Добровольская [и др.] // Почвоведение. - 2015. - № 9. - С. 1087-1096.
2. Hugh A.L.Henry. Soil freeze–thaw cycle experiments: Trends, methodological weaknesses and suggested improvements // Soil Biology and Biochemistry. – 2007. – Т. 39. - № 5. – P. 977-986.
3. Jansson J.K., Tas N. The microbial ecology of permafrost // Nature Reviews Microbiology. – 2014. - № 12. - P. 414-425.
4. Nikrad M.P., Kerkhof L.J., Häggblom M.M. The subzero microbiome: microbial activity in frozen and thawing soils // FEMS Microbiology Ecology. - 2016. - Т. 92. - № 6.
5. Sobek E.A., Zak J.C. The Soil FungiLog procedure: method and analytical approaches toward understanding fungal functional diversity // Mycology. - 2003. - Т. 95. - № 4. - P. 590-602.
6. Горленко М.В. Мультисубстратное тестирование природных микробных сообществ / М.В. Горленко, П.А. Кожевин. - М.: МАКС Пресс, 2005. – 88 с.
7. Domsch K.H., Gams W., Andersen T.H. Compendium of soil fungi. – New York: Acad. Press, 2007. - P. 672.

8. Дятлов С.Е., Петросян А.Г. *Phaeodactylum tricornutum* Bohl. (Chrysophyta) как тест-объект. Диапазон соленостной резистенции // Альгология. - 2001. - Т. 11. - № 2. - С. 259-264.