

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

Кафедра микологии и альгологии

Микроскопические грибы, ассоциированные с наземными беспозвоночными

Исполнитель:

студентка IV курса

Староверова В.И.

Научный руководитель:

д.б.н., профессор

Кураков А.В.

Актуальность

Грибы могут образовывать прочные симбиотические, паразитические, топические связи с насекомыми и другими беспозвоночными, но во многих случаях характер этих взаимодействий неизвестен.

Грибные организмы можно обнаружить на поверхности и в пищеварительном тракте беспозвоночных; они развиваются в экскрементах и внутри гнёзд беспозвоночных-хозяев.

Выявление грибов, ассоциированных с наземными беспозвоночными животными, представляет не только актуальную научную, но и прикладную задачу, решение которой может способствовать улучшению технологии вермикомпостирования и биоконтроля численности насекомых-вредителей.

Цель работы – определить состав грибов, ассоциированных с беспозвоночными животными – дождевыми червями *Eisenia foetida* и *Lumbricus rubellus* и муравьями *Lasius niger*.

Задачи исследования

1. Выделить чистые культуры грибов с поверхности хитинового покрова, из пищеварительного тракта и экскрементов муравьёв *L. niger*, обитающих в природе и поддерживаемых в лабораторных условиях, и установить их таксономическую принадлежность.
2. Провести выделение чистых культур микромицетов из пищеварительного тракта и копролитов дождевых червей *E. foetida* и *L. rubellus*.
3. Для выявления видов, устойчивых к среде пищеварительного тракта *E. foetida* и *L. rubellus* и, возможно, обитающих в этих условиях, провести эксперимент с длительным выдерживанием червей без пищи.
4. Установить таксономическую принадлежность микромицетов в пищеварительном тракте исследуемых видов червей и создать коллекцию изолятов из этого местообитания

Объекты, микобиоту которых исследовали

Lasius niger

(чёрный садовый муравей)



http://www.myrmecoforum.com/image/1198/dsc_3377_17



http://www.antmania.pl/sites/default/files/photo_opisy_gatunkow/niger1-0.jpg

Eisenia foetida

(навозный червь)



http://www.natuga.de/wurmversand-dateien/eisenia_foetida_a_771.jpg

Lumbricus rubellus

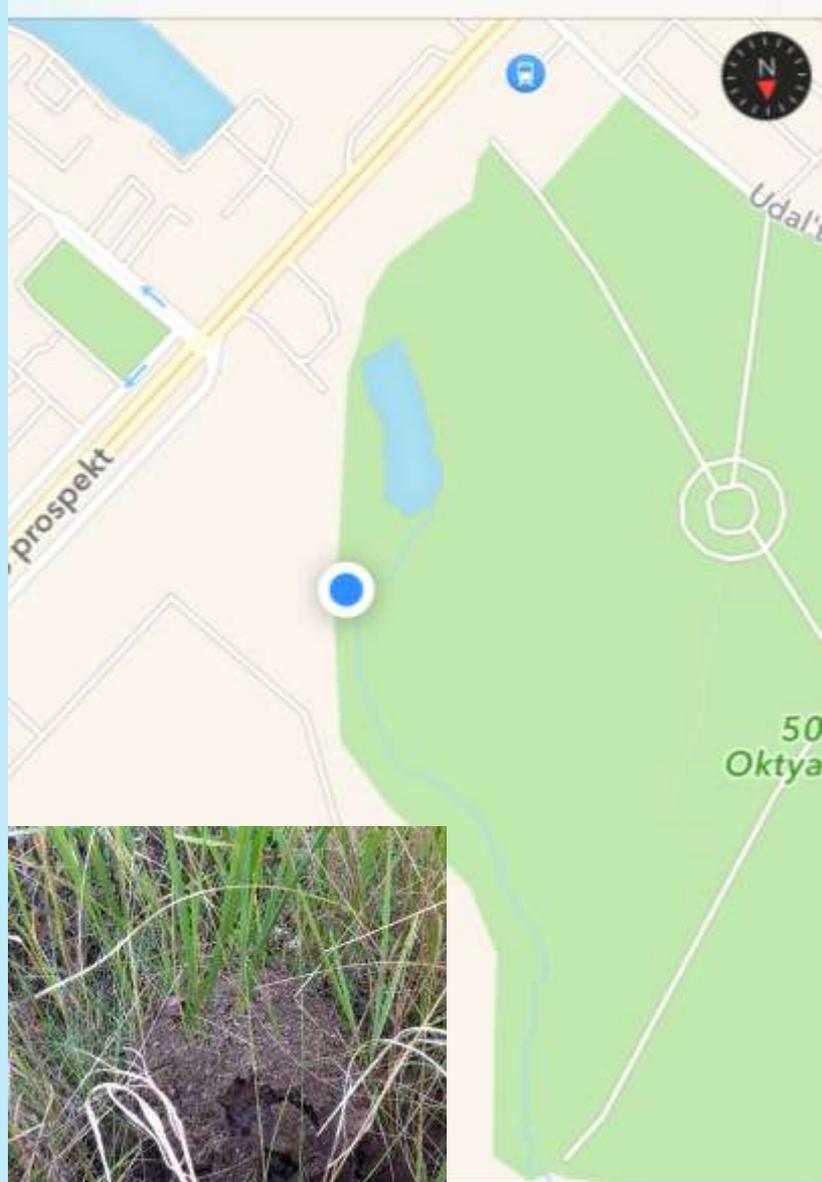
(красноватый дождевик)



http://www.discoverlife.org/IMG/I_MWS/0803/320/Lumbricus_rubellus,I_MWS80339.jpg

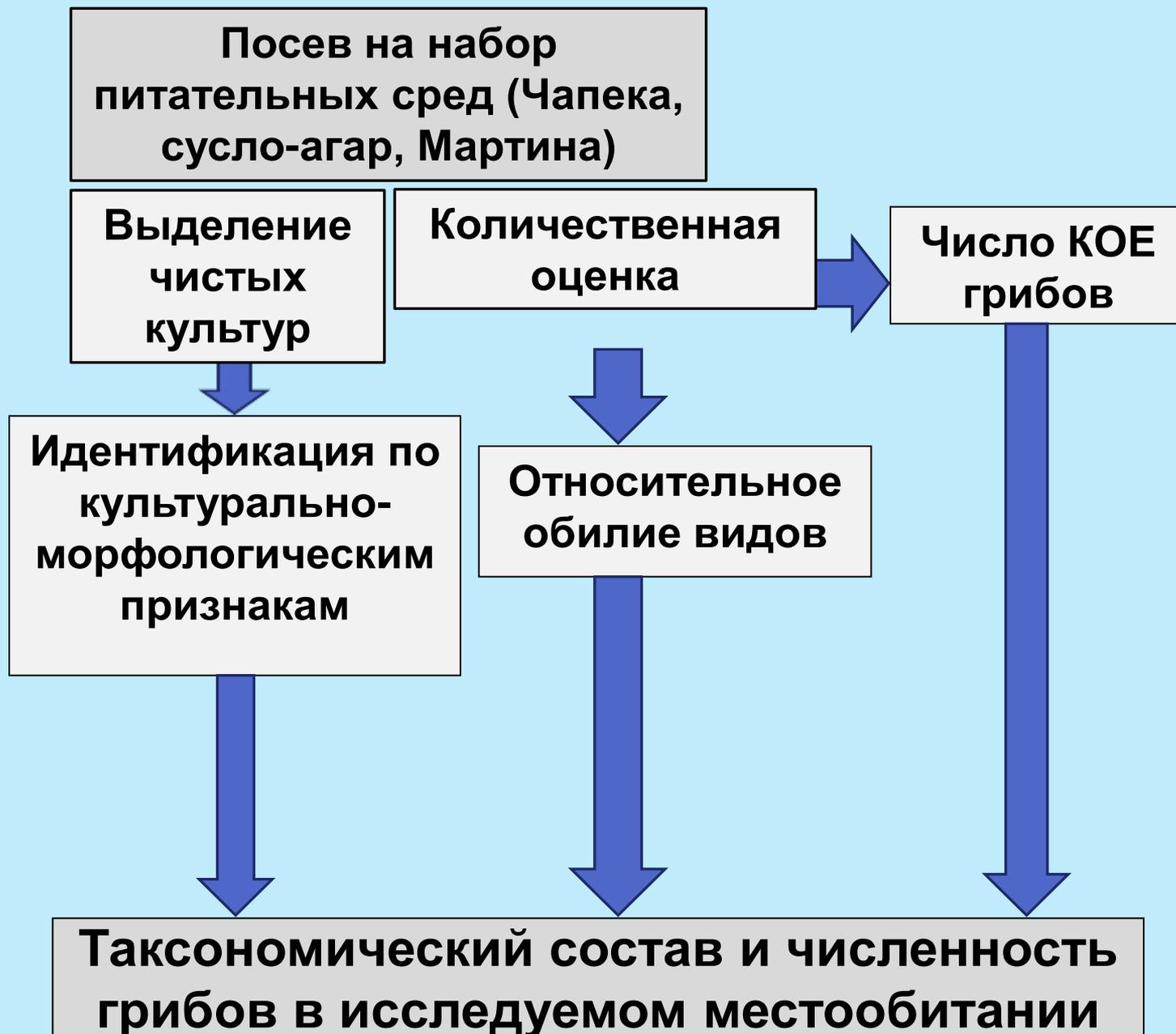
Место сбора живого материала:

- 1) Московская обл., Волоколамский р-н, село Сапегино (дождевые черви);
- 2) Парк 50-летия Октября, г. Москва (муравьи из природного гнезда);
- 3) Биологический факультет МГУ, каф. биологической эволюции (муравьи из лабораторного гнезда-садка).



Гнездо лязиуса

Методы исследования



Дизайн эксперимента с дождевыми червями:

1. Извлечение пищеварительного тракта с содержимым из червей при помощи глазного скальпеля. Всего 45 особей, обитавших в дерново-подзолистой луговой почве в течение 2-х месяцев: 9+36 (*L. rubellus* и *E. foetida* соответственно). Использована 3-х кратная повторность для каждого вида, число чашек с каждым типом среды кратно 3;
2. Получение очищенного от содержимого пищеварительного тракта путём выдерживание червей без пищи в течение 5, 7, 9, 19, 37 сутки при 5°C и извлечение пищеварительного тракта (для 3-5 особей вида на каждый срок). Всего 24 шт. *E. foetida* и 9 шт. *L. rubellus*;
3. Сбор копролитов дождевых червей на 1, 2, 7 сутки их содержания без пищи (3-х кратная повторность для копролитов червей обоих видов; 7-ми суточные только для *E. foetida*).

Дизайн эксперимента с муравьями:

1. Получение двух последовательных водных “смывов” с тел живых муравьёв обеих групп на мешалке Vortex (Закалюкина и др., 2014) для выявления состава грибов на хитиновом покрове;
2. Для изучения микобиоты пищеварительного тракта проведение короткой поверхностной обработки тел муравьёв 96° этанолом в течение 2-5 секунд с последующим растиранием и посевом;
3. Для выявления микромицетов в пище лабораторных насекомых из гнезда-садка проводили прямой посев сахарного сиропа и растёртых дрозофил по 1 шт.; посев экскрементов делали в двух вариантах: прямое нанесение крупинок экскрементов из одной навески, разведение в 0,2 мл стерильной воды для другой с последующим распределением.

Для всех посевов использована 5-кратная повторность и 5 чашек со средой каждого типа.

Установлено, что состав грибов на поверхности муравьёв включает многие почвенные виды: *Alternaria botrytis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Dipodascus geotrichum* и несколько видов аспергиллов и представителей рода *Mucor* (табл. 1, 2). Замечено, что видов на поверхности лабораторных особей значительно меньше.

Причина: грибное сообщество лабораторного гнезда существенно беднее природного.

Видовое богатство грибного сообщества экскрементов и пищеварительного тракта муравьёв обеднено, что может быть связано с гибелью спор в агрессивной среде кишечника или использованием их в качестве пищевого субстрата муравьями обеих групп. В экскрементах муравьёв обнаружены грибы родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*. *Phoma eupyrena* и два стерильных мицелия обнаружены только в экскрементах муравьёв из природного гнезда.

Таблица 1. Состав грибов на поверхности, в пищеварительном тракте и экскрементах природной популяции *Lasius niger*

Род/Вид	Покров	Содержимое кишечника	Экскременты
<i>Alternaria botrytis</i> (Preuss) Woudenberg & Crous	+		
<i>Aspergillus cervinus</i> Masee	+		
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	+		
<i>Aspergillus repens</i> (Corda) Sacc.	+		
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	+	+	
<i>Cladosporium</i> sp.	+		
<i>Dipodascus geotrichum</i> (E.E. Butler & L.J. Petersen) Arx	+		
<i>Fusarium</i> sp.			+
<i>Mucor</i> spp.	+		
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	+		
<i>Penicillium canescens</i> Sopp	+	+	
<i>Penicillium lanosum</i> Westling	+		
<i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudem.) Thom			+
<i>Phoma eupyrena</i> Sacc.	+		+
Вид дрожжевого гриба (близок к <i>Candida</i>)		+	
Стерильный мицелий 1.1			+
Стерильный мицелий 1.2			+

Таблица 2. Состав грибов на поверхности, в пище и экскрементах *Lasius niger*, поддерживаемого в лабораторных условиях

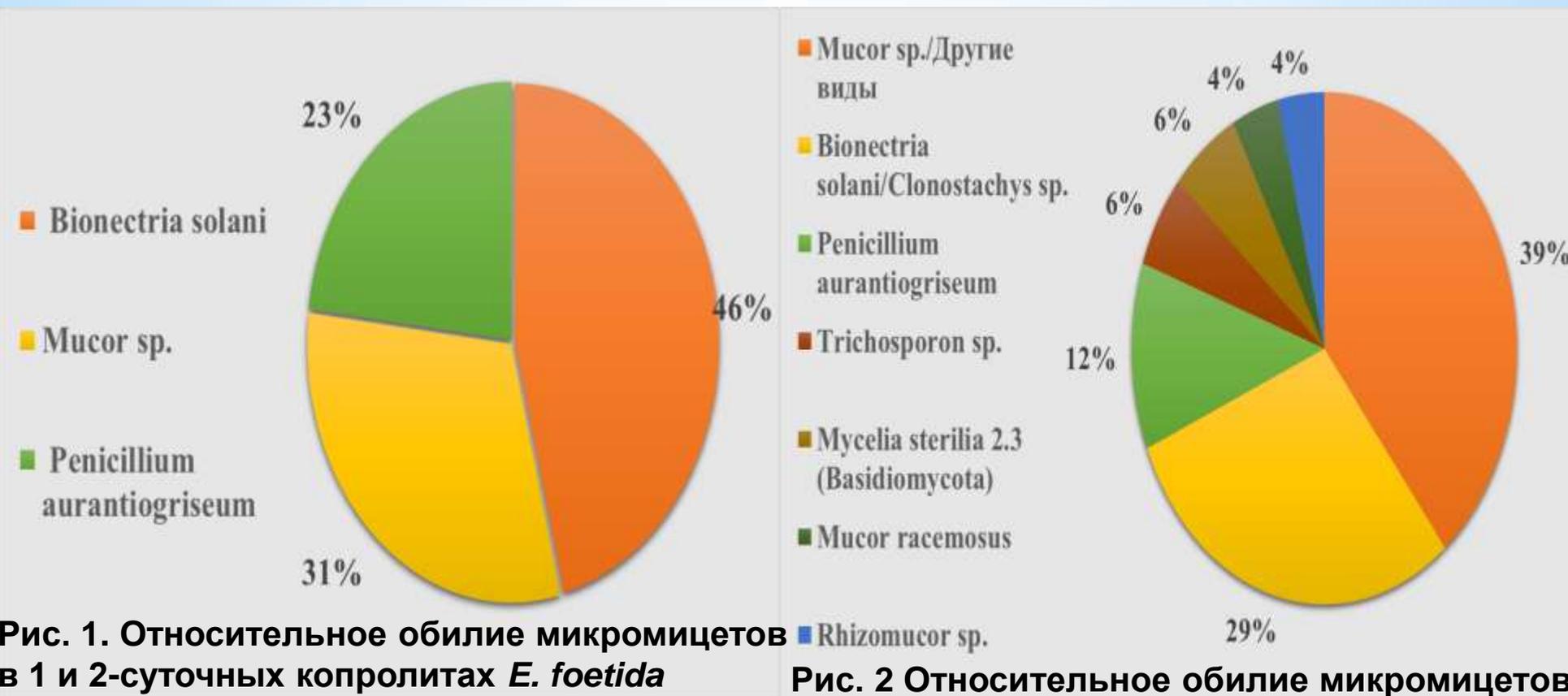
Род/Вид	Покров	Пища		Экскр-ты
		Сах. сироп	Дрозофилы	
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	+			
<i>Aspergillus repens</i> (Corda) Sacc.		+		
<i>Candida</i> sp.	+			
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	+			
<i>Dipodascus geotrichum</i> (E.E. Butler & L.J. Petersen) Arx	+			
<i>Gibberella tricineta</i> El-Gholl, McRitchie, Schoult. & Ridings				+
<i>Mucor</i> sp.				+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	+	+	+	
<i>Penicillium commune</i> Thom				+
<i>Penicillium citrinum</i> Thom		+		
<i>Penicillium lanosum</i> Westling	+			
<i>Penicillium restrictum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbott		+		
<i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudem.) Thom		+		
<i>Talaromyces purpleogenus</i> Samson		+		
<i>Trichoderma atroviride</i> P. Karst				+
Стерильный мицелий (тёмный)		+		

Таблица 3. Состав грибов в дерново-подзолистой почве, в которой содержали

Род/Вид	червей	Косимый луг	
		A _{дерн}	A ₁
<i>Acremonium furcatum</i> Moreau & F. Moreau ex Gams		+	+
<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) G. Winter		+	
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze			+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries		+	+
<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams		+	+
<i>Coniothyrium</i> sp.		+	
<i>Eupenicillium</i> F. Ludw.		+	
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldt.		+	+
<i>Gliomastix murorum</i> (Corda) S. Hughes			+
<i>Humicola grisea</i> Traaen		+	+
<i>Metarhizium carneum</i> (Duché & R. Heim) Kepler, Rehner & Humber		+	+
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer		+	
<i>Penicillium commune</i> Thom		+	+
<i>Penicillium</i> sp.		+	+
<i>Penicillium waksmanii</i> K.M. Zaleski		+	
<i>Phoma eupyrena</i> Sacc.		+	+
<i>Phoma</i> sp.		+	
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson		+	
<i>Talaromyces funiculosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert		+	+
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier		+	+
<i>Trichoderma piluliferum</i> J. Webster & Rifai			+
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai		+	+
<i>Trichoderma viride</i> Pers.		+	+
Стерильный мицелий 1			+
Стерильный мицелий 2		+	

В свежих копролитах червей обоих видов разнообразие микромицетов ниже, чем в почве. Преобладают виды мукоровых грибов и обильно представлены *Bionectria solani* и *Clonostachys* sp., *Penicillium aurantiogriseum* и виды, развивающиеся в форме стерильного мицелия (рис. 3, 4).

Это в основном быстрорастущие грибы, начинающие колонизировать этот более свободных экотоп.



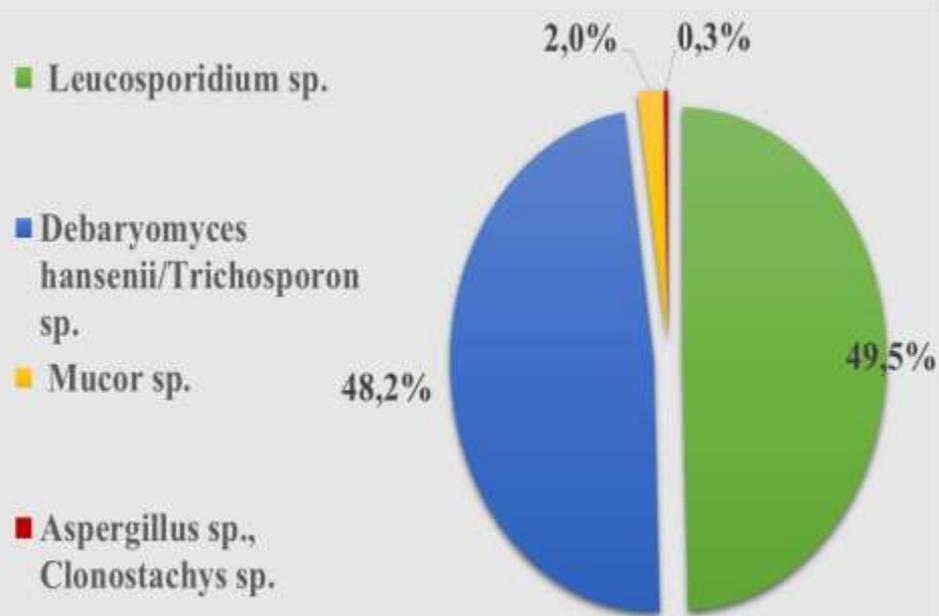


Рис. 3 Относительное обилие микромицетов в очищенном кишечнике *E. foetida*

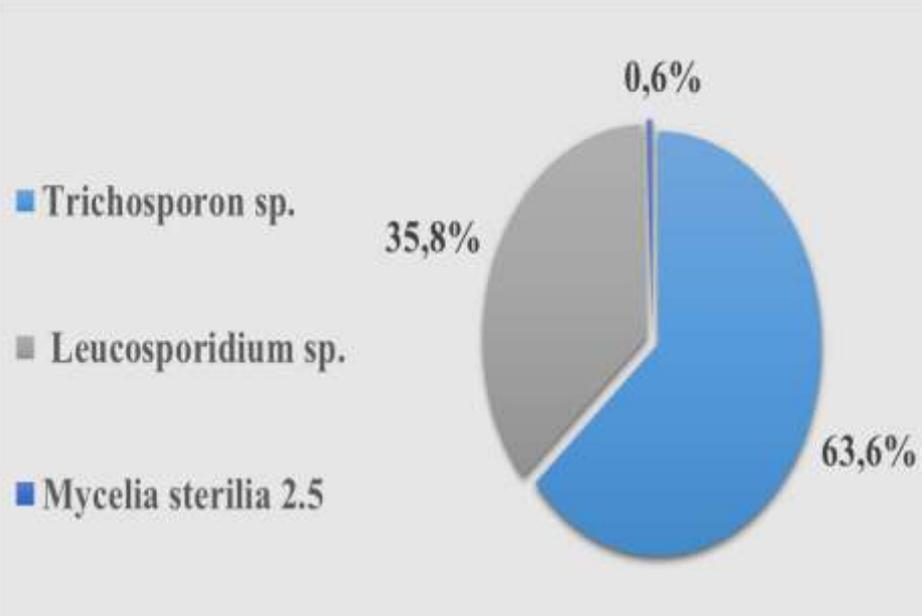


Рис. 4 Относительное обилие микромицетов в очищенном кишечнике *L. rubellus*

В составе грибов пищеварительном тракте дождевых червей отмечены более существенные отличия от почвенной микобиоты.

В пищеварительном тракте червя *E. foetida* обнаружены как виды из почвенного сообщества (*Clonostachys* sp., *Mucor hiemalis* и ряд других), так и представители родов *Leucosporidium* и *Trichosporon*, которые продолжали выделяться из кишечника *E. foetida* при их содержании без пищи.

В очищенном от содержимого пищеварительном тракте червей *E. foetida* преобладают дрожжи *Debaryomyces hansenii*, *Leucosporidium* sp., *Trichosporon* sp., и обнаружено небольшое количество представителей видов мукоровых грибов, единично встречались *Aspergillus* sp. и *Clonostachys* sp. (рис.3).

В очищенном кишечнике *L. rubellus* к 37 суткам его содержания без пищи почвенные виды вообще отсутствовали, а выделялись только дрожжевые грибы (рис. 4)

Можно полагать, что дрожжевые грибы (*Debaryomyces hansenii*, *Leucosporidium* sp, роды *Trichosporon* и *Candida*) и, возможно, такие быстрорастущие виды как *Mucor* sp. и *Rhizopus stolonifer*, которые также быстро размножаются и являются r-стратегами, способны удержаться в пищеварительном тракте дождевых червей.

Для видов *E.fetida* и *L. rubellus* их доминирование в очищенном от пищи кишечнике показано впервые. Ранее только у дождевого червя *Aporectodea caliginosa* отмечали наличие дрожжевых грибов в пищеварительном тракте (Харин, 2008; Кураков, Харин, 2014).

Известно, что дрожжевые грибы обычные ассоцианты кишечника личинок жесткокрылых, лубоедов, и полученные нами данные позволяют утверждать, что пищеварительный тракт таких животных, как дождевые черви также является для этой группы грибов типичным местообитанием, и они доминируют в нём относительно других видов.

В случае с садовым муравьем для выявления грибов-ассоциантов кишечного тракта необходимо провести дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. Состав грибов на поверхности наружного покрова, в пищеварительном тракте и свежих экскрементах садового муравья *L. niger* существенно различается в зависимости от его местообитания. Видовое разнообразие грибных сообществ в пищеварительном тракте и экскрементах во много раз меньше, чем в исходной пище и окружающей среде. На поверхности тела *L. niger* отмечено большое разнообразие грибов, особенно у особей из природного местообитания по сравнению с таковым у лабораторных.
1. Грибные сообщества в свежих копролитах дождевых червей *E. foetida* и *L. rubellus* отличны от почвенных сообществ. В них доминируют быстрорастущие и обильно спороносящие виды мицелиальных микромицетов (муковых, пенициллов, бιονектрии, встречаются дрожжевые формы).

3. В очищенном пищеварительном тракте дождевых червей *E. foetida* и *L. rubellus* в результате содержания без пищи доминировали дрожжевые грибы родов *Leucosporidium*, *Trichosporon*, *Candida* и *Debariomycetes*. Эти организмы устойчивы к длительному существованию в этом местообитании и, по-видимому, представляют ту группу грибов, которая наиболее тесно с ними ассоциирована.
4. Создана коллекция мицелиальных и дрожжевых грибов из 25 видов и 78 штаммов, которые по происхождению представляют изоляты из пищеварительного тракта, копролитов *E. foetida* и *L. rubellus* и наружных покровов и экскрементов *L. niger*

Спасибо за внимание!



Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю **Куракову Александру Васильевичу** за всестороннюю поддержку и помощь в выполнении работы, **Сидоровой Ирине Ивановне** за рецензию.

За помощь в сборе материала автор благодарит сотрудников кафедры биологической эволюции **Конорова Евгения Андреевича** и **Скобееву Викторию Александровну**, а также **Жуковскую Елену Александровну** – сотрудника лаборатории биологии развития животных – за помощь в работе с дождевыми червями. За неоценимую помощь в определении грибов автор выражает благодарность **Биланенко Елене Николаевне**.