

СТЕКЛО ИЛИ ПЛАСТИК? ВЛИЯНИЕ МАТЕРИАЛА ВОРОНКИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКЦИИ НЕМАТОД МЕТОДОМ БЕРМАНА

© 2024 г. А. Д. Логинова^а, *

^а Институт экологии растений и животных УрО РАН, Россия, 620144, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

*e-mail: loginova_ad@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 22.05.2023 г.

После доработки 11.08.2023 г.

Принята к публикации 28.08.2023 г.

Ключевые слова: свободноживущие нематоды, почва, лесная подстилка, оценка численности

DOI: 10.31857/S0367059724010089 EDN: WVQCLN

Нематоды – одна из наиболее распространенных и многочисленных групп беспозвоночных: они встречаются практически повсюду [1], а численность может достигать 20 млн экз./м² [2]. Обилие нематод – важный индикатор состояния почвы [3–5]. Для корректной оценки численности и возможности сравнивать величины, полученные в разных исследованиях, необходима стандартизация методики экстракции. Выделение нематод методом Бермана – наиболее часто используемая техника, разработанная еще в начале XX в. и неоднократно модифицированная в целях максимизации эффективности [6]. При ее стандартизации уделяли внимание выбору оптимального времени экстракции, массе пробы, количеству воды [6], а также рассматривали вариации оборудования: сита с разным размером ячеек, разные типы фильтров [7, 8]. Однако вопрос о возможности оседания нематод на стенках экстракционных воронок, а также о влиянии материала, из которого они изготовлены, на эффективность экстракции ранее не рассматривался. Между тем в разных исследованиях используют воронки как из стекла [9–11], так и из пластика [12–14]. Чаще всего авторы вообще не указывают материал воронки, например [7, 15]. Цель данной работы – ответить на вопрос, влияет ли материал воронок на эффективность экстракции нематод.

Отбор образцов почвы (органический и органоминеральный горизонты) проводили на двух участках соснового леса в парковой зоне г. Екатеринбурга (Юго-Западный лесопарк и территория Ботанического сада УрО РАН). На обоих участках с каждой из 5 пробных площадей отобрали по 5 образцов из каждого горизонта с помощью

лопатки и рамки (10×10 см) на глубину 5 см. Расстояние между точками сбора составляло не менее 2 м, между пробными площадями – 150 м. Затем образцы каждого горизонта, отобранные с одной площадки, объединяли и тщательно перемешивали, чтобы добиться гомогенности пробы. Объединенную пробу делили на 6 равных частей (органический горизонт – 10 г, органоминеральный – 25 г, с точностью 0.02 г) – подпроб. Для экстракции нематод из каждой пробы (6 подпроб) одновременно были использованы три стеклянные и три пластиковые воронки (полиэтилен низкого давления, марка Gigant GT-67830). Диаметр всех типов воронок был равен 16 см, угол наклона стеклянной воронки составлял 60°, пластиковой – 50°, остальное оборудование было идентичным (рис. 1). Также было

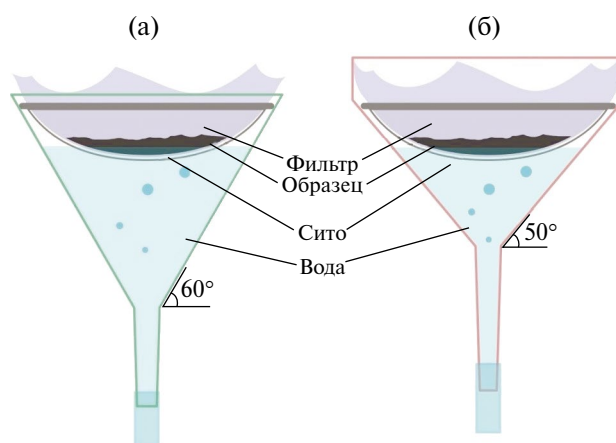


Рис. 1. Сборная конструкция стеклянной (а) и пластиковой (б) воронок для экстракции нематод методом Бермана.

использовано стальное сито диаметром 14 см, не касающееся стенок воронки, размер ячеек составлял 100 мкм.

В соответствии со стандартным протоколом метода Бермана экстракцию нематод проводили с помощью установки, состоящей из воронки, силиконовой трубки и пробирки объемом 2 мл. Сито с фильтром (тонкая бумажная салфетка) и помещенной на него пробой ставили в воронку и заполняли систему водой так, чтобы вода смачивала образец, но не покрывала его полностью. Длительность экстракции составляла 48 ч при комнатной температуре в темноте. После снятия сита с образцом и стравливания оставшейся в установке воды делали смывы нематод в отдельную пробирку со стенок воронок с помощью лабораторной промывалки одним круговым движением. Таким образом было получено 120 пробирок с суспензией нематод (2 горизонта \times 10 площадок \times 6 подпроб), а также 100 пробирок со смывами со стенок воронок (20 смывов не были сделаны по техническим причинам).

Для подсчета численности нематод из каждой пробирки объемом 1 мл после встряхивания было отобрано по 3 аликвоты (0.1 мл). Численность нематод (экз./100 г) рассчитывали как среднее количество нематод в аликвоте, умноженное на 10, а затем нормированное на сухую массу подпробы. Для анализа данных и визуализации использовали пакеты nlme, ggpubr и multcomp в среде программирования Rv.4.2.2 [16]. Статистический анализ включал двухфакторный дисперсионный анализ: фиксированные факторы – материал воронки, почвенный горизонт и их взаимодействие (далее «материал \times горизонт»), случайный фактор – площадка. Множественные сравнения выполнили с использованием критерия Тьюки. Величины численности были предварительно логарифмированы, а данные, выраженные в долях от единицы, преобразованы в $\arcsin(\sqrt{p})$.

Численность нематод органического и органоминерального горизонтов составила (медиана, в скобках доверительный интервал) 13 114 (12 229 – 15 257) и 3271 (3055–3985) экз/100 г соответственно (рис. 2), что согласуется с данными для средней и южной тайги [17–19]. В минеральном горизонте, содержащем меньше органических остатков по сравнению с лесной подстилкой, плотность нематод существенно ниже ($F(1;105) = 392.7; p < 0.001$, рис. 2а), что также

хорошо согласуется с литературными данными [19, 20].

Численность нематод, экстрагированных с помощью пластиковой воронки, значительно больше, чем с помощью стеклянной ($F(1;105) = 8.7; p = 0.039$), при отсутствии взаимодействия факторов «материал \times горизонт» ($F(1;105) = 2.16; p = 0.144$). При использовании критерия Тьюки различия в численности экстрагированных нематод обнаружены только для органоминерального горизонта (см. рис. 2а). Таким образом, материал воронки влияет на эффективность экстракции нематод. Более выражено влияние на результаты экстракции из образцов с низкой численностью нематод.

Численность нематод, остающихся на стенках воронок, также зависит от материала воронки ($F(1;87) = 61.1; p < 0.001$) – на стеклянных воронках их остается больше (см. рис. 2б). Взаимодействие факторов также статистически незначимо ($F(1;87) = 2.19; p = 0.14$). Усредненные по горизонтам потери нематод со стеклянных воронок составили 21.7 (17.4–25.2)%, тогда как с пластиковых почти в 3 раза меньше – 7.6 (6.4–8.8)% (см. рис. 2г). Авторы большинства работ и учебных пособий не упоминают о необходимости смыва нематод со стенок воронок по окончании экстракции [6, 7, 21]. Между тем полученные нами данные свидетельствуют о значительном смещении оценок обилия нематод из-за их оседания на стенках, причем при использовании любого материала воронок.

Различия между разными типами воронок объяснимы с точки зрения свойств материалов: стекло обладает гидрофильными свойствами [22], а значит, что во время экстракции на него налипают больше нематод по сравнению с пластиком. Также отметим, что в нашем эксперименте угол стеклянных воронок меньше по сравнению с пластиковыми, а потери, наоборот, больше. Это означает, что при одинаковом угле наклона не исключена еще большая разница в эффективности экстракции между воронками из данных материалов.

Суммарная численность нематод, т.е. сумма экстрагированных из образца и смытых со стенок, не различается между разными типами воронок: $F(1;87) = 1.52; p = 0.22$ (см. рис. 2в), взаимодействия факторов незначимы ($F(1;87) = 1.23; p = 0.27$). Это свидетельствует о том, что смывы с воронок нивелируют погрешность экстракции, вызванную адгезией нематод на стенки воронок.

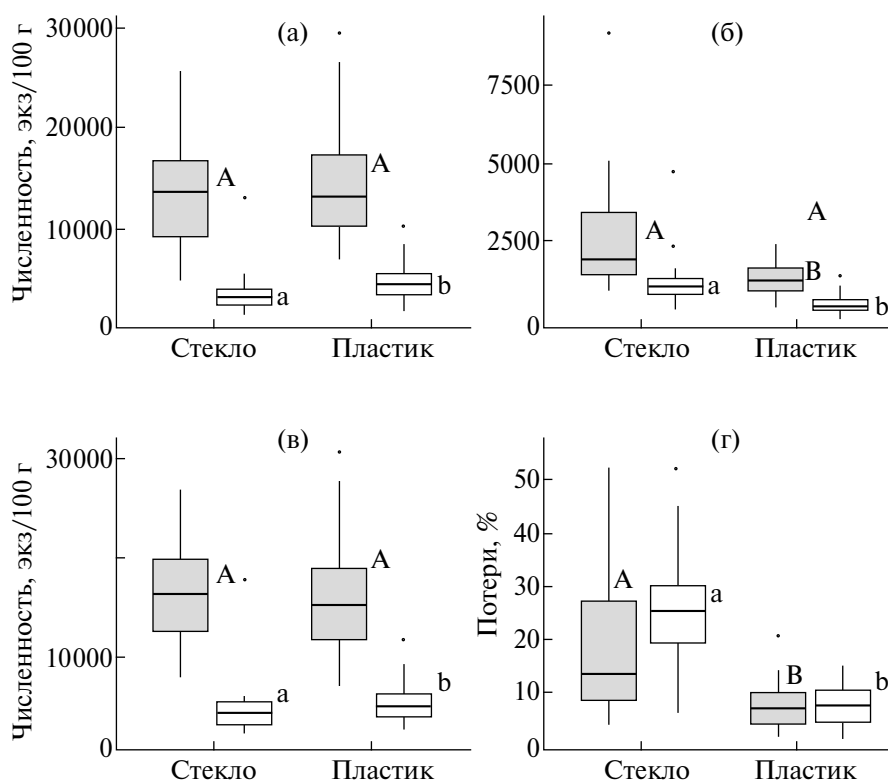


Рис. 2. Влияние материала воронки и горизонта на численность экстрагированных нематод (а); численность нематод, смытых со стенок воронок (б); суммарная численность нематод (экстрагированных и смытых) (в); процент потерь нематод (численность рассчитана на сухую массу почвы, $n = 120$). Серая заливка – органический горизонт, белая – органоминеральный горизонт. Одинаковые буквы означают отсутствие статистически значимых различий по критерию Тьюки ($p < 0.05$): заглавные буквы использованы при сравнении вариантов для органического горизонта, а строчные – для органоминерального. Горизонтальная черта – медиана, границы ящика – межквартильный размах, усы – размах, точка – выброс.

Таким образом, выбор материала для воронок важен, поскольку он влияет на оценки численности нематод из-за различий в доле особей, оседающих на их стенках. Поэтому необходимо осторожно подходить к объединению данных разных исследований, если в публикациях не указан материал воронок. Смыв нематод, оставшихся на стенках воронок, позволяет снизить недооценку их численности, но в несколько раз увеличивает время работы, что нежелательно из-за короткого срока хранения образцов. Альтернативой смыву нематод со стенок для минимизации потерь может быть использование воронок и других компонентов установки из материалов с гидрофобными свойствами.

Анализ данных и подготовка рукописи выполнены в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН (проект № 122021000076-9). Автор выражает благодарность А. И. Ермакову за общую идею работы, Г. Ю. Смирнову и Т. Н. Орехову – за помощь

на всех этапах работы, О. В. Дуле и Е. Л. Воробейчику – за обсуждение результатов, а также двум анонимным рецензентам за полезные замечания.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yeates G.W., Gaugler R., Bilgrami A. Ecological and behavioural adaptations // *Nematode Behaviour* / Eds. Gaugler R. and Bilgrami A. L. 2004. Chapter 1. P. 1–24.
2. Van Den Hoogen J., Geisen S., Routh D. et al. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale // *Nature*. 2019. V. 572. № 7768. P. 194–198.
3. Yeates G.W. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects // *Biology and Fertility of Soils*. 2003. V. 37. № 4. P. 199–210.
4. Maurya S., Abraham S., Somasundaram S. et al. Indicators for assessment of soil quality: a mini-

- review // Environmental Monitoring and Assessment. 2020. V. 192. № 9. P. 1–22.
5. Bongers T., Ferris H. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring // Trends in Ecology & Evolution. 1999. V. 14. № 6. P. 224–228.
 6. Bezooijen J.V. Methods and techniques for nematology. Wageningen: Wageningen University, 2006. 112 p.
 7. Cesarz S., Schulz A.E., Beugnon R. et al. Testing soil nematode extraction efficiency using different variations of the Baermann funnel method // Soil Organisms. 2019. V. 91. № 2. P. 61.
 8. Viglierchio D., Schmitt R.V. On the methodology of nematode extraction from field samples: Baermann funnel modifications // Journal of Nematology. Society of Nematologists. 1983. V. 15. № 3. P. 438.
 9. Sulonovich B.K., Jamalova F.A., Mamarasulova N.I. et al. A comparative study of nematoda-fauna of pastoral plants in forest biotopes // Acad. Globe: Inderscience Research. 2022. V. 3. № 5. P. 41–45.
 10. Karmezji M., Bataka A., Papachristos D. et al. Nematodes in the pine forests of northern and central greece // Insects. 2022. V. 13. № 2. P. 194.
 11. Gorny A.M., Ye W., Cude S. et al. Soybean root-knot nematode: a diagnostic guide // Plant Health Progress. 2021. V. 22. № 2. P. 164–175.
 12. Van Sinh N., Kato R., Linh D. et al. Influence of rice husk biochar on soil nematode community under upland and flooded conditions: A microcosm experiment // Agronomy. 2022. V. 12. № 2. P. 378.
 13. Tintori S.C., Sloat S.A., Rockman M.V. et al. Rapid Isolation of Wild Nematodes by Baermann Funnel // J. of Visualized Experiments. 2022. P. 179.
 14. Ptatscheck C., Gansfort B., Traunspurger W. The extent of wind-mediated dispersal of small metazoans, focusing nematodes // Scientific Reports. 2018. V. 8. № 1. P. 1–10.
 15. Goncharov A.A., Gorbatova A.S., Sidorova A.A. Mathematical modelling of the interaction of winter wheat (*Triticum aestivum*) and Fusarium species (*Fusarium* spp.) // Ecological Modelling. 2022. V. 465. P. 109856.
 16. Team R.C.R. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing // <http://www.R-project.org/>. 2021.
 17. Груздева Л.И., Матвеева Е.М., Коваленко Т.Е. Фауна почвенных нематод различных типов леса заповедника «Кивач» // Труды Карельского научного центра РАН. 2006. № 10. С. 14–21.
 18. Сушук А.А., Матвеева Е.М., Калинкина Д.С. Почвенные нематоды лесных биоценозов особо охраняемых природных территорий Республики Карелия // Труды Карельского научного центра РАН. 2017. № 4. С. 49–61.
 19. Рахлеева А.А., Семенова Т.А., Стриганова Б.Р. и др. Динамика зоомикробных комплексов при разложении растительного опада в ельниках южной тайги // Почвоведение. 2011. № 1. С. 44–55.
 20. Li S., Song M., Jing S. Effects of different carbon inputs on soil nematode abundance and community composition // Applied Soil Ecology. 2021. V. 163. P. 103915.
 21. Кудрин А.А., Сушук А.А. Методы исследования сообществ почвенных нематод // Russ. J. of Ecosystem Ecology. 2022. Т. 7. № 2. С. 44–71.
 22. DeRosa R.L., Schader P.A., Shelby J.E. Hydrophilic nature of silicate glass surfaces as a function of exposure condition // J. of Non-Crystalline Solids. 2003. V. 331. № 1–3. P. 32–40.

Glass or Plastic? Influence of Funnel Material on the Efficiency of Nematode Extraction using the Baermann Method

A. D. Loginova^{1, *}

¹*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, 620144, Ekaterinburg*

**e-mail: loginova_ad@ipae.uran.ru*

Keywords: free-living nematodes, soil, forest litter, population assessment