

Численность, биомасса и размеры клеток бактерий в ризосфере и ризоплане некоторых растений

© 2014. И. П. Пинчук, к.б.н., н.с., Н. П. Кириллова, д.б.н., профессор, Л. М. Полянская, д.б.н., профессор, Д. Г. Звягинцев, д.б.н., профессор, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, e-mail: lpolyanskaya@mail.ru

Изучены численность, биомасса и размеры клеток бактерий в ризосфере и ризоплане шести различных видов высших растений на дерново-подзолистой почве. Установлено, что эти показатели выше в прикорневой зоне растений, чем в почве без растений. Определены размеры превышений для конкретных случаев. Рассчитанные ризосферный и эдафосферный эффекты подтвердили, что прикорневая зона растений благоприятна для роста и развития бактерий. В исследовании использовали прямой микроскопический метод. Показано, что метод сканирования корневой поверхности правильнее использовать при расчете численности бактерий в ризоплане растений, чем пересчёт на массу почвы с корней.

Number, biomass and size of bacterial cells were studied in the rhizosphere and rhizoplane of six different species of higher plants. These indexes are higher in the root zone of plants than in soil without plants. Average size of the bacterial cells in rhizoplane and rhizosphere increases, as compared with the soil by root exudates. Calculated rhizospheric and edaphospheric effects confirmed that the basal area is favorable for growth and development of bacteria. Number of rizo-planes was calculated by the method of root surface scanning. It was shown that this method is correct to use in the calculation of number of bacteria in rizo-planes plants.

Ключевые слова: почва, растение, корень, ризосфера и ризоплана, клетки бактерий, численность и размеры.

Keywords: soil, plant, root, rhizosphere and rizo-planes, bacterial cells, number and sizes.

В течение жизни высшие растения находятся в сложных взаимоотношениях с микроорганизмами, населяющими почву, и зависят друг от друга. Органическое вещество, производимое зелёными растениями в процессе фотосинтеза, поглощается микроорганизмами – гетеротрофами. Корневые выделения обогащают почву в прикорневой зоне органическими веществами, за счёт которых развиваются микроорганизмы. Через корневую систему выделяются почти все виды органических соединений, а также физиологически активные вещества, CO_2 и минеральные вещества, которые необходимы растениям для их жизнедеятельности [1, 2].

Несмотря на бурное развитие техники, проблема изучения микроорганизмов в корнеобитаемом слое остаётся в значительной мере неразрешённой. Ризоплана – двухмерное пространство – зона, в которой микроорганизмы находятся на поверхности корня, а ризосфера – трёхмерное пространство, почва, которая расположена в непосредственной близости от поверхности корня, однако толщина этого слоя определяется разными авторами совершенно

по-разному. Численность можно сравнивать в одной размерности – или в объёме, который пропорционален весу корня и весу почвы, или на единицу поверхности корня или почвы.

Расчёт поверхности корня путём непосредственных измерений чисто теоретически был возможен [3], но на практике им мало кто пользовался ввиду трудоёмкости задачи и отсутствия автоматизации процесса [4]. Современный уровень развития компьютерных технологий предоставляет такую возможность [5]. Например, для древесных растений с помощью специальных сканеров уже можно проводить измерения не только общей длины корней, но и их расположение в трёхмерном пространстве, непосредственно на месте, без изъятия из почвы и строить 3D-модели роста корня [6]. Можно применить этот подход для измерения поверхности травянистых растений в экспериментах с ризопланой. Так как растения изымаются из почвы, то вместо специального сканера можно воспользоваться обычным сканером, и анализ сканированного материала провести в программах, распознающих образ и вы-

числяющих площади и периметры контуров, полученных при распознавании [7].

Целью работы было оценить специфику зон влияния различных растений на бактерии в ризоплане и ризосфере.

Методика

Для проведения эксперимента нами были взяты экземпляры шести различных видов высших растений: алоэ лекарственное (*Aloe arborescens* Mill.) (образец был взят из вегетационного сосуда – дерново-подзолистая почва), герань лесная (*Geranium sylvaticum* L.), ежа сборная (*Dactylis glomerata* L.), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinalis* Wigg.), пырей ползучий (*Eletrigia repens* (L.) Nevski.), сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria* L.).

Образцы со 2 по 6 были взяты в городе Обнинске Калужской области. Почва – дерново-подзолистая сильноокультуренная, горизонт А пахотный.

Для анализа ризосферы использовали следующую процедуру [8]. Корни вынимали из почвы с минимальными повреждениями, осторожно встряхивали для удаления крупных частиц почвы и помещали в колбы со 100 мл стерильной воды. После лёгкого встряхивания образец разделялся на два части. Почва, отделившаяся после лёгкого встряхивания, является ризосферной (на расстоянии 3 мм от корня), а собственно сами корни – ризопланой [9]. В качестве контроля исследовали почву без растений, увлажнённую до 60% от полной влагоёмкости. Количество отмытой с корней почвы определяли гравиметрическим методом после фильтрования суспензии через бумажный фильтр с синей лентой. Во всех вариантах опытов определяли также массу корней, их длину и площадь поверхности.

Для предварительной обработки образцов почвы перед микробиологическим анализом применяли ультразвуковое диспергирование на низкочастотном диспергаторе типа УЗДН_1 (Россия) – 22 кГц, 0.44 А, 2 мин.

При определении численности и размеров бактерий использовали метод «каскадной» фильтрации [10]. Через фильтр пропускали окрашенную акридином оранжевым (1: 10000, в течение 2–3 мин.) суспензию, учитывали клетки бактерий в 30-и полях зрения, условно принимая размеры клеток, равными диаметру пор фильтра, на котором они осаждались. В расчётах принимали, что клетки имеют шаровидную форму [11].

Численность клеток ризопланы рассчитывали на площадь поверхности корня. Для этого была разработана следующая методика. Корни отмывались от почвы (почва использовалась для каскадной фильтрации), на сканер они помещались после удаления избытка влаги для предотвращения слипания корней. Все они были тщательно распределены на поверхности сканера и затем отсканированы в стандартной компьютерной программе. Отсканированные изображения были обработаны в программе ArcMap 10.0, модуля Image Classification [7]. Эта программа позволяет распознавать образы и рассчитывать их размеры.

При расчёте площади поверхности корня использовали формулу площади цилиндра $S = 2\pi r l$, где r – радиус корня и l – длина корня (мм).

Формула для расчёта численности бактерий:

$$N_b = a \times 1,13 \times 10^7 \quad [9].$$

При расчётах численности бактерий (a) по обычной методике сухой вес бактериальной клетки объёмом $0,1 \text{ мкм}^3$ принимается равной $2 \times 10^{-14} \text{ г}$ [12]. В настоящей работе сухую биомассу рассчитывали, учитывая размеры клеток бактерий. Биомассу клеток вычисляли по формуле:

$$V_b = \frac{3}{4} \pi r^3 \times 2 \times 10^{-14} \div 0,1 \times N_b$$

где b – размер каждой фракции, r – радиус, N – численность, V – биомасса.

Средний объём одной клетки рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{V_{\text{общ}}}{N_{\text{общ}} \times a},$$

где $V_{\text{общ}}$ и $N_{\text{общ}}$ – биомасса и численность всех фракций, a – плотность одной клетки, $a = 1 \times 10^{-12} \text{ г/см}^3$, V – средний объём одной клетки.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ STATGRAPHICS и STATISTICA. Среднее квадратическое отклонение (δ_{n-1}) для значений численности бактерий в образце не превышало 5–10%.

Результаты исследований

Общая численность клеток бактерий, определённая методом «каскадной» фильтрации в почве, ризосфере и ризоплане растений, представлена на рисунке 1. У растений (ежа сборная, сныть обыкновенная, герань лесная, одуванчик лекарственный) показано, что

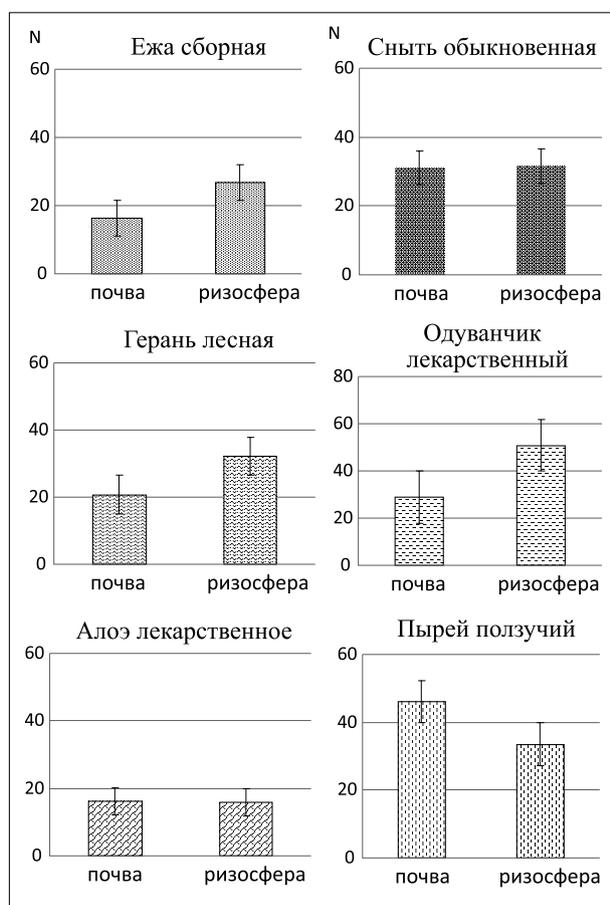


Рис. 1. Численность клеток бактерий, определённая методом каскадной фильтрации в почве, ризосфере в изученных растениях: ежа сборная, сныть обыкновенная, герань лесная, одуванчик лекарственный, алоэ лекарственное, пырей ползучий, $N=10^7$ кл/г.

суммарная численность клеток бактерий возрастает в ризосфере по сравнению с почвой. Однако это возрастание очень небольшое (в 1,5–2 раза). Наибольшая численность микроорганизмов наблюдается в ризосфере одуванчика лекарственного, при этом она резко возрастает по сравнению с контрольной почвой

(с 29 до 51×10^7 клеток бактерий/г почвы). Из этого можно заключить, что прикорневая зона одуванчика лекарственного наиболее благоприятна для обитания сапротрофных бактерий [13].

Численность микроорганизмов в ризосфере по сравнению с почвой меньше у растений алоэ лекарственное и пырей ползучий. Для пырея ползучего в почве она составляет 46×10^7 клеток бактерий/г почвы, а для ризосферы – 34×10^7 клеток бактерий/г.

Численность микроорганизмов была подсчитана традиционным методом в расчёте на 1 г почвы ризопланы (рис. 2). Растения по возрастанию численности клеток в ризоплане расположились в следующем порядке – ежа сборная, одуванчик лекарственный, герань лесная (16×10^7 клеток бактерий/г), алоэ лекарственное, пырей ползучий (25×10^7 клеток/г почвы) и сныть обыкновенная (42×10^7 клеток /г). Максимальная численность наблюдается в ризоплане сныти обыкновенной, наименьшая – в ризоплане ежи сборной, то есть различие в 2,5 раза.

Результаты численности бактериальных клеток, рассчитанные на поверхность корней, представлены на рисунке 3. Растения расположились в другом порядке – ежа сборная ($0,03 \times 10^7$ клеток/мм²), пырей ползучий и алоэ лекарственное ($0,005-0,007 \times 10^7$ клеток/мм²), сныть обыкновенная ($0,01 \times 10^7$ клеток/мм²), герань лесная ($0,02 \times 10^7$ клеток/мм²) и одуванчик лекарственный ($0,1 \times 10^7$ клеток/мм²). По данным пересчёта на поверхность наибольшая численность наблюдалась в ризоплане одуванчика лекарственного и превышала численность у алоэ почти в 15 раз.

Была рассчитана удельная поверхность корней растений в см²/г (рис. 4). Наибольшую площадь составляют корни ежи сборной, это



Рис. 2. Численность клеток бактерий, определённая методом каскадной фильтрации и подсчитанная традиционным методом (на вес почвы), $N=10^7$ кл/г.

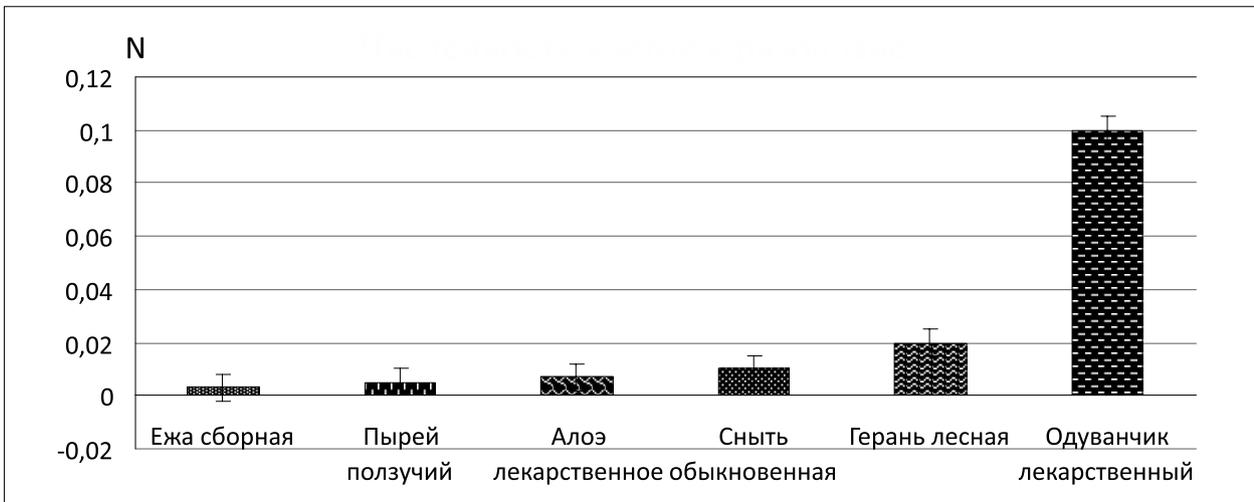


Рис. 3. Численность клеток бактерий, определённая методом каскадной фильтрации и рассчитанная на поверхность корней растений, $N=10^7$ кл./мм².

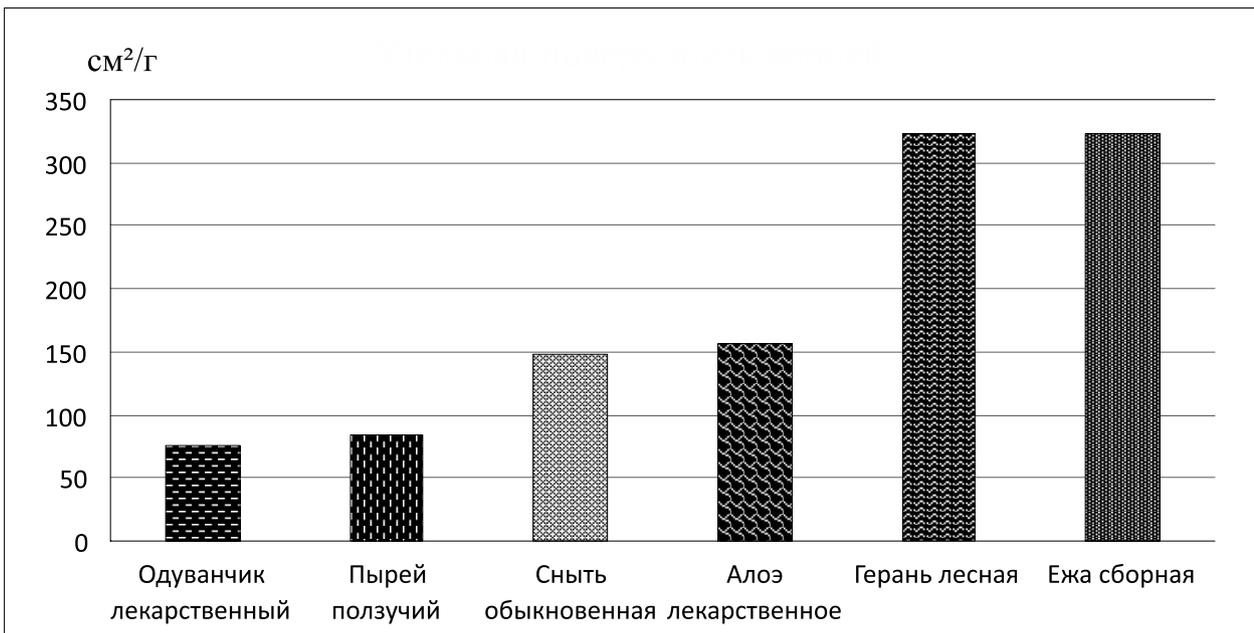


Рис. 4. Удельная поверхность корней растений.

объясняется наличием разветвлённой мочковатой корневой системы, большая площадь также наблюдается и у герани лесной, что объясняется крупным разветвлённым корневищем [14].

Для возможности сравнения численности клеток в ризосфере и ризоплане полученные данные были пересчитаны в процентах от максимального значения (одуванчик лекарственный) (рис. 5). Клетки бактерий в прикорневых зонах всех растений в ризосфере составляют 40–60% от численности бактерий в прикорневой зоне одуванчика, а в ризоплане 5–10%.

Для всех растений были рассчитаны ризосферный (отношение численности бактерий в ризоплане к численности бактерий в ризосфере) и эдафосферный эффекты (отношение

численности бактерий в ризосфере к численности бактерий в почве без растений). Для всех растений ризосферный эффект (рис. 6 а) значительно больше единицы, то есть все они оказывают сильное влияние на ризосферные микроорганизмы. При этом наибольший ризосферный эффект 393 обнаружили у одуванчика лекарственного, наименьший 22 – у ежи сборной. Такие высокие значения ризосферного эффекта показали герань лесная (124) и алоэ лекарственное (88). Поскольку эти растения обладают наиболее сильными лекарственными свойствами, то данное распределение по ризосферному эффекту логически обосновано.

Далее был посчитан эдафосферный эффект (рис. 6 б). Он значительно отличается от

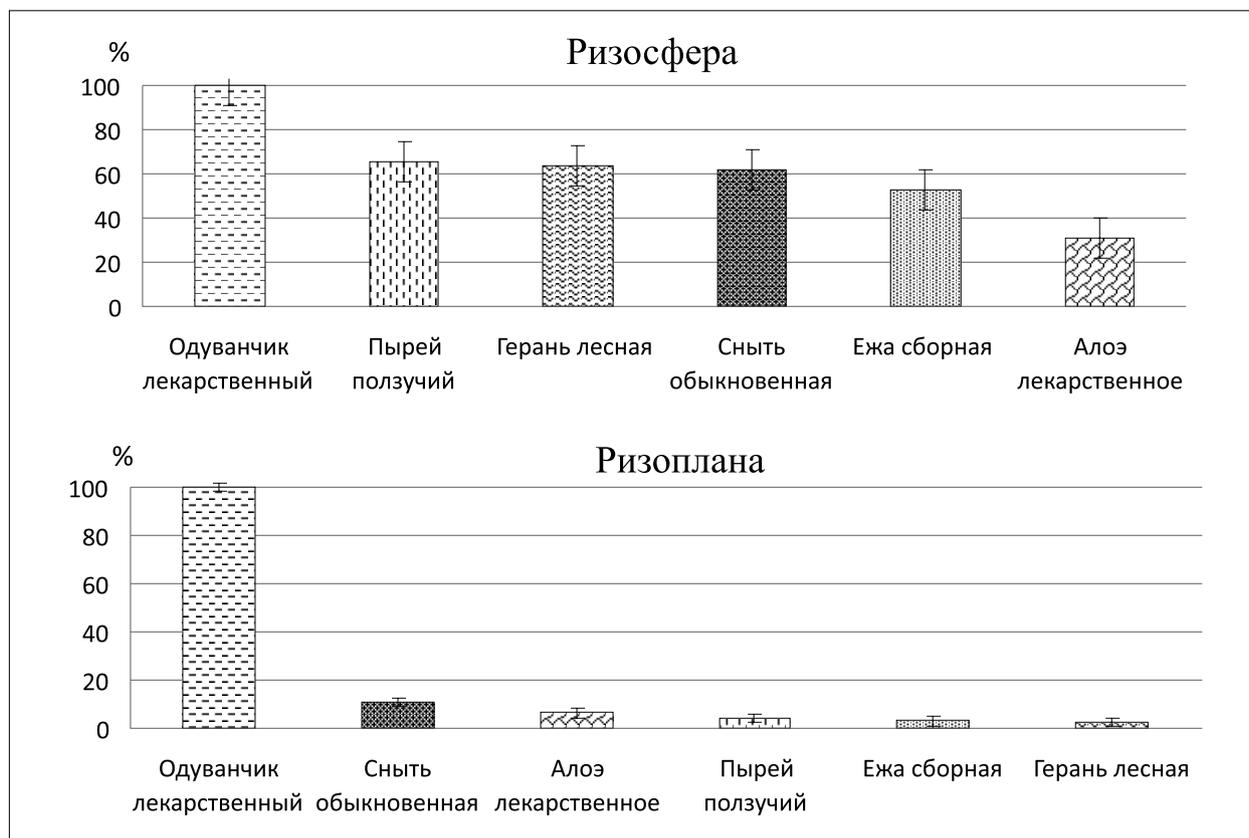


Рис. 5. Распределение численности клеток бактерий в ризосфере и ризоплане растений в процентах от максимального значения.

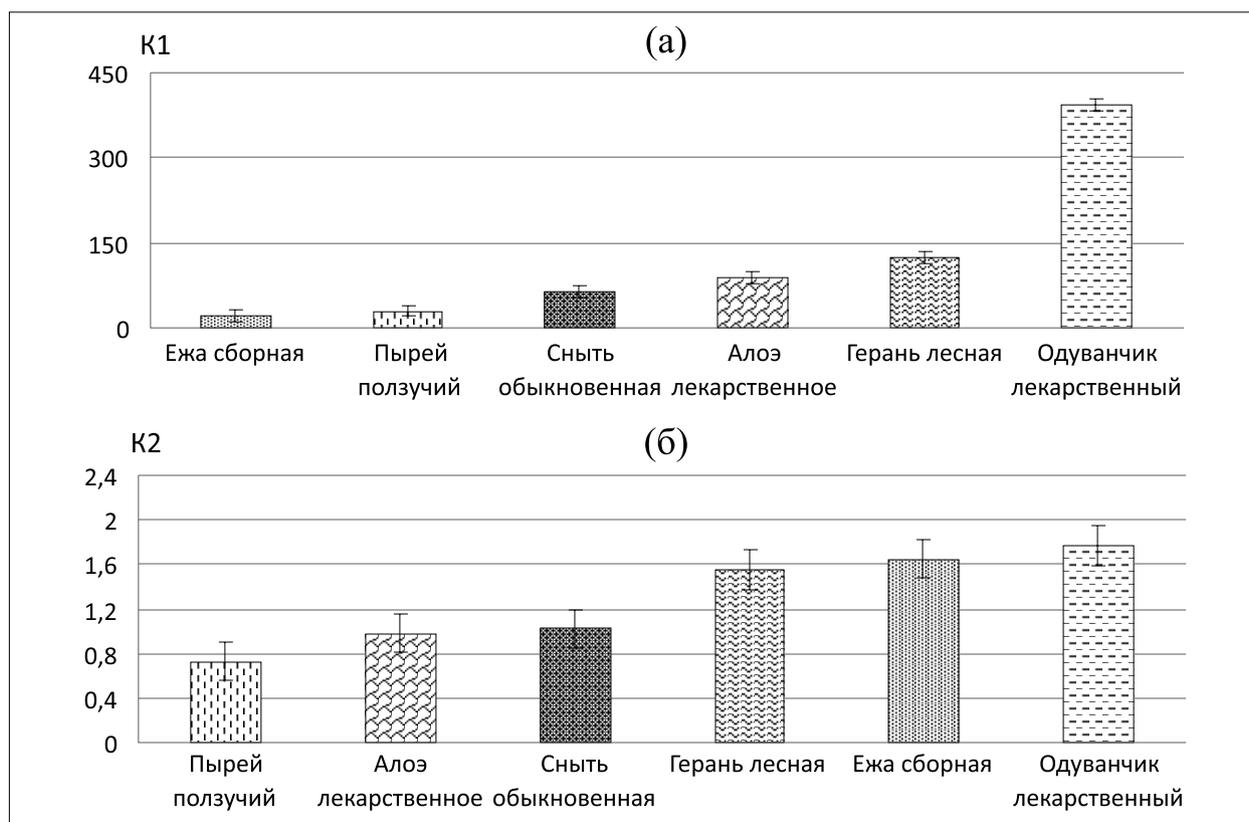


Рис. 6. Ризосферный (а) и эдафосферный (б) эффекты. $K1 = Ч_{рп} / Ч_{рс}$, $K2 = Ч_{рс} / Ч_{п}$.

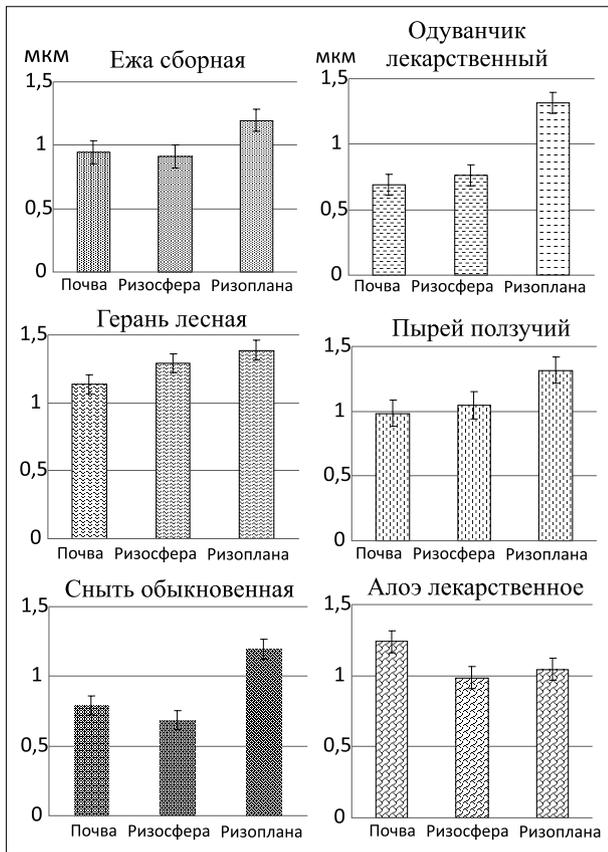


Рис. 7. Диаметры клеток в почве, ризосфере и ризоплане изученных растений.

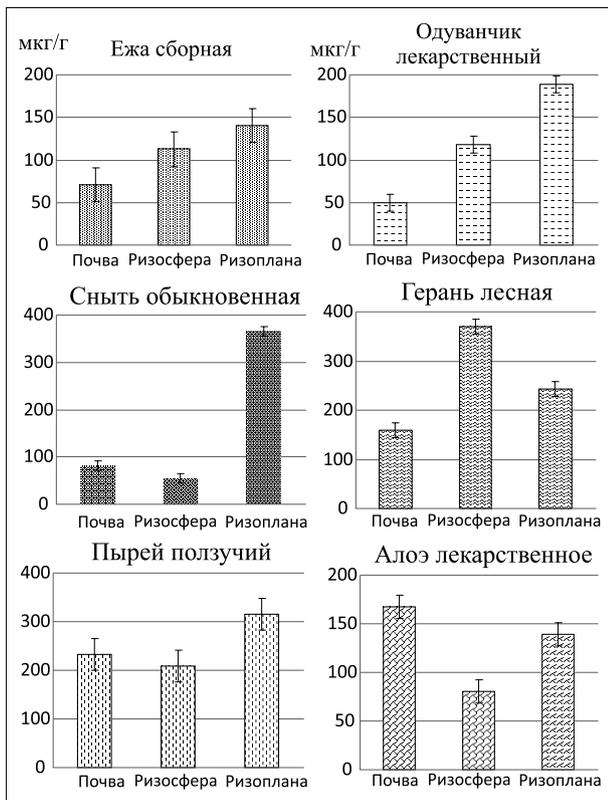


Рис. 8. Биомасса клеток в почве, ризосфере и ризоплане растений.

ризосферного; на порядок ниже и приблизительно равен 1-2, следовательно, по мере удаления от корня влияние корневых выделений снижается [9].

Был проведён анализ ранговых распределений для того, чтобы выяснить, какой из двух методов расчёта численности микроорганизмов в ризоплане растений лучше использовать. За стандарт было взято распределение численности бактерий в ризосфере. Значения численности в ризоплане, рассчитанные на массу почвы и поверхность корня, сравнивались с этим стандартом. Стандартная ошибка меньше при расчёте численности на поверхность корня (0,73), чем на вес почвы (1,00). Следовательно, согласно статистическим данным, целесообразнее рассчитывать численность микроорганизмов на поверхность корня.

Данные по средним диаметрам одной клетки представлены на рисунке 7. В прикорневых зонах всех растений, за исключением алоэ лекарственного, диаметр одной клетки больше в ризоплане. Можно сделать вывод, что корневые выделения этих растений положительно влияют на рост и развитие бактерий. У растения алоэ лекарственное прослеживается снижение диаметра в ризосфере и ризоплане по сравнению с контрольной почвой.

Таким образом, данные по размерам клеток бактерий подтверждают данные по ризосферному эффекту – корневые выделения высших растений оказывают положительное влияние на бактерии, обитающие в ризосфере и ризоплане растений.

Была рассчитана общая биомасса клеток бактерий, данные представлены на рисунке 8. Биомасса клеток увеличивается от почвы к ризоплане у следующих растений: ежа сборная, одуванчик лекарственный, сныть обыкновенная, пырей ползучий, тогда как у герани лесной биомасса максимальна в ризосфере, а у алоэ лекарственного биомасса максимальна в почве.

В таблице приведены значения среднего радиуса и среднего объёма одной клетки в почве, ризосфере и ризоплане растений. В ризоплане всех растений, за исключением алоэ лекарственного, средние размеры клеток значительно больше, чем в почве и ризосфере. Полученные данные в ризоплане растений отличаются от литературных данных по размерам клеток в ризоплане пшеницы 0,32 мкм [9]. Утверждение, что почвенные бактерии крупнее бактерий, обитающих в прикорневой зоне растения, нам кажется необоснованным, так как корни растений выделяют большое

Таблица

Средний радиус и средний объём бактерий в почве, ризосфере и ризоплане растений

	R (мкм)	V(мкм ³)		R (мкм)	V(мкм ³)
Алоэ лекарственное			Одуванчик лекарственный		
почва	0,62	1,00	почва	0,34	0,17
ризосфера	0,49	0,50	ризосфера	0,38	0,23
ризоплана	0,52	0,60	ризоплана	0,66	1,20
Герань лесная			Пырей ползучий		
почва	0,57	0,77	почва	0,49	0,50
ризосфера	0,65	1,13	ризосфера	0,52	0,60
ризоплана	0,69	1,40	ризоплана	0,66	1,20
Ежа сборная			Сныть обыкновенная		
почва	0,47	0,44	почва	0,40	0,26
ризосфера	0,46	0,40	ризосфера	0,34	0,17
ризоплана	0,60	0,90	ризоплана	0,60	0,90

количество питательных веществ, что создаёт благоприятную среду для роста и развития клеток бактерий.

Заключение

Было показано, что растения создают благоприятные условия для развития бактерий в прикорневой зоне. Размеры клеток и их численность и биомасса в ризоплане существенно превышают таковые в почве без растений. Это также подтверждают рассчитанные ризосферный и эдафосферный эффекты. Для расчёта численности клеток в ризоплане растений логичнее использовать такие характеристики, как длина и площадь поверхности корней.

Литература

1. Иванов В. П. Растительные выделения и их значение в жизни фитоценозов М.: Наука, 1973. С. 108–188.
2. Красильников Н. А. Микроорганизмы почвы и высшие растения М.: Издательство Академии Наук СССР, 1958. С. 275–41.
3. Böhm W Methods of studying root systems ecological studies n° 33 / Ed. by Billing W.D., Golley F., Lange O.L., Olson J.S. Berlin. Germany. Springer. 1979. 188 p.
4. Звягинцев Д.Г., Кожевин П.А., Кириллова Н.П. Экологическая характеристика микрофлоры ризосферы // Проблемы почвоведения. М.: Наука, 1980. Р. 64–68.
5. Barthélémy D., Caraglio Y. Plant architecture: a dynamic, multilevel and comprehensive approach to plant

form, structure and ontogeny // Ann Bot. 2007. № 99. Р. 375–407.

6. Nielsen C.C.N., Hansen J.K., Root C.S.A Root biomass prediction models in six tree species and improvement of models by inclusion of root architectural parameters // Plant Soil. 2006. V. 280. Р. 339–356.

7. Программа ArcMap 10.0: <http://esri-cis.ru/products/arcgis-for-desktop/detail/key-features/>.

8. Timonin M.I. The interaction of higher plants and soil microorganisms. Microbial populations of rhizosphere of seedlings of certain cultivated plants // Can. J. Res. 1940. V. 18. Р. 307–317.

9. Кириллова Н.П. Динамика численности микробных популяций в системе почва-растение в условиях модельных опытов. Дисс. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 1983. 134 с.

10. Полянская Л.М., Городничев Р.Б., Звягинцев Д.Г. Размеры клеток бактерий в почвах, определяемые методом «каскадной» фильтрации // Известия РАН. Серия биологическая. 2013. № 1. С. 144–151.

11. Горбачева М.С. Развитие бактерий и грибов в черноземе при разных условиях аэрации. Дисс. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2013. 135 с.

12. Кожевин П.А., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Динамика развития различных микроорганизмов в почве // Микробиология. 1979. Т. 48. № 4. С. 490–494.

13. Schutz K., Carle R., Schieber A. Taraxacum – A review on its phytochemical and pharmacological profile // Journal of Ethnopharmacology. 2006. V. 107. Р. 313–323.

14. Губанов И.А., Крылова И.Л., Тихонова В.Л. Дикорастущие полезные растения СССР М.: Мысль, 1976. 222 с.