



УДК 631.41

Н.Д. Сорокин, Е.Н. Афанасова, В.А. Сенашова

МИКРОБНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ФИЛЛОСФЕРЫ КАК ИНДИКАТОРЫ СОСТОЯНИЯ ДРЕВОСТОЕВ-ЭДИФИКАТОРОВ

N.D. Sorokin, E.N. Afanasyova, V.A. Senashova

MICROBIAL PHYLLOSHERE COMPLEXES AS STATUS INDICATORS OF TREE STANDS- EDIFICATORS

Сорокин Н.Д. – д-р биол. наук, проф., зав. лаб. микробиологии и экологической биотехнологии Института леса СО РАН им. В.Н. Сукачева, г. Красноярск. E-mail: afanasyova-elena@mail.ru

Афанасова Е.Н. – канд. биол. наук, доц. каф. биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, г. Красноярск. E-mail: afanasyova-elena@mail.ru

Сенашова В.А. – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. микробиологии и экологической биотехнологии Института леса СО РАН им. В.Н. Сукачева, г. Красноярск. E-mail: afanasyova-elena@mail.ru

Sorokin N.D. – Dr. Biol. Sci., Prof., Head, Lab. of Microbiology and Ecological Biotechnology, Institute of Wood, SBRAS named after V.N. Sukachyov, Krasnoyarsk. E-mail: afanasyova-elena@mail.ru

Afanasyova E.N. – Cand. Biol. Sci., Assoc. Prof., Chair of Biotechnologies, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk. E-mail: afanasyova-elena@mail.ru

Senashova V.A. – Cand. Biol. Sci., Senior Staff Scientist, Lab. of Microbiology and Ecological Biotechnology, Institute of Wood, SB RAS named after V.N. Sukachyov, Krasnoyarsk

Целью работы являлось исследование формирования микробных комплексов филлосферы на ценолитическом, популяционном и видовом уровне как индикаторов состояния древостоев-эдификаторов при разных внешних воздействиях. При анализе микрофлоры филлосферы древостоев Дороховского (зона интенсивного влияния ГРЭС) и Захаринского (в 70–80 км от ГРЭС) боров Красноярского края в зоне КАТЭКа установлено, что число микробных клеток на 1 г хвои в Дороховском бору в два раза больше, чем в Захаринском. Существенные различия отмечаются в качественном составе микроорганизмов. Эпифиты Захаринского бора на 96 % представлены неспорообразующими Гр(-) бактериями, близкими по таксономическому положению к роду *Pseudomonas*. В Дороховском бору 70 % эпи-

фитов составляют пигментные формы. Численность эпифитных микроорганизмов культур сосны и лиственницы в зоне активного техногенеза превосходит таковую на контрольном участке в 7–9 раз. Здесь доминируют спорозоносные бактерии (92 % на сосне и 96 % на лиственнице), а на культурах сосны контрольного участка – неспорообразующие формы (90 %). В исследуемом районе (Нижнее Приангарье) черный пихтовый усач переносит комплекс грибов синевы древесины, представленный главным образом видами *Ophiostoma curvicollis*, *Ophiostoma sp.* и *Leptographium sp.* Общая частота встречаемости этого комплекса в ходах вредителя достигла 90–100 % на пробных площадях в дефолированных шелкопрядом древостоях и не превышала 60 % на контрольном участке в ненарушенном древо-

стое. Исследование видового состава и численности микромицетов коры ели и пихты свидетельствует о зависимости этих показателей от вида и степени дефолиации кроны растения-хозяина и таким образом может являться адекватным индикатором состояния дерева на ранних стадиях его поражения. Анализ микрофлоры здоровой и пораженной хвои сосны обыкновенной и ели сибирской в лесопитомниках показывает, что мицелиальные грибы являются постоянными ее обитателями, но представлены в разном соотношении с преобладанием на больной хвое, у которой снижена фитонцидная активность.

Ключевые слова: микробные комплексы, филлосфера, древостои, офиостомовые микромицеты, антропогенные (техногенные) воздействия.

The aim of the research was to study the formation of microbial phyllosphere complexes in coenotic, population and species levels as indicators of tree stands- edificator under different external influences. In the analysis of microflora phyllosphere tree stands were Dorokhovskiy (zone of intensive effect HES) and Zakharinsky (70–80 km from HES) pinery found that the number of microbial cells in 1 g of pine needles in the Dorokhovskiy forest twice more than in the Zakharinsky. Significant differences were observed in the qualitative composition of microorganisms. Epiphytes of Zakharinsky pinery are represented by 96 % non-spore Gr-bacteria, similar in taxonomic position of the genus Pseudomonas. In Dorokhovskiy pinery epiphytes comprise 70 % pigment forms. The number of epiphytic microorganisms of cultures of pine and larch in the area of active technogenesis exceeds that of the control plot is almost 7–9 times. Here sporeforming bacteria predominate (92 % to 96 % pine and larch), and the control plot of pine cultures – asporogenous form (90 %). In the study the area (Lower Angara) a black fir sawyer beetle carried a complex of blue stain fungi presented species Ophiostoma curvicollis, Ophiostoma sp. and Leptographium sp. The total frequency of occurrence of this complex in the passages of the pest reached 90–100 % in test plots in defoliation by silkworm tree stands and does not exceed 60 % in the control plot in the undisturbed tree stand. The investigation of species composition and abundance micromycetes of bark of spruce and fir shows the dependence of these parameters on the type and degree of defoliation of the crown of the

plant host, and thus may be an adequate indicator of the condition of the tree in the early stages of its lesion. The analysis of microflora of healthy and diseased needles of Scots pine and Siberian spruce in forestry indicates that mycelium fungi are its permanent inhabitants but presented in a different ratio to the prevalence in the diseased needles, which phytoncide activity is reduced.

Keywords: microbial complexes, phyllosphere, tree stands, ophiostomatales micromycetes, anthropogenic (technogenic) effects.

Введение. Микробные реакции на воздействие различных нарушающих факторов проявляются быстро и достаточно отчетливо, что позволяет в короткие сроки выявить наиболее нарушенные экологические зоны, экосистемы и отдельные компоненты, прогнозировать их состояние при сохранении или устранении антропогенного фактора [2, 3, 5, 7, 11, 12].

Из приведенных в литературе материалов очевидно, что наиболее полно микробиологическая индикация и диагностика исследована для почвенных и ризосферных биогоризонтов лесных экосистем и связана в большей степени с антропогенными (техногенными) нарушениями корнеобитаемой зоны фитоценоза. Однако верхняя часть фитоценозов филлосфера также подвергается мощному антропогенному влиянию поллютантов промышленных предприятий, радиоактивному загрязнению и дополнительному воздействию насекомых-вредителей и микроорганизмов фитопатогенов. Поэтому ассоциации эпифитных микроорганизмов, обитающих на поверхности листовых пластинок и корней, принимают на себя первый «удар» техногенеза, выполняют функцию защитников и индикаторов состояния дерева. При этом индикаторная роль микроорганизмов филлосферы древесных видов растений изучена слабо.

Цель исследования: изучение формирования микробных комплексов филлосферы на ценотическом, популяционном и видовом уровне как индикаторов состояния древостоев-эдификаторов при разного рода внешних воздействиях.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования в зоне КАТЭКа Красноярского края были микробные сообщества филлосферы сосновых насаждений Дороховского, Пионерского, Захаринского боров и Ададымских березовых насаждений. Эпифитные микроорганизмы изучались также на культурах сосны и лиственницы. Все указанные участки расположены

в 5–7 км от факела техногенных выбросов Назаровской ГРЭС; вне сферы влияния поллютантов находятся Ададымские березовые насаждения и культуры сосны южного склона хребта Арга. Сбор материала для микробиологического анализа проводился в период вегетации взрослых деревьев и культур в 2012–2014 гг. Образцы хвои отбирались на тридцати модельных деревьях. Всего проанализировано 90 образцов.

В Хакасии отбирали образцы для микологического анализа офиостомовых грибов филлосферы в зоне лесостепных лиственничников, отличающихся повышенной теплообеспеченностью, оптимальной для развития короэда *Ips cembrae* – основного переносчика микромицетов. Образцы пораженной древесины собирали также на горях в сосновых и сосново-лиственничных древостоях Нижнего Приангарья.

Объектом исследования в лесопитомниках Маганского и Уярского лесничеств Красноярского края являлась эпифитная микрофлора здоровой и больной хвои двух древесных пород: сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) и ели сибирской (*Picea obovata*).

При анализе эпифитной микрофлоры брали навеску 1 г хвои и делали смыв стерильной водой на качалке типа АБУ-6с в течение 10 мин. Для выявления грибов смыв с хвои (0,1 мл) высевали методом Коха на плотную среду Чапека. Бактерии определяли на рыбо-пептонном агаре (РПА), актиномицеты – на крахмало-аммиачном агаре. Культивирование проводили при температуре 25 °С. Микробиологический посев проводился в 3-кратной повторности. Достоверность результатов посева обеспечивают 270 определений. Данные обрабатывались при помощи Microsoft Excel 97 и Statistica 5. Все данные достоверны при уровне значимости $p = 0,05$.

Выросшие колонии микроорганизмов микроскопировали при увеличении в 1350 раз. Проводили количественный учет колоний споровых и неспоровых бактериальных форм, дрожжей, мицелиальных грибов, актиномицетов. С помощью метода Греггерсона (Gregersen) устанавливали способность бактериальных форм окрашиваться по Граму.

Идентификацию выделенных культур эпифитных микроорганизмов осуществляли по морфологическим, культуральным и физиоло-

гическим признакам с использованием определителей [4, 6, 8, 10].

Виды офиостомовых грибов идентифицировали на основании морфологических признаков анаморф и телеоморф [1].

Результаты исследования и их обсуждение. При анализе микрофлоры филлосферы древостоев Дороховского (зона интенсивного влияния ГРЭС) и Захаринского (в 70–80 км от ГРЭС) боров установлено, что число микробных клеток на 1 г хвои в Дороховском бору в два раза больше, чем в Захаринском (табл. 1). Существенные различия отмечаются в качественном составе микроорганизмов. Эпифиты Захаринского бора на 96 % представлены неспорообразующими Гр(-) бактериями, близкими по таксономическому положению к роду *Pseudomonas*. В Дороховском бору 70 % эпифитов составляют пигментные формы. Эпифитная микрофлора Ададымских березовых насаждений в численном отношении значительно превосходит микрофлору Дороховского и Захаринского боров и достигает 52 840 тыс. КОЕ на 1 г хвои. Объясняется это различие разным фитонцидным действием на микрофлору лиственных и хвойных пород. В составе микроорганизмов на листьях березовых насаждений возрастает до 30 % количество спорообразующих бактерий преимущественно рода *Bacillus*.

Численность эпифитных микроорганизмов культур сосны и лиственницы в зоне активного техногенеза превосходит таковую на контрольном участке в 7–9 раз. Здесь доминируют спороносные бактерии (92 % на сосне и 96 % на лиственнице), а на культурах сосны контрольного участка – неспорообразующие формы (90 %). Такая существенная разница в составе микробноценозов филлосферы объясняется влиянием частиц техногенных выбросов. За счет увеличения в микробных комплексах спорообразующих форм микроорганизмов повышается их устойчивость к высоким концентрациям техногенных загрязнителей, в составе которых преобладают соединения кальция, железа, магния, марганца, стронция, бария и кадмия.

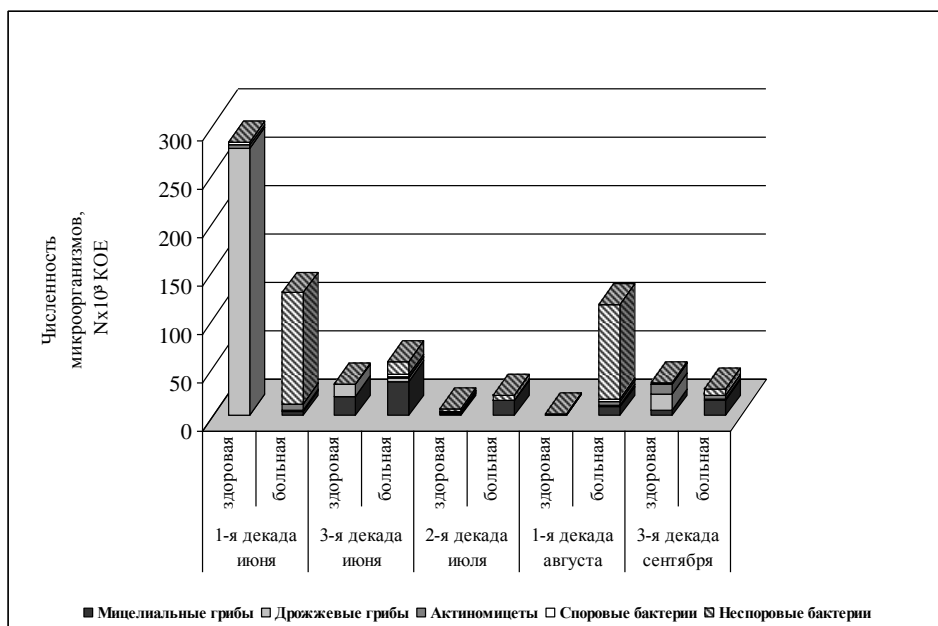
При учете биомассы эпифитных микроорганизмов и исследовании физиологической активности доминантных культур отмечено, что по мере приближения насаждений к источнику загрязнения (Назаровская ГРЭС) биомасса микроорганизмов возрастает, а физиологическая активность по отношению к азоту снижается. Снижение ферментативной активности микро-

организмов следует расценивать как вредоносную реакцию на те компоненты, которые попадают на поверхность древостоев в результате осаждения поллютантов.

При исследовании филлосферы древесных насаждений в лесных экосистемах Сибири вместе с эпифитными бактериями в качестве индикаторных микроорганизмов для оценки состояния дерева использовали офиостомовые грибы, ассоциированные в природе с насекомыми-ксилофагами [1, 9]. Установлено, что грибы синевы древесины являются обязательным компонентом грибных сообществ в ходах короеда-типографа и черного пихтового усача, доминируя среди других мицелиальных форм на первых этапах сукцессии грибов в поврежденных растительных тканях ели и пихты. В дефолиированных сибирским шелкопрядом древостоях ели и пихты сибирской грибы синевы древесины являются обязательным компонентом и основой микобиоты черного пихтового усача и короеда-типографа. Зарегистрированная частота встречаемости грибов свидетельствует об эпидемическом уровне их распространения в популяции вредителя на поврежденных участках (табл. 2). В исследуемом районе (Нижнее Приангарье) черный пихтовый усач переносит комплекс грибов синевы древесины, представленный главным образом видами *Ophiostoma curvicolis*, *Ophiostoma* sp. и *Leptographium* sp. Общая частота встречаемости этого комплекса в ходах вредителя достигла 90–100 % на пробных пло-

щадях в дефолиированных шелкопрядом древостоях и не превышала 60 % на контрольном участке в ненарушенном древостое. Исследование видового состава и численности микроорганизмов коры ели и пихты позволяет говорить о зависимости этих показателей от вида и степени дефолиации кроны растения-хозяина и таким образом может являться адекватным индикатором состояния дерева на ранних стадиях его поражения.

В ситуации, когда есть визуальные признаки поражения деревьев фитопатогенами (инфицированная и здоровая хвоя) комплексы эпифитных микроорганизмов существенно различаются по качественному и количественному составу. Анализ микрофлоры здоровой и пораженной хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) в лесопитомниках свидетельствует, что мицелиальные грибы являются постоянными ее обитателями, но представлены в разном соотношении с преобладанием на больной хвое. Максимальная численность эпифитных микроорганизмов на здоровой ($283 \cdot 10^3$ КОЕ) и пораженной ($127 \cdot 10^3$ КОЕ) хвое приходится на первую декаду июня и затем плавно понижается (рис.). Новый скачок численности, но меньший по уровню, у здоровой хвои регистрируется в сентябре – $33 \cdot 10^3$ КОЕ, а у больной хвои – в августе ($115 \cdot 10^3$ КОЕ). У здоровой хвои в первой декаде июня и в третьей декаде сентября дрожжи являются доминирующей культурой: их доля 97,5 и 47,5 % соответственно.



Динамика численности эпифитной микрофлоры сосны обыкновенной

Таблица 1

Численность, биомасса и физиологическая активность эпифитных микроорганизмов

Район	Число клеток на 1 г хвои или листьев	Биомасса, мг/г хвои или листьев	Преобладающая форма	Положительная реакция, %				
				на органический азот	на неорганический азот	на крахмал	на желатину	на каталазу
Ададымские насаждения	52840	0,21	Спорообразующие (30 %)	84	82	67	36	73
Захаринский бор	1400	0,012	Неспоровые (96 %)	57	64	72	36	63
Дороховский бор	2900	0,013	Пигментные (70 %)	37	46	6	13	7
Хребет Арга	2100	0,005	Неспоровые (86 %)	44	42	22	11	10
Культуры сосны	14500	0,05	Спорообразующие (92 %)	10	25	17	14	12
Культуры лиственницы	18400	0,06	Спорообразующие (96 %)	40	30	26	21	18

Таблица 2

Частота встречаемости грибов синевы древесины в тканях пихты сибирской, поврежденной черным пихтовым усачом

Тип леса	Период дефолиации	Встречаемость грибов, %			
		общая	<i>Leptographium</i> sp.	<i>Ophiostoma</i> sp.	<i>O. curvicollis</i>
Контроль	0	60	60	0	0
ПОР	1994–1995 гг.	96	68	28	60
ПОР	1995–1996 гг.	100	88	52	16
ПМЗ	1995 г.	100	100	63	29
ПРО	1994–1995 гг.	84	68	52	48

Примечание: ПОР – пихтарник осочково-разнотравный; ПРО – пихтарник разнотравно-осочковый; ПМЗ – пихтарник мелкоотравно-зеленомошный.

Заключение. Результаты анализа микробных комплексов филлосферы древесных пород в зоне активного антропогенного (техногенного) воздействия показывают, что микробные комплексы служат инструментом индикации и мониторинга состояния фитоценоза на ранних стадиях его поражения.

Численность эпифитных микроорганизмов, соотношение спорозоносных и неспорозоносных форм, наличие пигментированных бактерий являются критериями степени техногенного воздействия Назаровской ГРЭС на древостои.

Негативное состояние насаждений в результате нарушающих воздействий (дефолиация сибирским шелкопрядом) диагностируется высокой частотой встречаемости комплекса офиостомовых грибов, ассоциированных с насекомыми-ксилофагами.

Структурные изменения в количественном соотношении различных групп эпифитных микроорганизмов на здоровой и пораженной инфекцией хвое связаны не только с фенофазой роста и развития деревьев, но и с их фитонцидной активностью.

Литература

1. Афанасова Е.Н., Пашенова Н.В. Взаимоотношения офиостомовых грибов, переносимых насекомыми-ксилофагами, между собой и другими микромицетами хвойных пород Сибири // Микология и фитопатология. – 2005. – Т. 39. – № 2. – С. 62–65.
2. Горленко М.В. Функциональное биоразнообразие почвенных микроорганизмов: подходы к оценке // Перспективы развития почвенной биологии. – М.: Наука, 2001. – С. 228–234.
3. Гузев В.С. Экологическая оценка антропогенных воздействий на микробную систему почвы: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М.: Изд-во МГУ, 1988. – 38 с.
4. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. – М.: Академкнига, 2002. – 282 с.
5. Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 71 с.

6. Красильников Н.А. Определитель бактерий и актиномицетов. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1949. – 829 с.
7. Никитина З.И. Микробиологический мониторинг наземных экосистем. – Новосибирск: Наука, 1991. – 219 с.
8. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. – М.: Мир, 1997. – Т. 1, 2. – 800 с.
9. Пашенова Н.В., Ветрова В.П., Матренина Р.М. и др. Офиостомовые грибы в ходах листовичного короада // Лесоведение. – 1995. – № 6. – С. 61–67.
10. Скворцова И.Н. Идентификация почвенных бактерий. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 63 с.
11. Сорокин Н.Д. Микробиологический мониторинг лесных экосистем Сибири при различных антропогенных воздействиях // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 137–169.
12. Сорокин Н.Д. Микробиологическая диагностика лесорастительного состояния почв Средней Сибири. – Новосибирск: Изд-во СОРАН, 2009. – 221 с.

Literatura

1. Afanasyova E.N., Pashenova N.V. Vzaimootnosheniya ofiostomovykh gribov, perenosimyyh nasekomymi-ksilofagami, mezhdu soboj i drugimi mikromicetami hvojnykh porod Sibiri // Mikologija i fitopatologija. – 2005. – T. 39. – № 2. – S. 62–65.
2. Gorlenko M.V. Funkcional'noe bioraznoobrazie pochvennykh mikroorganizmov: podhody k ocenke // Perspektivy razvitija pochvennoj biologii. – M.: Nauka, 2001. – S. 228–234.
3. Guzev V.S. Jekologicheskaja ocenka antropogennykh vozdeystvij na mikrobnuju sistemu pochvy: avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk. – M.: Izd-vo MGU, 1988. – 38 s.
4. Dobrovol'skaja T.G. Struktura bakterial'nykh soobshhestv pochv. – M.: Akademkniga, 2002. – 282 s.
5. Dobrovol'skaja T.G., Skvorcova I.N., Lysak L.V. Metody vydelenija i identifikacii pochvennykh bakterij. – M.: Izd-vo MGU, 1989. – 71 s.
6. Krasil'nikov N.A. Opredelitel' bakterij i aktinom-icetov. – M.; L.: Izd-vo AN SSSR, 1949. – 829 s.