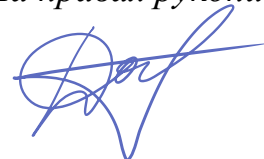


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Данилогорская Анастасия Александровна

**Таксономическая структура и функциональное разнообразие
сообществ микроскопических грибов в почвах при разных
температурах**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена на кафедре биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В.Ломоносова и в отделе Всероссийская коллекция микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

Научные руководители

– **Марфенина Ольга Евгеньевна**

доктор биологических наук

Качалкин Алексей Владимирович

кандидат биологических наук

Официальные оппоненты

– **Александрова Алина Витальевна** – доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра микологии и альгологии, ведущий научный сотрудник

Кирцидели Ирина Юрьевна – доктор биологических наук, ФГБУН Ботанический институт им. В.Л.Комарова Российской академии наук (БИН РАН), лаборатория систематики и географии грибов, старший научный сотрудник

Терехова Вера Александровна – доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», факультет почвоведения, кафедра земельных ресурсов и оценки почв, профессор

Защита диссертации состоится «19» декабря 2023 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

Тел. 8(495)939-35-46, электронная почта: nvkostina@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2780>.

Автореферат разослан «15» ноября 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.015.2,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. На сегодняшний день средняя приземная температура воздуха Земли возросла на $1,09 \pm 0,11$ °C по сравнению с 1850 г. и ожидается её дальнейший рост. Хотя прирост температуры к 2100 г. прогнозируется всего на несколько градусов (от 1,5–2,0 °C до 4,4 °C), он будет с высокой степенью вероятности сопровождаться увеличением частоты и длительности случаев экстремальной жары (IPCC, 2023). Температура почв является отличным комплексным индикатором происходящего потепления (Chen et al., 2021). В полевых экспериментах в отдельных природных зонах было показано, что её повышение не более чем на 6 °C может существенно влиять на структуру и функционирование почвенной биоты, в том числе и грибов, осуществляющих деструкцию органических веществ в почве, в том числе, что особенно важно, труднодоступных для других микроорганизмов. Повышение температуры почвы может затрагивать различные таксономические и экологические группы почвенных грибов (например, микоризообразующие, патогены растений и животных) и, соответственно, выполняемые ими функции. Однако пока в экосистеме не зафиксированы устойчивые изменения в других факторах среды (влажность почвы, содержание органического вещества почвы, глубина залегания вечной мерзлоты, растительное сообщество и др.), изменения в почвенном грибном сообществе если и происходят, то носят краткосрочный и обратимый характер и часто не выходят за рамки сезонных колебаний. Это значит, что воздействие повышенной температуры на природное почвенное грибное сообщество по современным данным носит скорее опосредованный характер и изменения в нём во многом будут определяться новыми условиями обитания (Baldrian et al., 2022). Но влияние экстремально высоких температур, характерных для учащающихся волн жары, в таких исследованиях рассматривают редко. Хотя сейчас есть данные, что это влияние может иметь отличные от умеренно повышенных температур последствия для почвенного грибного сообщества (Bei et al., 2023), сохраняющиеся в течение определённого времени (García-Palacios et al., 2021). Поэтому проведение лабораторных экспериментов, позволяющих изучать данную реакцию при регуляции остальных факторов среды, остаётся важным. Наиболее уязвимыми для потепления климата в связи с их адаптацией к низкотемпературным условиям, а также наиболее высокой скоростью роста приземной температуры, являются естественные экосистемы северных регионов. Однако для Европейской части России такие исследования не многочисленны (Шишкина, Шишкина, 2022). Обделены вниманием и городские почвы данного региона, существующие в условиях городского острова тепла (Lokoshchenko, 2014) и представляющие особый интерес в связи с немалым содержанием и возможностью дальнейшего накопления в них потенциально патогенных для человека видов грибов (Марфенина, 2005).

Цель работы — оценка изменения таксономической структуры и функционального разнообразия грибных сообществ в почвах разных типов в условиях повышенных температур.

Задачи исследования:

1. Исследование в процессе сукцессии в природных (Al-Fe-гумусовом подзоле, дерново-подзолистой почве) и антропогенной (урбанозёме) почвах при характерных летних (10, 20 °C) и повышенных (30, 35 °C) почвенных температурах:
 - содержания лабильных форм углерода и азота;
 - таксономической структуры комплексов культивируемых микроскопических грибов;
 - функционального разнообразия комплексов культивируемых микроскопических грибов.
2. Сравнительный анализ видового и функционального разнообразия грибных комплексов почв, развивающихся при стандартных и повышенных летних температурах.
3. Оценка развития потенциально патогенных грибов в разных почвах при повышенных температурах.

Объекты исследования. Исследование проводилось на образцах двух природных почв: Al-Fe-гумусовом подзоле (Histic Leptosol), типичном для высоких широт, на территории Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ им. М.В. Ломоносова и дерново-подзолистой почве (Umbric Albeluvisol), типичной для бореальных широт Европейской части России, на территории ненарушенной зоны лесного заказника «Алёшкинский лес» природно-исторического городского лесопарка «Тушинский» (г. Москва). В качестве антропогенной почвы был изучен урбанозём (Urbic Technosol) на территории СВАО г. Москвы.

Научная новизна. Впервые проведено исследование влияния повышенной температуры на формирование грибных комплексов подзола, дерново-подзолистой почвы и урбанозёма при их развитии из состояния покоя в условиях постоянной высокой ($w = 60\%$) влажности. Впервые оценен состав типичных видов в изученных почвах в зависимости от температуры инкубации. При 35 °C состав типичных видов подзола полностью изменился, ни один из вошедших в него видов не был типичен при других исследованных температурах. В дерново-подзолистой почве и урбанозёме при повышенной температуре в число типичных видов вошли, как встречающиеся при других температурах, так и не характерные для других температур виды, состав обновился на 14–17%. Наибольшие различия между комплексами типичных видов при разных температурах были выявлены в урбанозёме. Впервые показано, что наибольшее влияние температуры на богатство постоянно потребляемых субстратов было зафиксировано для грибных комплексов урбанозёма (при 35 °C оно упало на 44% по сравнению с таковым при 20 °C), а наименьшее — для грибных комплексов подзола, где оно практически не изменилось. В урбанозёме при повышенной температуре

наблюдался тренд к формированию более специфических, чем в природных почвах, грибных комплексов, как по видовому составу, так и по потенциальному функциональному разнообразию. Впервые обнаружено, что при повышении температуры инкубации возрастает количество видов, встречаемость и относительное обилие потенциально патогенных грибов из группы BSL-2 в сообществах всех исследованных почв (выделены виды, отсутствовавшие при 10 и 20 °С: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Scedosporium aurantiacum*).

Практическая значимость. В результате проведённых экспериментов Коллекция микроскопических грибов природных и антропогенных местообитаний Кафедры биологии почв была пополнена 20 штаммами прежде отсутствовавших в ней видов и родов, четыре из которых были помещены во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ F-4656, ВКМ F-4689, ВКМ F-4704, ВКМ F-4705), а их нуклеотидные последовательности депонированы в ГенБанки (ENA, NCBI, DDBJ) под номерами LT560380 — LT560383. Контроль за потенциально патогенными микроорганизмами в окружающей среде является одной из основных задач государственной политики РФ в области обеспечения химической и биологической безопасности (Указ Президента РФ N 97 от 11.03.2019 г.). Выполненная работа выявила большое видовое богатство и встречаемость потенциально патогенных микромицетов в почвах при повышенных температурах и высокой влажности, что указывает на необходимость мониторинга данных показателей и их возможное использование для прогнозирования степени опасности окружающей среды. В проведённых экспериментах была отработана модифицированная методика мультисубстратного тестирования для почвенных грибных комплексов, которая показала свою эффективность в определении влияния повышенных температур на грибные комплексы исследованных природных почв, а также выявлен наиболее информативный для этих целей биодиагностический субстрат (N-ацетил-D-глюкозамин).

Методология исследования. В работе были сконструированы микрокосмы и поставлен краткосрочный модельный эксперимент по влиянию температур на почвенное грибное сообщество в них. Для анализа результатов этого воздействия был применён сукцессионный подход. Содержание лабильного органического углерода и азота в почвах определяли путём экстракции в 0,05 М растворе K₂SO₄. Оценка видового разнообразия велась традиционным методом посева на твёрдую питательную среду. Видовая принадлежность микромицетов определялась по культурально-морфологическим признакам, а также молекулярно-генетическим методом с помощью секвенирования ITS1–5.8S–ITS2 участка рДНК. Также было оценено влияние температуры инкубации почв на отдельные эколого-функциональные группы грибов. Оценка функционального разнообразия проводилась методом мультисубстратного тестирования, модифицированным для работы с мицелиальными грибами без использования красителя. Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Численность культивируемых грибов, их разнообразие и состав типичных видов в течение сукцессии при разных температурах зависят от типа почвы и доступности в ней углерода и азота, наименьшее видовое разнообразие во всех исследованных почвах характерно для температуры инкубации 35 °С.
2. Наиболее выраженная перестройка структуры (по относительному обилию и видовому составу) сообщества почвенных микромицетов происходит при 35 °С по сравнению с 10, 20 и 30 °С во всех изученных почвах.
3. Наибольшее влияние температуры на число постоянно потребляемых субстратов, выявленных методом МСТ, характерно для грибных комплексов урбанозёма, а наименьшее — для грибных комплексов подзола.
4. Инкубация при повышенных (30 и 35 °С) температурах по сравнению с 10 и 20 °С во всех исследованных почвах приводит к более высокой встречаемости и доли в сообществе потенциально патогенных мицелиальных грибов.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 151 странице, состоит из введения, обзора литературы, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, приложения. Список литературы включает в себя 248 источников, в том числе 201 на иностранном языке. Диссертационная работа иллюстрирована 4 таблицами и 15 рисунками.

Обоснованность и достоверность результатов. Результаты работы и выводы получены с использованием современных методов и оборудования, достоверность подтверждена статистически.

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследования автора за период с 2012 по 2016 гг. Автором самостоятельно было выбрано направление исследований, разработаны цели и задачи работы, получен основной объём экспериментальных данных, интерпретированы и обобщены полученные результаты, подготовлены публикации научных работ.

Апробация работы. Основные положения и материалы работы были доложены на 7 всероссийских и международных конференциях и съездах: 3-ий съезд микологов России (Москва, 2012), VIII Международная конференция «Проблемы лесной фитопатологии и микологии» (Ульяновск, 2012), VI Съезд общества почвоведов им. В.В. Докучаева (Петрозаводск, 2012), SUITMA 7: Soils of Urban, Industrial, Traffic, Mining and Military Areas (Польша, Торунь, 2013), Международная конференция молодых учёных «Изменение климата и природной среды Северной Евразии: анализ прогноз, адаптация» (Кисловодск, 2014), 3-ий Международный микологический форум (Москва, 2015), XVII Congress of European Mycologists (Португалия, Мадейра, 2015).

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Scopus и/или WoS и/или RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась

совместно с соавторами. Вклад автора в публикации был основополагающим.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность врачу-психиатру, психотерапевту к.м.н. А. А. Курсакову и психологу О. Ю. Родичевой за профессиональную психологическую помощь в процессе подготовки диссертации, старшему научному сотруднику лаборатории мицелиальных грибов ВКМ ИБФМ РАН к.б.н. Г. А. Кочкиной за свежий экспертный взгляд на результаты экспериментальной работы, старшему научному сотруднику АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологии» к.ф.-м.н. Ю. А. Яновичу за консультации по статистической обработке данных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе обозначена проблема потепления климата, приведены накопленные на текущий момент данные об изменении климатических параметров с конца XIX в. как по всему миру, так и на территории России, свидетельствующие о данной проблеме. Сообщается о возможных причинах и существующих на сегодня сценариях их дальнейшего изменения. Приведены данные о влиянии текущего потепления климата на температурный режим почв различных регионов, в т.ч. и России. Дан обзор современных представлений о механизмах влияния потепления климата на эмиссию CO₂ из почвы и лежащие в их основе изменения почвенного микробного сообщества. Уделено особое внимание почвенному грибному сообществу, подвергающемуся текущему росту приземной температуры воздуха, а также дан обзор результатов полевых экспериментов по влиянию на него прогнозируемого потепления.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на образцах природных почв: Al-Fe-гумусовом подзоле, типичном для высоких широт, на территории Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ им. М.В. Ломоносова и дерново-подзолистой почве, типичной для бореальных широт Европейской части России, на территории ненарушенной зоны лесного заказника «Алёшкинский лес» природно-исторического городского лесопарка «Тушинский» (г. Москва). В качестве антропогенной почвы был изучен урбанозём на территории жилой застройки СВАО г. Москвы. Основой исследования послужил краткосрочный лабораторный модельный эксперимент. Воздушно-сухие образцы каждой почвы (горизонт OF+N подзола и горизонт A дерново-подзолистой почвы и урбанозёма), просеянные через 3 мм сито, были распределены по контейнерам объёмом 1 л, таким образом, что толщина почвенного слоя в каждом контейнере составляла 4–5 см. Почву увлажняли до 60% от полной влагоёмкости. Контейнеры закрывали плёнкой Parafilm M для предотвращения испарения и заражения и помещали на календарный месяц в термостаты с четырьмя постоянными температурами: 10, 20, 30 и 35 °C. На третий день после увлажнения сухой почвы, т.е. после завершения рекомендуемого периода оживления почвенного микробного сообщества (Ананьева и др., 1993), а затем на 10, 17, 24, 31 сутки сукцессии из каждого

микроскопа отбирали образцы почв для дальнейшего анализа. Содержание лабильного органического углерода и азота в почвах определяли путём экстракции в 0,05 М растворе K_2SO_4 . Видовое разнообразие почвенных грибных комплексов исследовали методом посева на среду Чапека с использованием культурально-морфологических и молекулярно-биологических методов идентификации выделенных штаммов. Своеобразие грибных сообществ, сформированных при разных температурах инкубации почв, описывали с помощью понятия «комплекса типичных видов», т.е. комплекса видов, обладающих достаточно высокими значениями как пространственной, так и временной встречаемости в рассматриваемой почве. Пространственная встречаемость (ПВ) в проведённом эксперименте — соотношение количества повторностей (чашек Петри), в которых вид присутствовал, к общему количеству повторностей, а временная (ВВ) — соотношение количества сроков сукцессии, в которых вид был обнаружен, к общему количеству проанализированных сроков. Структура комплекса типичных видов: доминирующие (ПВ > 60% и ВВ > 60%), часто встречающиеся (ПВ > 30% и ВВ > 30%), редкие (ПВ < 10% и ВВ > 30%) (Мирчинк, 1988). Также был проведен анализ влияния температуры инкубации почв на отдельные эколого-функциональные группы грибов. Функциональное разнообразие определяли методом мультисубстратного тестирования (МСТ), модифицированного для работы с мицелиальными грибами изучаемых почв без использования красителя (по оптической плотности, длина волны 405 нм), которое также дополнительно анализировалось на шестые сутки. Использованный в экспериментах набор органических веществ для МСТ: сахара (L-арабиноза, D-галактоза, D-глюкоза, D-ксилоза, D-(+)-мальтоза, D-(-)-рибоза, сахароза, целлобиоза), аминокислоты (L-аланин, L-аспарагин, L-гистидин, L-глутамин, L-изолейцин, L-лизин, L-серин, L-фенилаланин, L-цистеин), амиды (креатин), амины (N-ацетил-D-глюкозамин), спирты (дульцит, D-(-)-маннит), полимеры (крахмал), органические кислоты (янтарная кислота). Статистическая обработка результатов (описательная статистика, расчёт индексов разнообразия, тест Краскела-Уоллеса, коэффициент корреляции Пирсона) проводилась в программах Microsoft Office Excel 2007, Statistica 7.0, MatLab 2014b. Для иллюстрации различий использовали кластерный анализ (Евклидово расстояние, метод объединения по Варду) и неметрическое многомерное шкалирование. Статистическую значимость различий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни, а также перестановочного теста и многофакторного перестановочного непараметрического дисперсионного анализа (Anderson, 2001). Для всех выполненных анализов уровень вероятности $p \leq 0,05$ рассматривался как статистически значимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание лабильных форм углерода и азота в почве при разных температурах инкубации

Температура и время сукцессии значимо повлияли на содержание лабильных форм углерода и азота во всех исследованных почвах. Динамика содержания лабильных

форм углерода в природных почвах при разных температурах была сходна: сохранение концентрации лабильного углерода при 35 °С на уровне высушенных образцов и падение при остальных температурах, которое в наибольшей степени было выражено при 20 °С (рис. 1). В урбанозёме, отличавшимся низким исходным содержанием лабильного углерода, сокращение произошло при всех температурах, однако в дальнейшем, к концу сукцессии стал наблюдаться незначительный тренд к его возрастанию (рис. 1). Содержание лабильных форм азота к концу сукцессии в дерново-подзолистой почве и урбанозёме возросло или имело тренд к росту при всех температурах, в подзоле же это было справедливо только для 35 °С, а при остальных температурах к концу сукцессии оно снизилось по сравнению с исходными высушенными почвенными образцами (рис. 2). Соотношение содержания лабильных форм углерода к азоту сократилось в процессе сукцессии во всех почвах при всех температурах. Последнее в литературе связывают с минерализацией органического вещества почв, в том числе и органических форм азота, которое сопровождается образованием продуктов их разложения — неорганических соединений азота, входящих в состав экстрагируемой фракции лабильного азота (Макаров и др., 2017). Таким образом, можно предположить, что в природных почвах причиной сохранения содержания лабильного углерода при 35 °С на уровне исходных образцов является не слабая интенсивность процессов минерализации, а, наоборот, высокая. Причём возможность поддержания такой концентрации, вероятно, была связана с высоким исходным содержанием общего органического вещества в данных почвах, наличием в них растительных тканей и мелких корней, которые остались после просеивания и могли служить дополнительным источником поступления лабильной органики (Feng, Simpson, 2009), а также вовлечением в процесс минерализации более труднодоступных органических соединений, что по литературным данным отмечается при высокой температуре инкубации почв (Copant et al., 2011). Отсутствие такого эффекта при 35 °С в урбанозёме, возможно, было связано с исходным низким уровнем содержания общей органики и её лабильных форм, меньшим количеством мелких корней и растительных тканей, оставшихся в почве после просеивания из-за отсутствия подстилки и выраженного травянистого яруса при отборе образцов. Также из литературы известно, что структура биомассы грибов в урбанозёмах отличается от природных почв: в них возрастает доля спор с одновременным сокращением длины мицелия (Марфенина, 2005) из чего можно предположить, что грибные комплексы присутствуют в них преимущественно в виде пула спор и им требуется больше времени для «активации» после высушивания и повторного увлажнения почвы. В совокупности эти факторы не дали возможности за первые трое суток сукцессии массово развиваться быстрорастущим видам, способным разлагать широкий спектр органических веществ, которые могли бы поддерживать пул лабильной органики при 35 °С на исходном уровне.

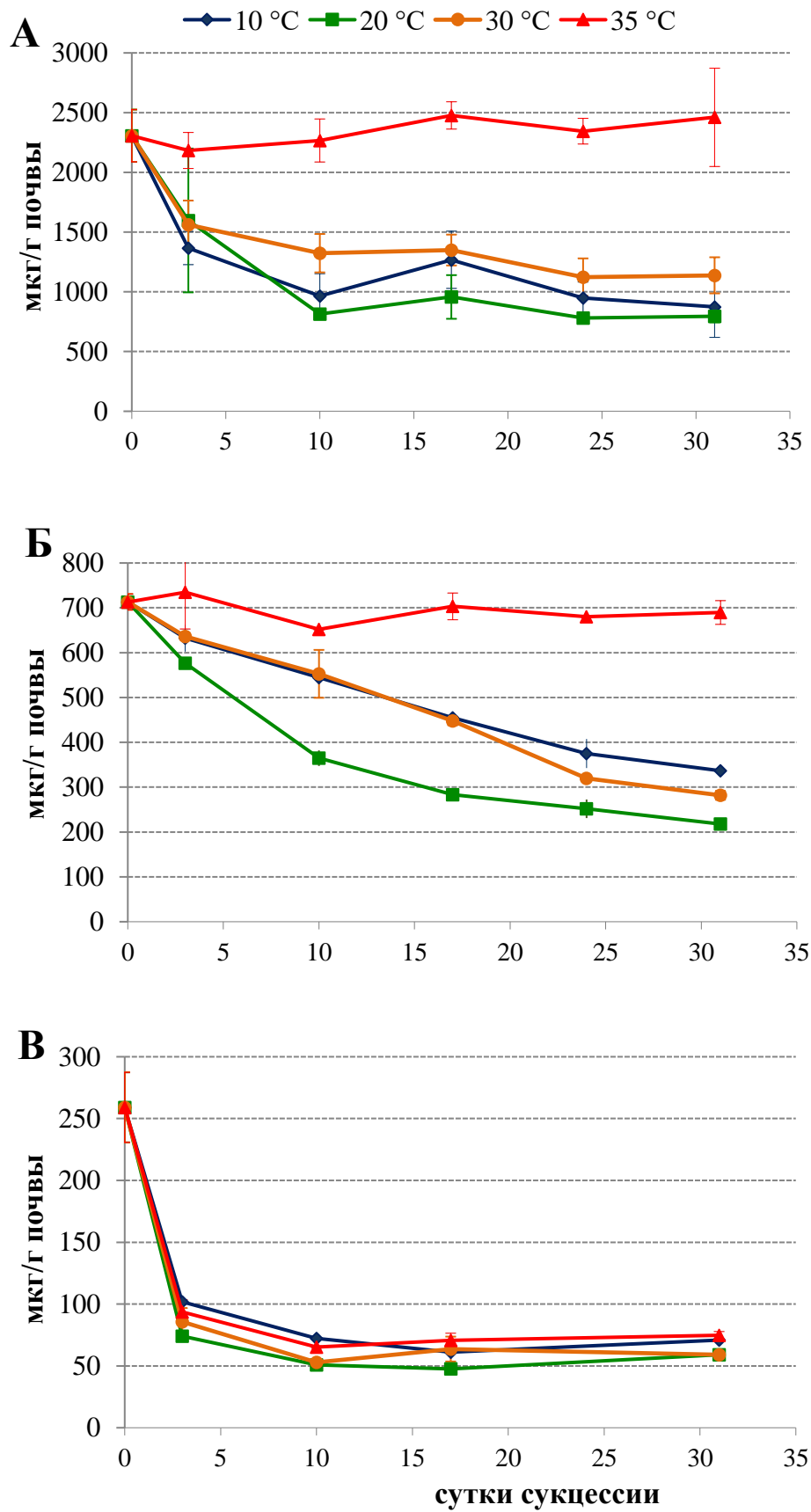


Рис. 1. Динамика содержания (среднее значение мкг/г \pm 95% доверительный интервал) лабильных форм углерода в почвах (А — подзол, Б — дерново-подзолистая почва, В — урбаноём) в течение сукцессии при разных температурах: 10, 20, 30, 35 °С.

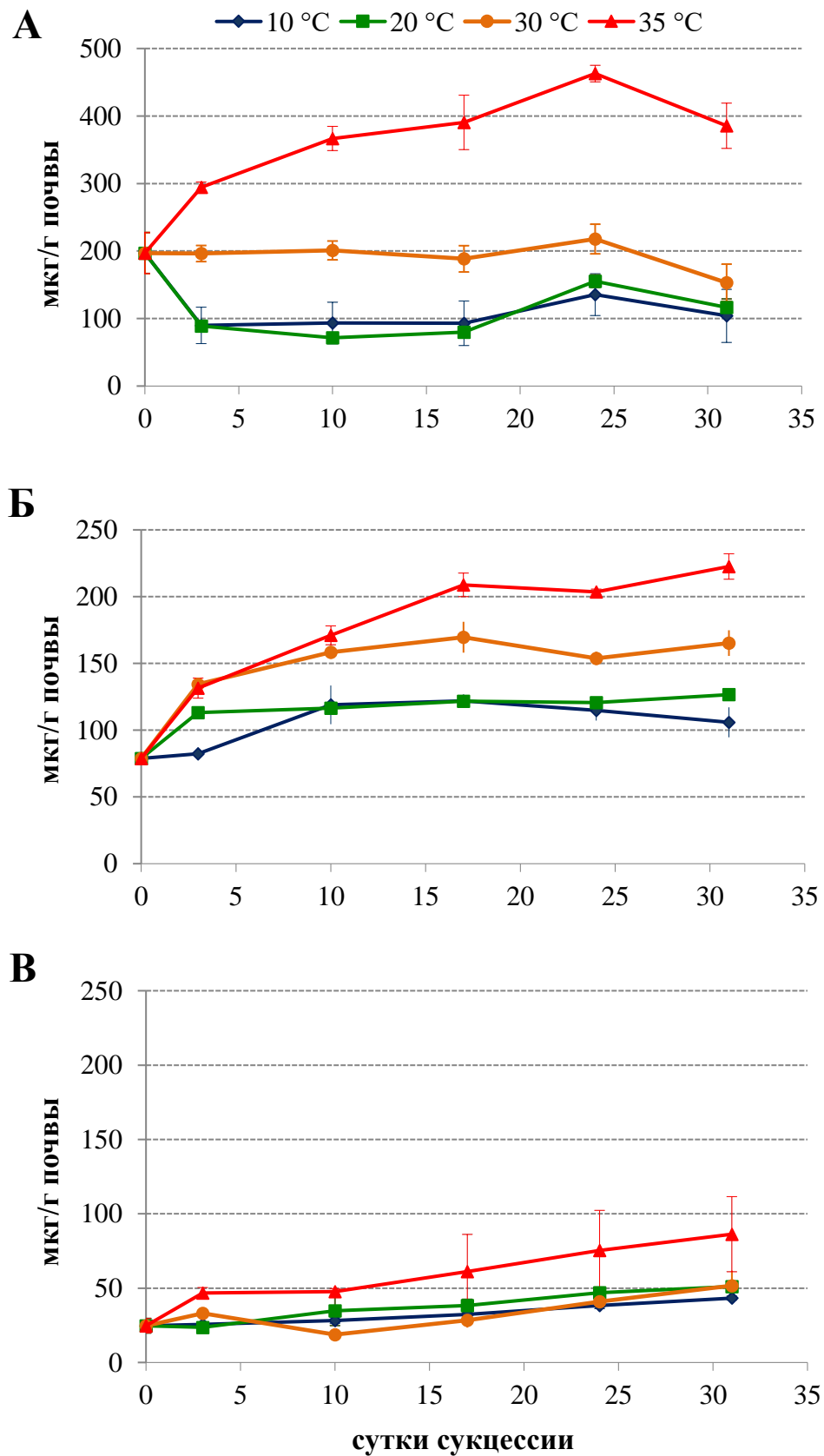


Рис. 2. Динамика содержания (среднее значение мкг/г \pm 95% доверительный интервал) лабильных форм азота в почвах (А — подзол, Б — дерново-подзолистая почва, В — урбано́зм) в процессе сукцессии при разных температурах: 10, 20, 30, 35 °С.

Характеристика почвенных грибных сообществ при разных температурах инкубации

В природных почвах численность (КОЕ) почвенных микромицетов обычно была тем выше, чем при более высокой температуре инкубировали почву, что было наиболее выражено в подзоле (рис. 3). Поскольку большинство колоний, растущих на твёрдых средах, развиваются из спор (Schmit, Lodge, 2005), такое увеличение численности при повышенной температуре возможно было обусловлено ускорением цикла развития: сокращением времени до начала спорообразования и увеличением его интенсивности у некоторых термотолерантных видов что, например, было показано для *Aspergillus terreus*, *A. sydowii*, *Neurospora discreta* (Иванушкина, 1984; Marfenina et al., 2010; Romero-Olivares et al., 2015). В урбанозёме же численность при разных температурах в течение всего эксперимента значимо не отличалась. При этом наиболее низкие значения индекса разнообразия Шеннона отмечались во всех почвах при 35 °C (рис. 4).

Общее количество видов микромицетов, выделенных при разных значениях температуры инкубации почвы, а также степень сходства (β_w , мера β -разнообразия Уиттекера) полного видового состава между исследованными температурами, возрастали в ряду подзол (32 вида; $\beta_w = 1,31$) — дерново-подзолистая почва (46 видов; $\beta_w = 1,06$) — урбанозём (60 видов; $\beta_w = 0,85$). Во всех почвах было выявлено по 2–4 вида, выделявшихся только при обеих повышенных (30 и 35 °C) температурах: в подзоле — *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, в дерново-подзолистой почве — *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Talaromyces verruculosus*, в урбанозёме — *Penicillium waksmanii*, *Pseudeurotium hygrophilum*, *Scedosporium aurantiacum*, *Wardomyces* sp.

Однако при рассмотрении комплекса типичных видов, характеризующих своеобразие почвенных грибных сообществ, наибольшие отличия в его составе при разных температурах инкубации были выявлены в урбанозёме ($\beta_w = 1,51$) (рис. 5). Комплекс типичных видов урбанозёма был наиболее богат видами при 10 °C (19 видов), редкие типичные виды вносили основной вклад в различия между разными температурами. При этом в литературе более богатый набор редких типичных видов рассматривается в качестве характерной черты городских почв при сравнении с зональными (Марфенина, 2005). В наименьшей степени температура повлияла на состав типичных видов дерново-подзолистой почвы ($\beta_w = 1,19$). Также в данных двух почвах комплексы при 30 °C занимали переходное положение между стандартными (10 и 20 °C) температурами и 35 °C, что было обусловлено присутствием в их составе типичных 10-, 20- и 35-градусных видов. В подзоле же мера β -разнообразия Уиттекера составила $\beta_w = 1,50$, грибной комплекс типичных видов, выделенных при 35 °C, не имел общих видов с другими температурами (рис. 5).

Влияние температуры на структуру грибных комплексов, определённую по относительному обилию видов, во всех почвах по данным MANOVA (Anderson, 2001) было статистически значимо (подзол: $F = -3,39$, $p = 0$; дерново-подзолистая почва:

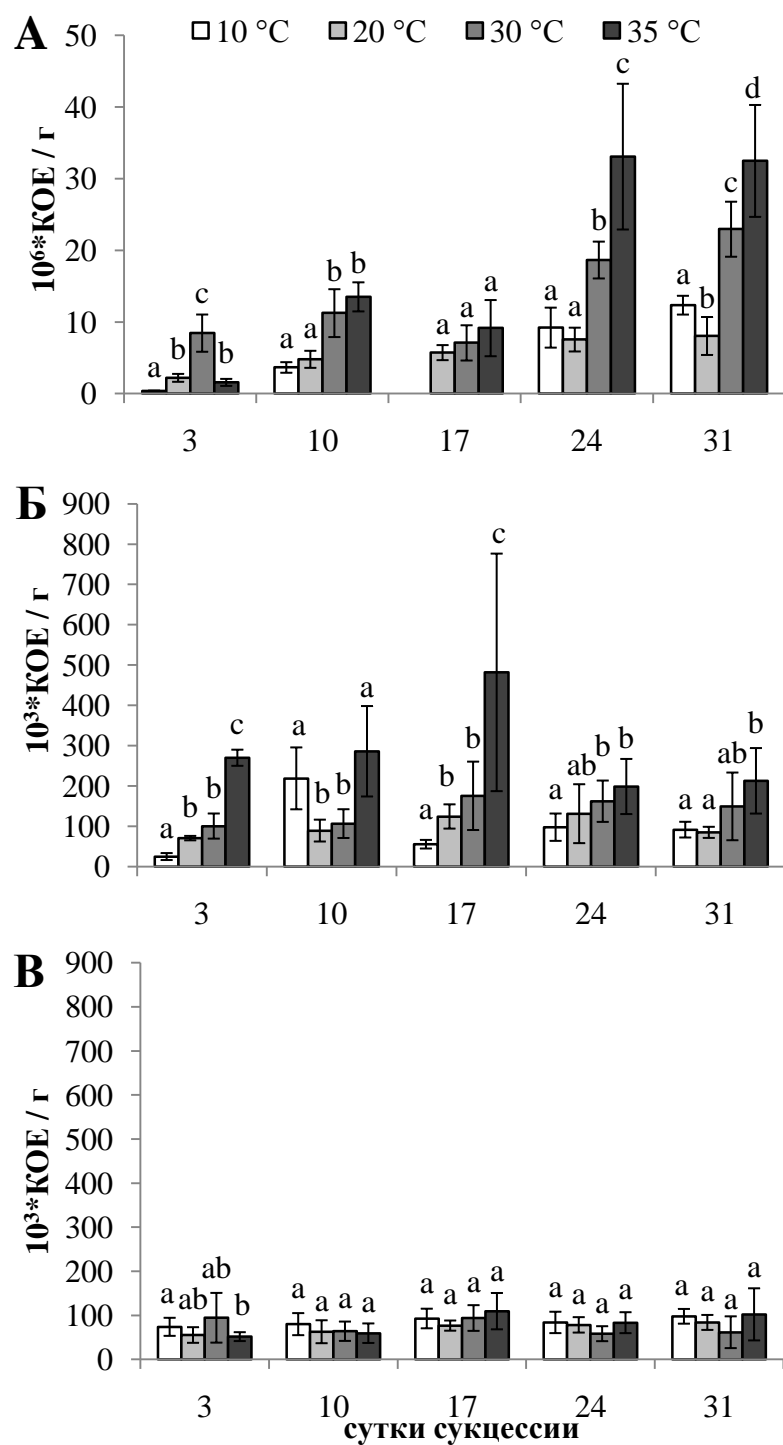


Рис. 3. Численность микромицетов (среднее значение КОЕ/г \pm 95% доверительный интервал) в подзоле (А), дерново-подзолистой почве (Б) и урбанозёме (В) в течение сукцессии при разных температурах (10, 20, 30, 35 °C). Средние значения численности при разных температурах, установленные для одного срока сукцессии и обозначенные одной и той же латинской буквой, статистически не различаются (U-критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

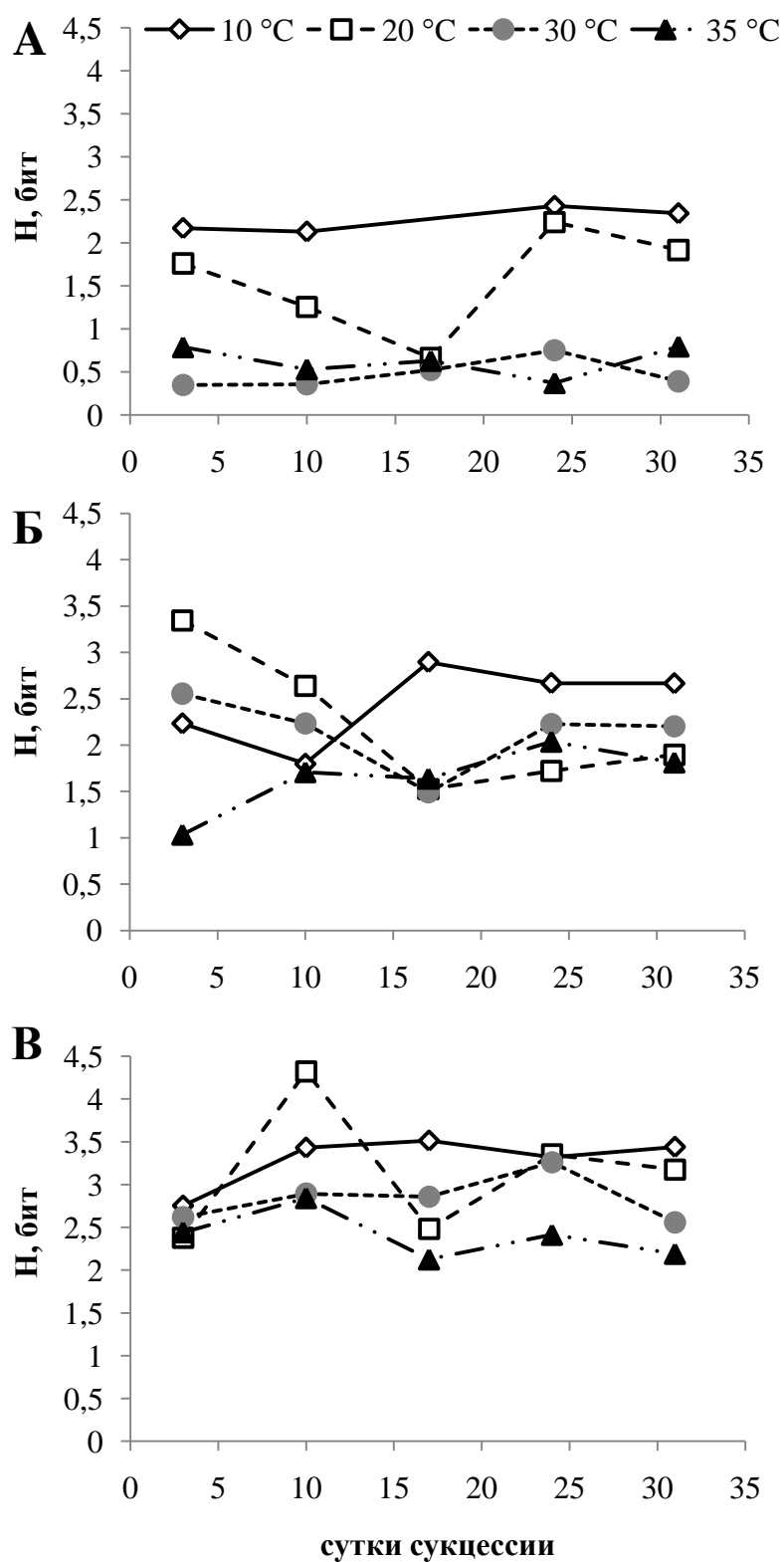
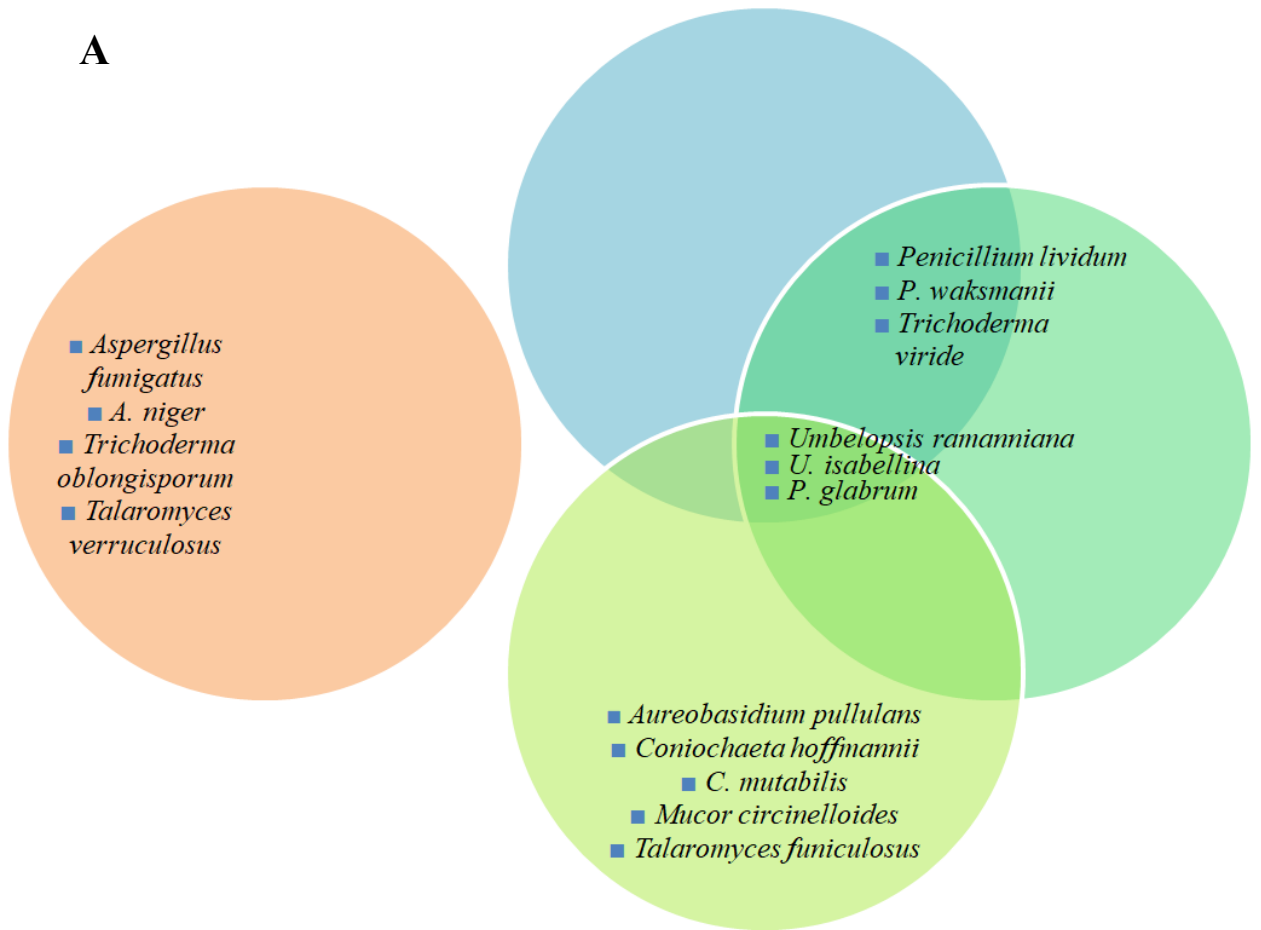


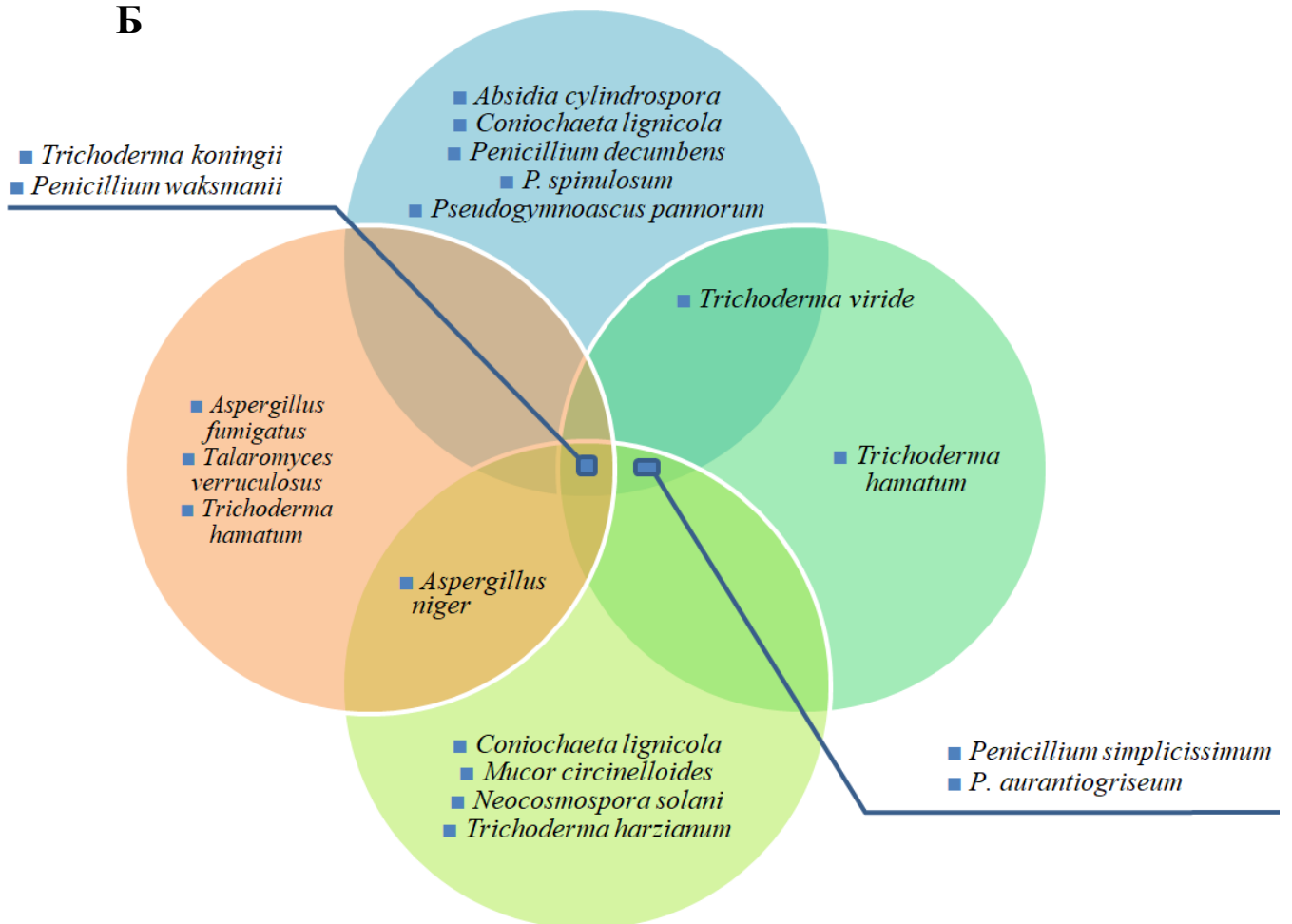
Рис. 4. Видовое разнообразие (индекс Шеннона H) комплексов микромицетов в подзоле (А), дерново-подзолистой почве (Б) и урбанозёме (В) в течение сукцессии при разных температурах (10, 20, 30, 35 °C).



A



B



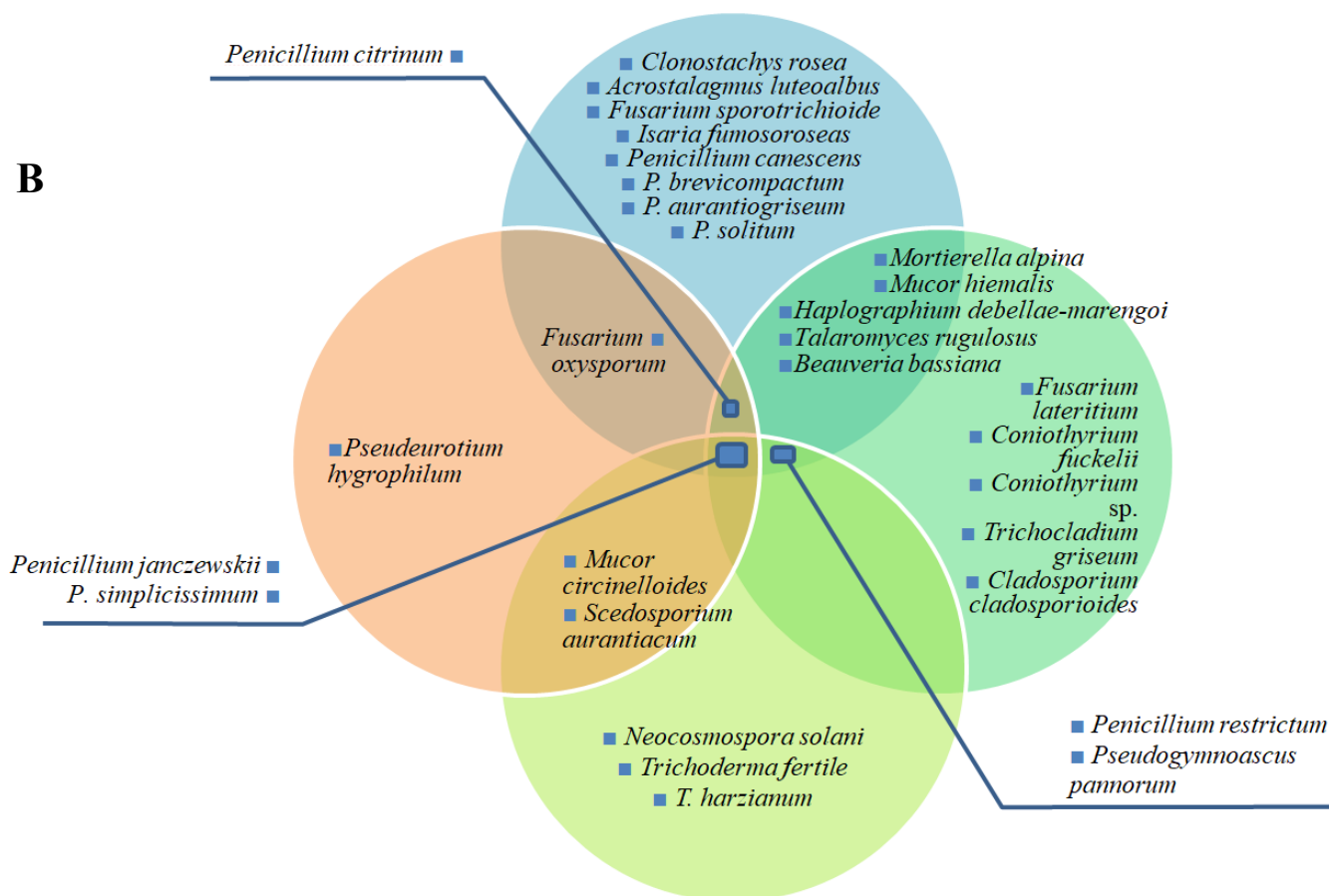


Рис. 5. Сравнение комплексов типичных видов микромицетов при 10, 20, 30 и 35 °С (А — подзол; Б — дерново-подзолистая почва; В — урбанозём).

$F = 28,03$, $p = 0$; урбанозём: $F = -31,89$, $p = 0$). В урбанозёме температура объясняла наибольший процент её вариабельности (92,08% в урбанозёме; 92,07% в дерново-подзолистой почве; 83,68% в подзоле). Однако при двумерной иллюстрации структуры грибных комплексов с помощью кластерного анализа и неметрического многомерного шкалирования, различия в ней между температурами инкубации убывали в ряду подзол — дерново-подзолистая почва — урбанозём (рис. 6).

Таким образом, температура в урбанозёме привела к формированию наиболее своеобразных комплексов типичных видов при всех исследованных температурах. В природных почвах в диапазоне 10–30 °С наиболее сильные различия наблюдались в структуре сообществ микромицетов, т.е. изменилось относительное обилие видов с менее выраженной, чем в урбанозёме, перестройкой основного ядра видов. Однако при 35 °С также, как и в урбанозёме, состав типичных грибных комплексов природных почв изменился значительно.

Во всех исследованных почвах при переходе к повышенным температурам инкубации в составе грибного сообщества появлялись виды с более высокими оптимальными температурами роста и одновременно сохранялись виды и с более низкими, чем заданная температура инкубации. При 35 °С все изученные почвы характеризовались наиболее высокими частотой встречаемости и относительным

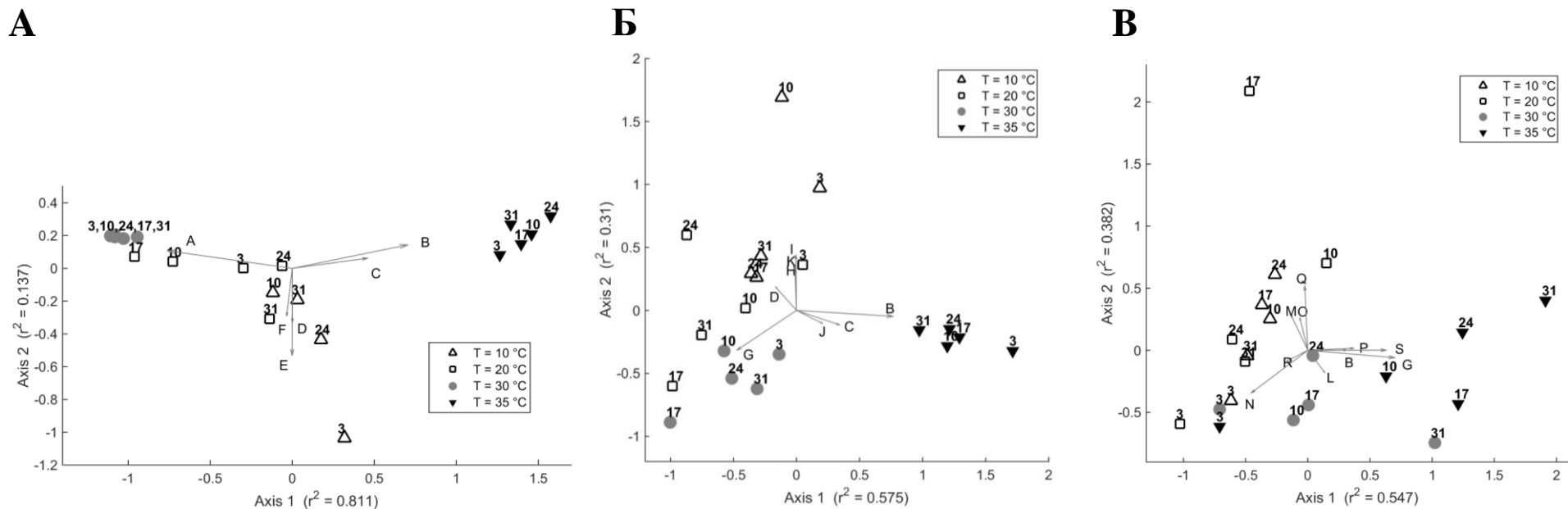


Рис. 6. Точечная диаграмма, полученная методом неметрического многомерного шкалирования, структуры почвенных грибных сообществ (А — подзол, Б — дерново-подзолистая почва, В — урбанозём) на разных стадиях сукцессии при 10, 20, 30 и 35 °С. Числа рядом с точками означают сутки сукцессии. Векторы означают виды, средние значения относительного обилия которых коррелируют с осями графика с коэффициентом корреляции $r \geq |0,5|$: А — *Umbelopsis isabellina*, В — *Aspergillus fumigatus*, С — *A. niger*, D — *Penicillium waksmanii*, Е — *P. thomii*, F — *Coniochaeta hoffmannii*, G — *P. simplicissimum*, H — *P. solitum*, I — *Pseudogymnoascus pannorum*, J — *Botrytis cinerea*, К — *Mucor hiemalis*, L — *M. circinelloides*, М — *Mortierella alpina*, N — *P. janczewskii*, О — *P. citrinum*, P — *Talaromyces funiculosus*, Q — *Trichoderma hamatum*, R — *Trichocladium griseum*, S — *Scedosporium aurantiacum*.

обилием среди всех изученных температур видов грибов, известных как потенциально патогенные для людей из группы BSL-2. Именно за счёт них происходила перестройка состава типичных видов и структуры по относительному обилию почвенных комплексов при этой температуре. *A. fumigatus*, который не выделялся из природных почв при 10 и 20 °С, стал доминирующим при 35 °С на всех стадиях сукцессии. Потенциально патогенный *S. aurantiacum* (de Hoog et al., 2020) был изолирован из урбанозёма в конце сукцессии при 30 и 35 °С. В эксперименте была зафиксирована положительная корреляция между температурой и относительным обилием данной группы потенциально патогенных микромицетов в исследованных почвах, а именно *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Paecilomyces variotii*, *Neocosmospora solani* (быв. *Fusarium solani*), *F. oxysporum* (относящихся в том числе и к микромицетам четвёртой группы патогенности согласно Приказа Минтруда России/ Минздрава России № 988н/1420н от 31 декабря 2020 г.) и *S. aurantiacum*. Причём несколько сильнее она была выражена в природных почвах (подзол: $r = 0,68$, $p = 0,00$; дерново-подзолистая почва: $r = 0,71$, $p = 0,00$), а чуть слабее — в городской ($r = 0,66$, $p = 0,00$). Упомянутые грибы обладают высоким адаптивным потенциалом и способны к росту при высоких температурах, не типичных для большинства грибов. Преобладание их при 35 °С еще раз подтверждает возможность связи потенциальной патогенности с высокой адаптивной способностью организма к различным стрессам.

Функциональное разнообразие грибных комплексов при разных температурах инкубации

В результате проведённых экспериментов и расчётов были получены данные по количеству субстратов, на которых с вероятностью не менее 93% развивался грибной мицелий. Количество и состав данных "потребляемых" субстратов для грибных комплексов исследованных почв при разных температурах различались. Возможность роста мицелия на конкретном субстрате определялась обилием и встречаемостью в почве грибов, способных на нем развиваться, а также зависела от степени оптимальности экологических условий для развития тех или иных видов. Поэтому количество субстратов, рост мицелия на которых фиксировали на всех стадиях сукцессии при заданной температуре, представляло наибольший интерес для обобщения полученных данных в качестве показателя функционального разнообразия доминирующих групп культивируемых микромицетов в разных почвах. Далее такой рост будет обозначен как стабильный или постоянный. Наибольшее влияние температуры на набор постоянно потребляемых субстратов было зафиксировано для грибных комплексов урбанозёма, а наименьшее — для грибных комплексов подзола (таблица 1). В урбанозёме было выявлено наибольшее количество (4) субстратов, на которых грибной мицелий развивался стабильно только при определённой температуре: это были крахмал, целлобиоза, фенилаланин, серин, аспарагин, рост мицелия на которых был постоянен в ходе сукцессии только при 20 °С. В подзоле таким субстратом

был только лизин при 35 °С, а в дерново-подзолистой почве — янтарная кислота при 30 °С и дульцит при 35 °С. Одновременно в городской почве при каждой температуре инкубации был выявлен специфический и достаточно широкий спектр редких типичных видов, что не было характерно для природных почв. Можно сделать предположение, что в этой почве при каждой температуре наблюдался тренд к формированию более специфических, чем в природных почвах, грибных комплексов, как по видовому составу, так и по потенциальному функциональному разнообразию.

Таблица 1

Количество субстратов, на которых грибной мицелий развивался на всех изученных сроках сукцессии

Температура, °С	Подзол	Дерново-подзолистая почва	Урбанозём
10	17	15	10
20	17	15	16
30	17	7	5
35	18	15	9
при всех температурах (идентичные субстраты)	17	6	4

Основной вклад в варьирование количества потребляемых веществ на каждом сроке сукцессии при разных температурах для природных почв вносили пять аминокислот (цистеин, изолейцин, фенилаланин, гистидин, лизин) и азотсодержащая карбоновая кислота креатин, рост на которых был нестабильным в течение сукцессии и мог даже совсем отсутствовать при определённых температурах. Для урбанозёма на данных веществах, за исключением фенилаланина, также был характерен нестабильный рост мицелия, однако при температурах, отличных от 20 °С, нестабильным становилось развитие мицелия и на постоянно потребляемых в природных почвах аминокислотах (при 10, 30 и 35 °С — аспарагин, серин, при 35 °С — глутамин).

По результатам статистической обработки данных МСТ N-ацетил-D-глюкозамин (мономер хитина, поступающего в почву с останками грибов и беспозвоночных животных, а также компонент муреина, входящего в состав клеточных стенок бактерий, и гиалуроновой кислоты) являлся субстратом, на котором развитие мицелия грибных комплексов изученных зональных почв в наибольшей степени зависело от температуры инкубации почвы. Скорость развития на данном субстрате (рис. 7) при повышенных температурах (30 и 35 °С) была ниже, чем при 10 и 20 °С на большинстве сроков сукцессии. Поэтому ацетилглюкозамин можно рассматривать в качестве биоиндикационного субстрата для выявления влияния повышенных температур на грибные комплексы подзола и дерново-подзолистой почвы.

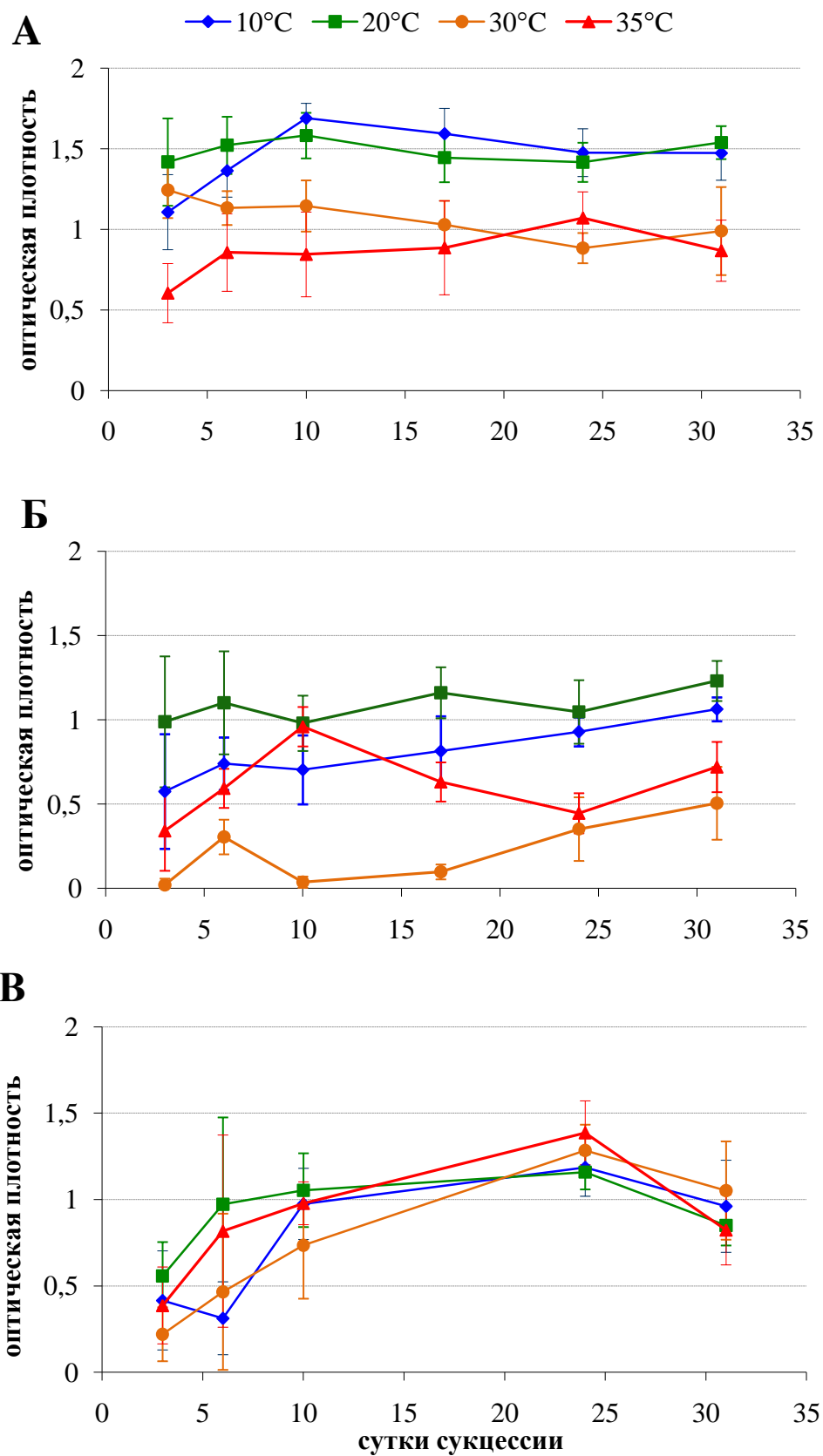


Рис. 7. Значение (среднее значение \pm 95% доверительный интервал) оптической плотности на N-ацетил-D-глюкозамине (А — подзол, Б — дерново-подзолистая почва, В — урбанозём) в течение сукцессии при 10, 20, 30 и 35 °C.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведённом эксперименте было показано, что температура оказывает влияние на формирование состава и структуры грибных комплексов исследованных почв при их развитии из состояния покоя в условиях постоянной высокой ($w = 60\%$) влажности. Во всех исследованных почвах при переходе от стандартных температур инкубации к повышенным в сообществе получили развитие виды с более высокими средними оптимальными температурами роста и одновременно продолжились выделяться виды с более низкими. При этом при повышенных температурах, особенно при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, отмечались наиболее низкие значения разнообразия грибных сообществ. Влияние на разнообразие и протекание сукцессии помимо температуры оказало содержание лабильных органических веществ в исследованных почвах. Так, крайне низкое содержание и быстрое исчерпание в ходе эксперимента лабильных форм углерода в урбанозёме, по сравнению с природными почвами, не дало массово развиваться быстрорастущим видам, и, возможно, было одной из причин более медленных перестроек в составе и структуре сообщества в течение эксперимента. С другой стороны, высокое содержание лабильных органических веществ в подзоле на протяжении всей сукцессии позволило поддерживать высокое обилие быстрорастущих микромицетов, особенно при 30 и $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, что также уменьшило выраженность сукцессионных смен и привело к большей стабильности структуры грибных комплексов в ходе эксперимента. Выявленное с помощью метода мультисубстратного тестирования функциональное разнообразие отражало изменения в видовой структуре грибного сообщества. Урбанозём среди всех изученных почв отличался формированием при каждой изученной температуре специфического набора стабильно потребляющихся субстратов. Такой результат, возможно, был связан с быстрым исчерпанием лабильных форм органических веществ в данной почве и постепенным переходом грибного сообщества к разложению их более труднодоступных форм, что можно проследить по появлению и увеличению доли в сообществе видов, обладающих способностью к разложению более широкого спектра органических веществ.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в природных почвах (подзол, дерново-подзолистая) численность микромицетов (КОЕ) возрастает при более высокой температуре инкубации почв, а в урбанозёме при разных температурах значимо не различается.
2. Разнообразие обнаруживаемых в почвах культивируемых микромицетов, определяемое типом исследованной почвы и содержанием лабильных форм углерода и азота, также зависит от температуры инкубации. Минимальное разнообразие было отмечено при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Во всех почвах было выявлено по 2–4 вида, выделявшихся только при повышенных (30 и $35\text{ }^{\circ}\text{C}$) температурах. Наибольшее разнообразие микромицетов в течение сукцессии выявлено в урбанозёме (60 таксонов), а более низкое — в дерново-подзолистой почве (46 таксонов) и подзоле (32 таксонов).

3. Состав типичных видов микромицетов зависит от температуры инкубации почв. В природных почвах их состав слабо различается при температурах 10–30 °С. Изменения происходят при 35 °С: максимальные в подзоле, где состав полностью изменился, и менее значимые в дерново-подзолистой почве, где он обновился на 14–17%. В урбанозёме различия в составе типичных видов обнаружены при всех исследованных температурах.
4. Установлена выраженная перестройка в структуре грибных комплексов во всех почвах при 35 °С. В природных почвах при этой температуре на всех стадиях сукцессии отмечено доминирование по относительному обилию *Aspergillus fumigatus*, а в урбанозёме происходила смена доминантов: *Penicillium janczewskii*, *Penicillium simplicissimum*, *Scedosporium aurantiacum*.
5. Наибольшее влияние температуры на число постоянно потребляемых субстратов было зафиксировано для грибных комплексов урбанозёма, а наименьшее — подзола. В урбанозёме при повышенной температуре наблюдался тренд к формированию более специфичных, чем в природных почвах, грибных комплексов по потенциальному функциональному разнообразию. Наибольшей информативностью для выявления влияния повышенных температур на грибные комплексы исследованных природных почв обладал N-ацетил-D-глюкозамин.
6. Установлено, что высокая температура инкубации почв приводит к увеличению встречаемости и относительного обилия в исследованных почвах потенциально патогенных мицелиальных грибов, часто наиболее приспособленных к стрессовым условиям окружающей среды.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. Марфенина О.Е., Бубнова Е.Н., Семенова Т.А., Иванова А.Е., Данилогорская А.А. Грибы рода *Aspergillus*: распространение и условия накопления в разных природных средах (на примере Европейской части России) // Микология и фитопатология. — 2014. — Т. 48. — № 3. — С. 139–150 (РИНЦ IF 0,495; SJR IF 0,234) (1,50/0,30) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. Данилогорская А.А., Марфенина О.Е., Тухбатова Р.И. Опыт применения мультисубстратного тестирования для определения функционального разнообразия почвенных грибов // Микология и фитопатология. — 2015. — Т. 49. — № 6. — С. 340–348 (РИНЦ IF 0,495; SJR IF 0,234) (1,13/0,90).
3. Marfenina O.E., Danilogorskaya A.A. Effect of elevated temperatures on composition and diversity of microfungal communities in natural and urban boreal soils, with emphasis on potentially pathogenic species // Pedobiologia. — 2017. — Vol. 60. — P. 11–19. DOI: 10.1016/j.pedobi.2016.11.002 (SJR IF 0,56 Q2) (1,13/0,90).