



МГУ им. М.В. ЛОМОНОСОВА

Взаимодействия грибов и дождевых червей

КУРАКОВ А.В., ХАРИН С.А.

**VII Микологическая школа-конференция на
Звенигородской биостанции, 2-8 августа 2015 г.**

**"Плуг - одно из древнейших и ценнейших
изобретений человека;
но задолго до того, как он существовал,
земля на самом деле регулярно пахалась и до
сих пор продолжает пахаться дождевыми
червями"**

Чарльз Дарвин

"Дождевые черви - кишечник почвы"

Аристотель

Грибы представляют ведущий по биомассе и активности блок редуцентов,

дождевые черви – консументов,

типичных организмов - средообразователей или экосистемных инженеров.

- Кольчатые черви
- Класс: Поясковые черви
- Отряд: *Harlotaxida*
- Подотряд: Земляные черви
- Семейства

Acanthodrilidae

Criodrilidae

Eudrilidae

Glossoscolecidae

Lumbricidae

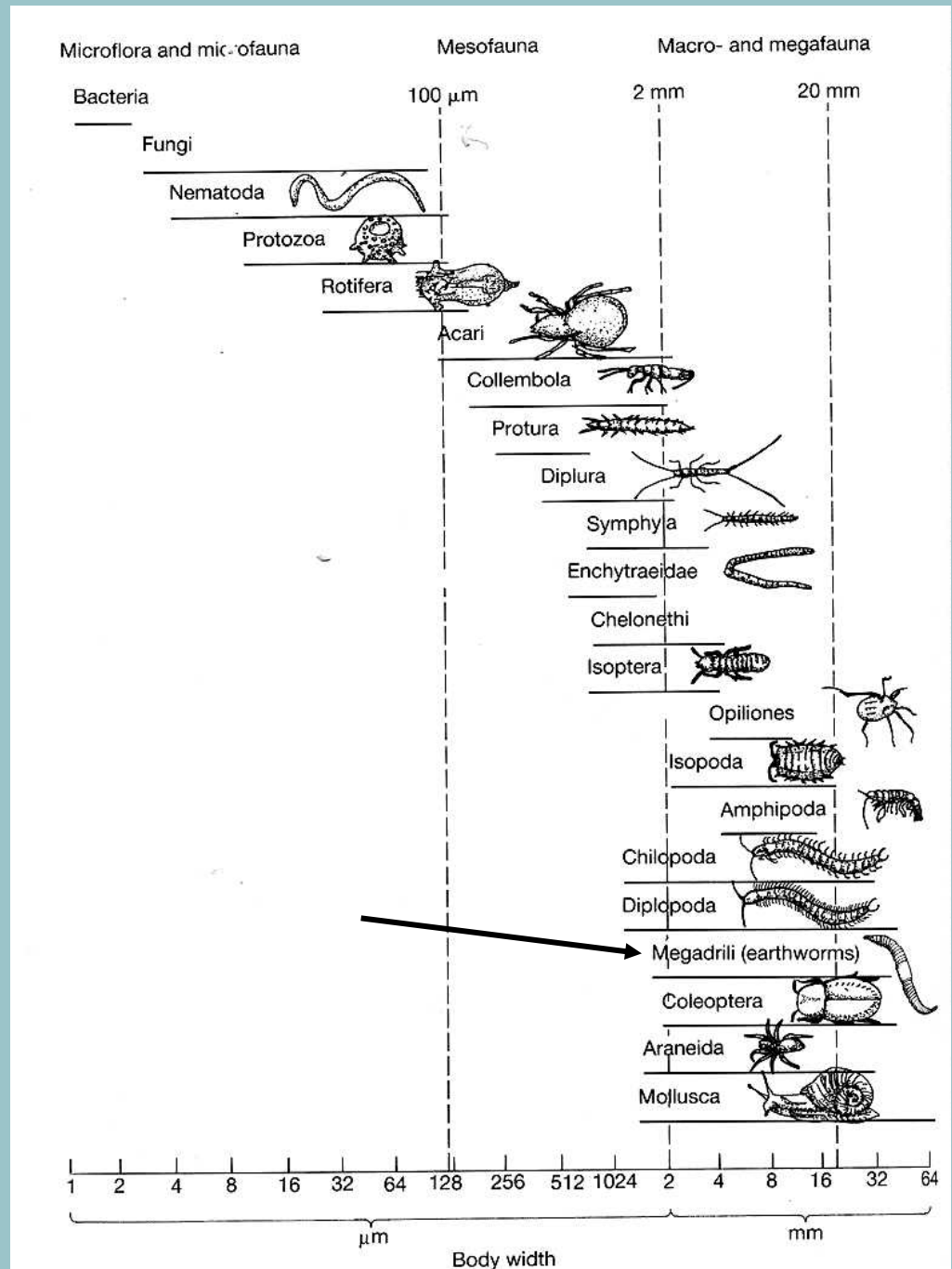
Megascolecidae

3000 видов

Размеры взрослых особей

от 0,2-1 см до 3 м

(*Megascolides australis*)



Экологические группы дождевых червей



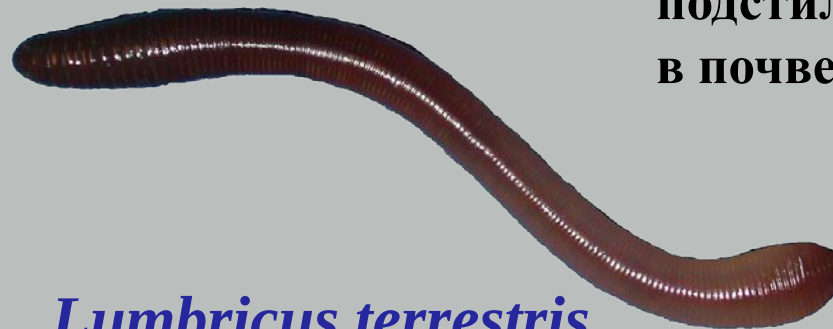
Aporrectodea caliginosa

Эндогейные, живут в минеральных горизонтах почв в горизонтальных норах



Eisenia fetida

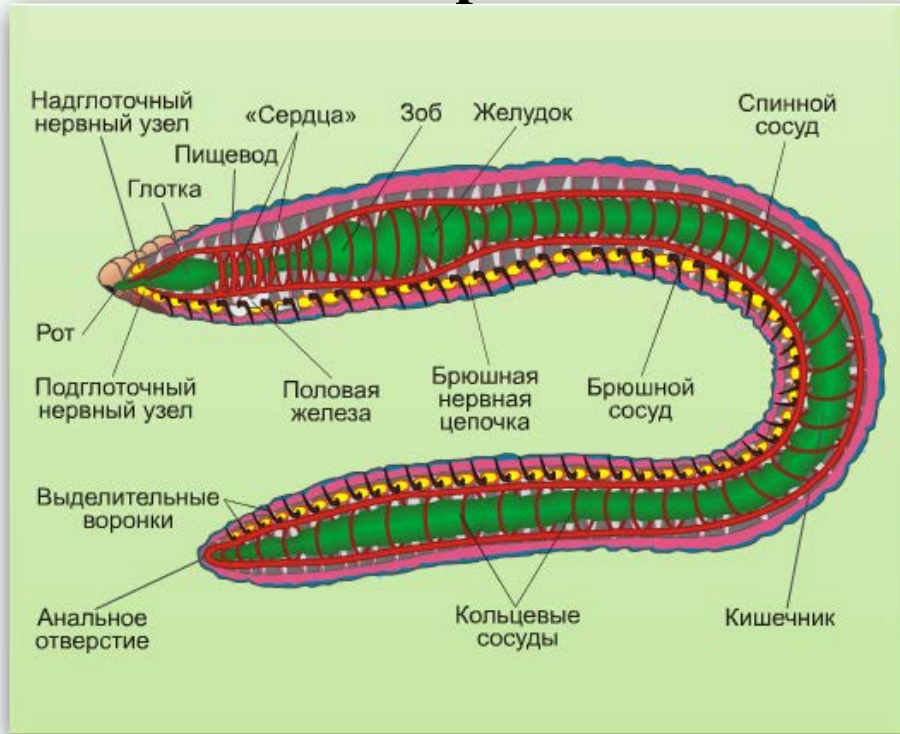
Компостные и подстилочные, обитают в разлагающихся органических остатках, подстилке, не образуют нор в почве



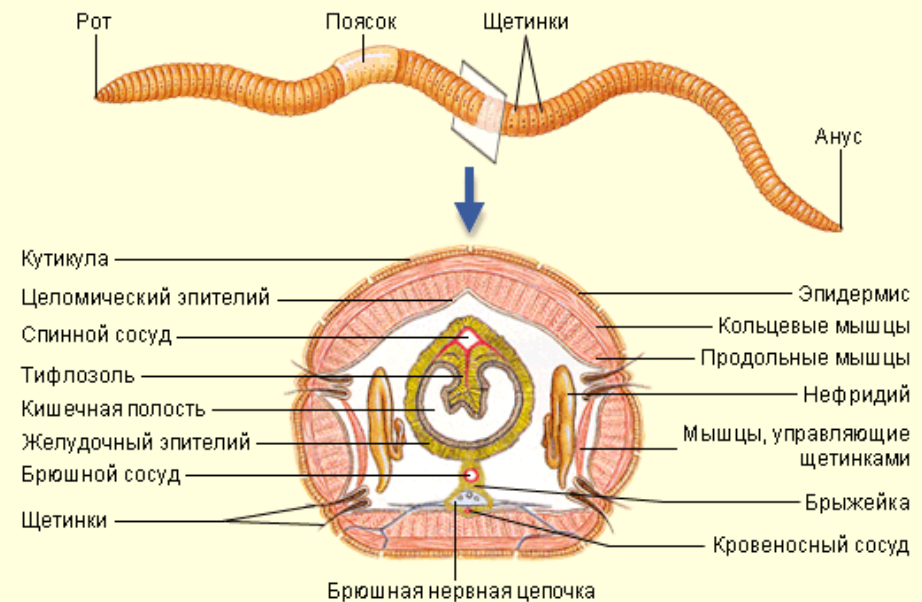
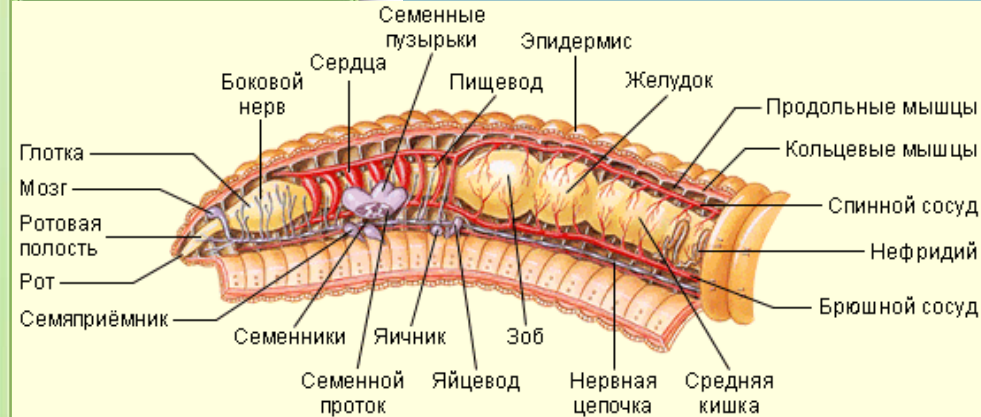
Lumbricus terrestris

Норные, формируют вертикальные норы и питаются растительными остатками смешанными с органо-минеральными частицами почвы

Строение дождевых червей



СИСТЕМЫ ОРГАНОВ	
■	Кровеносная
■	Выделительная
■	Пищеварительная
■	Нервная
ОРГАНЫ	
■	Половая железа



Каким образом грибы и дождевые черви могут влиять друг на друга и каковы механизмы этих воздействий?

Влияние дождевых червей на грибы

- Метабиотическое, не прямое - имеет комплексный характер, при котором четкое разделение разных механизмов воздействия провести сложно. Это изменение порозности и структуры почв, ее химических свойств, перемешивание, измельчение и потребление растительных остатков, создание принципиально новых эконих для грибов.
- Форическое – перенос спор и фрагментов мицелия по почвенному профилю в горизонтальном и вертикальном направлениях,
- Трофическое, использование грибов в пищу
- Метаболическое – действие выделяемых в пищеварительном тракте биологически-активных соединений (аминокислот, витаминов, пищеварительных ферментов, киллерных веществ и т.д.) на жизнеспособность грибов.
- Фрагментация мицелия
- Абразивный и протекторный эффект органо-минеральных частиц на жизнеспособность пропагул
- Избирательность потребления грибов
- Действие целомической жидкости
- **Влияние грибов на дождевые черви должно зависеть от**
- пула, питательной ценностью грибной биомассы для червей,
- видовой структурой сообществ почвообитающих грибов,
- спектра и количества биологически-активных веществ, ими продуцируемых.

Воздействие дождевых червей на физико-химические свойства почвы

Объем, занимаемый ходами, составляет до 5% от общего объема почвы (Edwards, Lofty, 1977).

Годовая продукция копролитов червями в почвах составляет десятки-сотни тонн на гектар.

За 50–100 лет верхние горизонты пахотных почв пропускаются через пищеварительный тракт дождевых червей (Barois et al., 1993; Makeschin, 1997).



Дождевые черви экскретируют с кишечной и поверхностной слизью разнообразные метаболиты – водорастворимые белки, аминокислоты (аспарагин, серин, глицин), этаноламин, соединения кальция, мочевины, которая быстро гидролизуется до аммония.

Ежедневный выход азота из червей с выделениями достигает нескольких десятков килограмм на гектар в год (Makeshin, 1997).



Метабиотическое воздействие

1. Изменение червями физико-химических условий среды (например, более высокое содержание доступных источников углерода и азота в копролитах и дрилофере, в сравнении с окружающей почвой).

И это действительно отражается, как показывают наши данные и анализ литературы, на биомассе и составе грибов в почвах (*L. terrestris* и *A. caliginosa*, и в меньшей степени относится *E. fetida*, в случае дрилоферы) .

2. Транслокация растительных остатков с поверхности почвы в минеральные горизонты (Тиунов, 2007). (*L. terrestris*)

3. Перемешивание в пищеварительном тракте растительного опада и минеральной почвы (Тиунов, 2007).

Сообщество микромицетов в копролитах *L. terrestris* при питании почвой и опадом представляло собой смесь "подстилочных" и "почвенных" видов, причем их относительное обилие зависело от массовой доли почвы и опада в копролитах.

Для эндогейных (*A. caliginosa*) и эпигейных червей (*E. fetida*) перемешивание почвы с растительным субстратом имеет меньшее значение.

Прохождение грибов через пищеварительный тракт червей

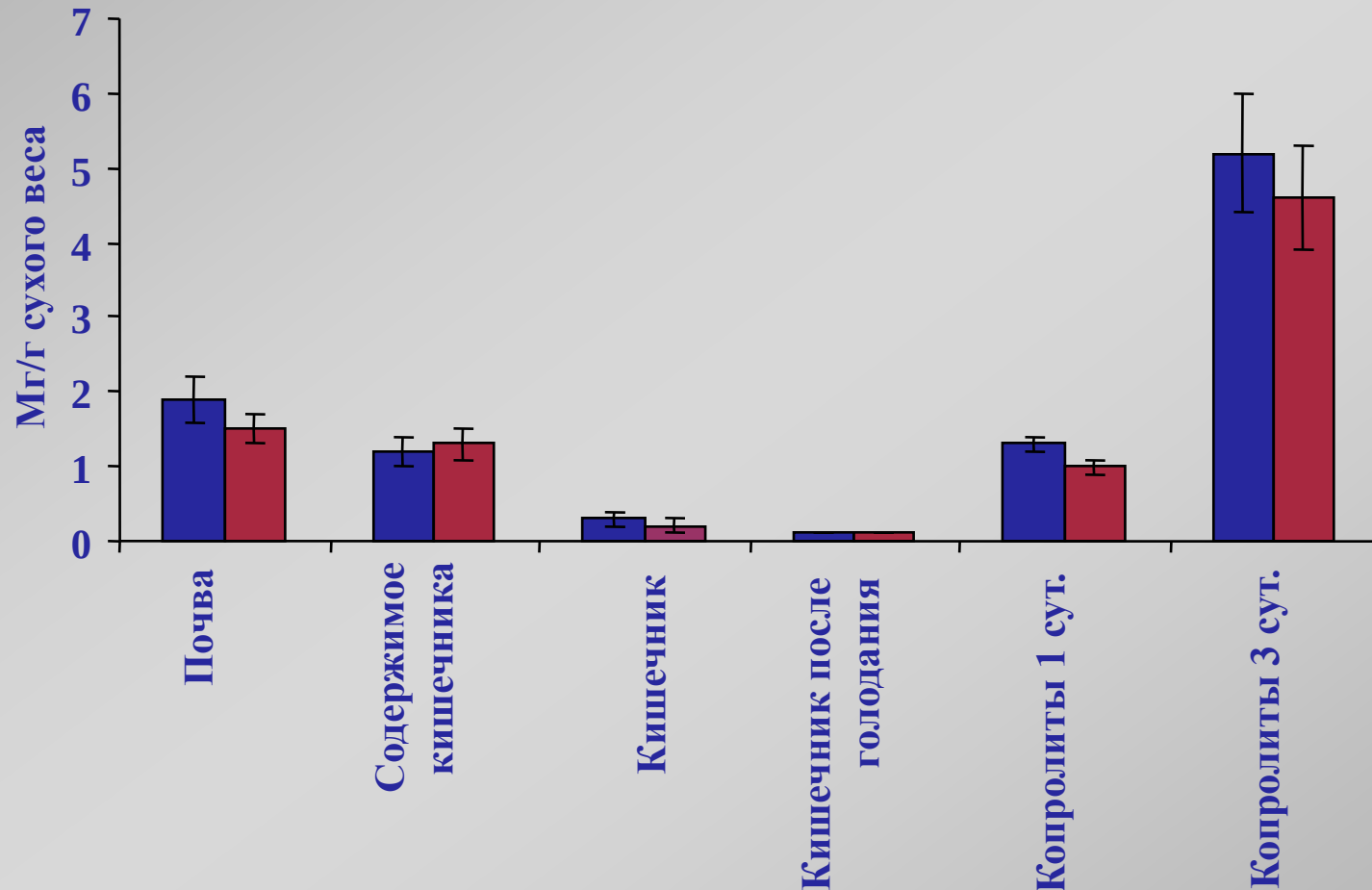
- Два противоположных воздействия
- Повышенный уровень обеспечения питательными веществами и водой в кишечнике должен увеличивать численность микроорганизмов при пассаже через пищеварительный тракт,

и в тоже время на них не может не влиять негативно пищеварительная жидкость.

**Численность КОЕ грибов в почве/компосте,
пищеварительном тракте и свежих копролитах
дождевых червей**

Вариант	КОЕ/г x 10 ⁵ (сухой вес)		
	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	<i>Lumbricus terrestris</i>	<i>Eisenia fetida</i>
Почва/Компост	1.4 ± 0.5	1.7 ± 0.6	4.4 ± 1.2
Пищеварительный тракт	1.2 ± 0.4	0.7 ± 0.0	6.4 ± 2.9
Копролиты	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1	6.2 ± 0.1

Биомасса грибного мицелия в дерново-подзолистой почве, содержимом кишечника, очищенном пищеварительном тракте и копролитах *Aporrectodea caliginosa*

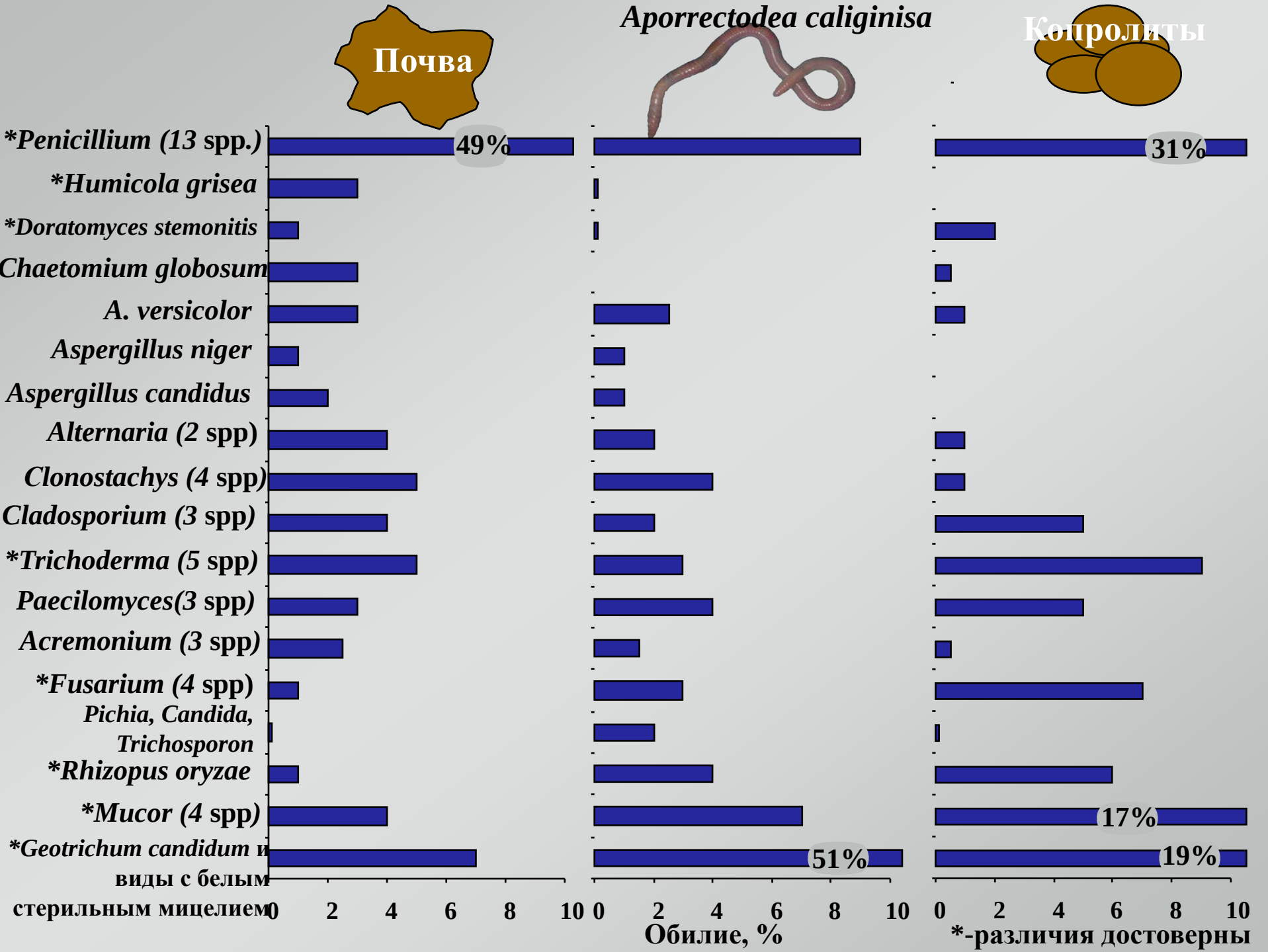


Люминесцентные красители ■ -Калькофлюор ■ -Флуоресцеин диацетат(ФДА)

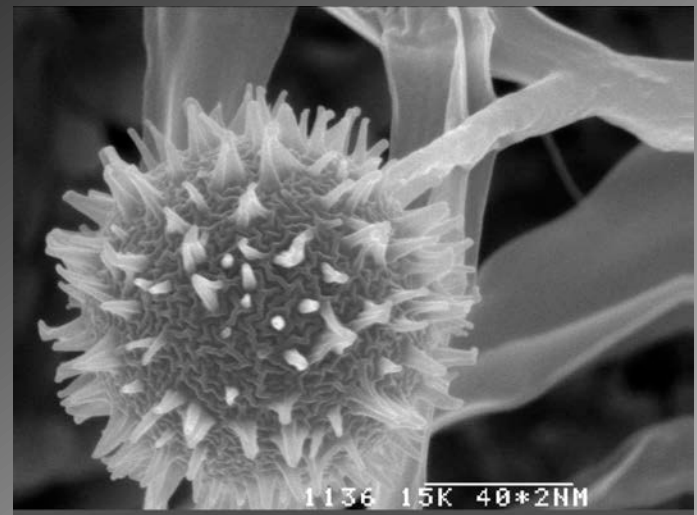
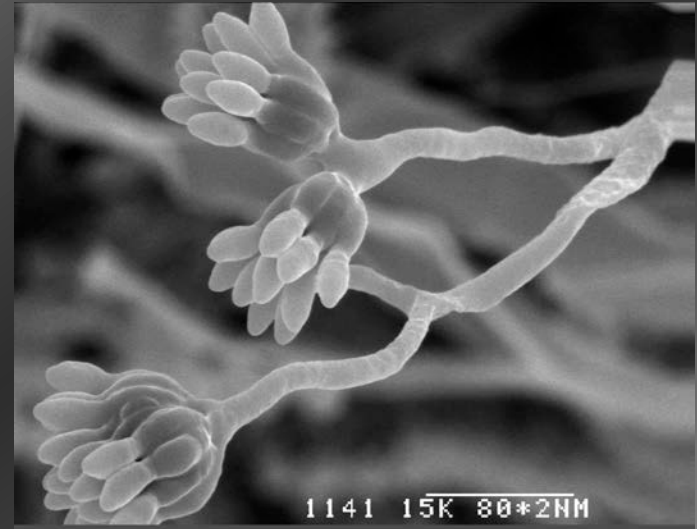
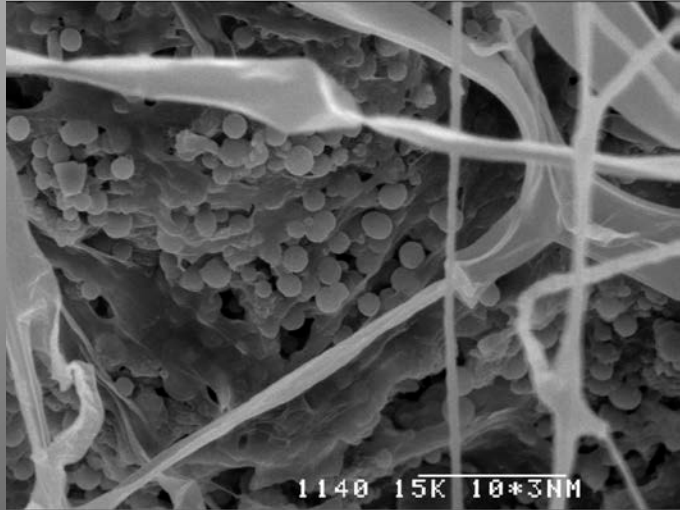
Значение индекса разнообразия и выровненности видов в сообществах микроскопических грибов почвы/компоста, пищеварительного тракта и копролитов дождевых червей

Показатель	<i>A. caliginosa</i>			<i>L. terrestris</i>			<i>E. fetida</i>		
Число видов	70*	47**	37***	70*	35**	30***	43*	40**	32***
Индекс Шеннона	4.58	3.61	2.83	4.58	2.79	2.28	3.47	3.11	2.46
Индекс Пиелу	1.08	0.94	0.78	1.08	0.79	0.67	0.92	0.84	0.71

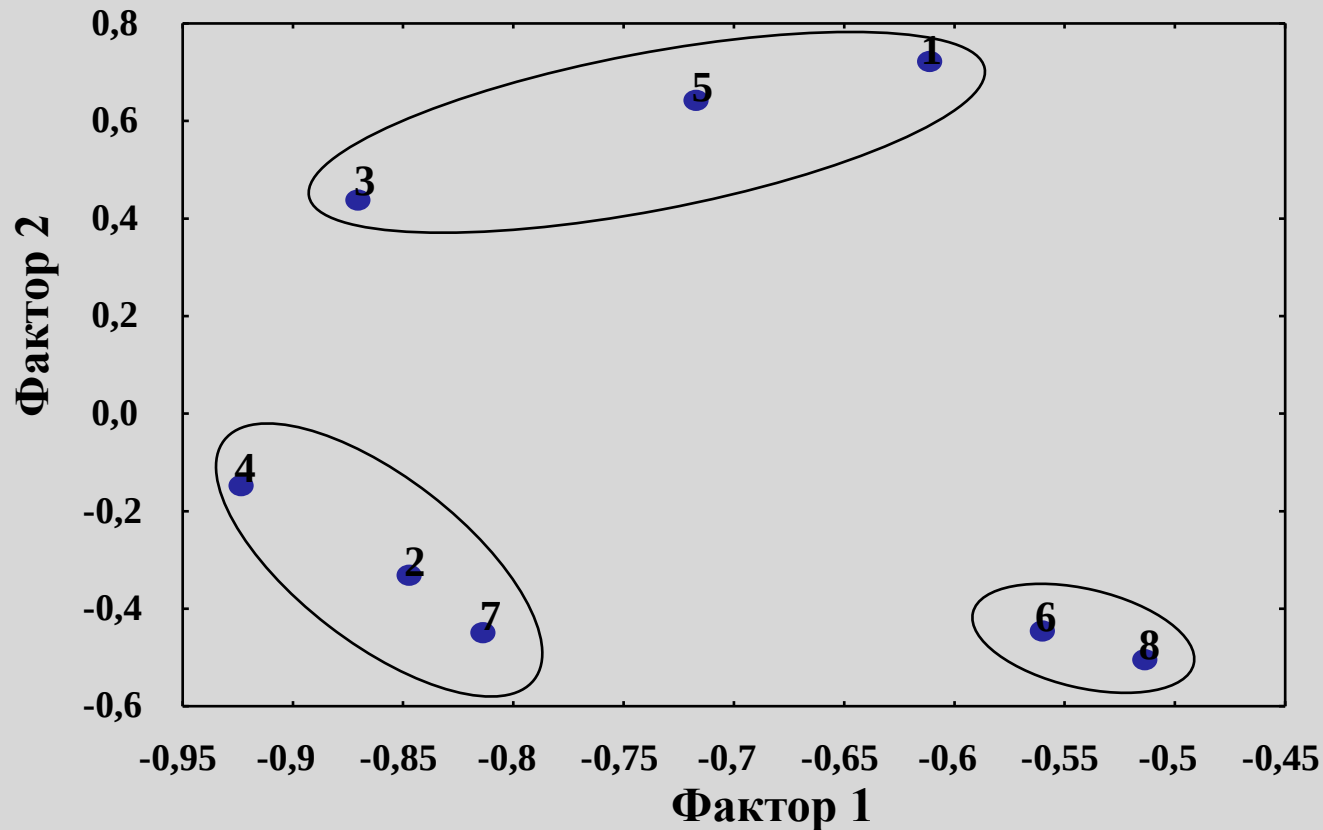
*- почва, **- содержимое кишечника, ***- копролиты



Микроорганизмы, активно развивающиеся в копролитах *Aporrectodea caliginosa*



Положение сообществ микромицетов местообитаний, ассоциированных с дождевыми червями, в осях двухфакторного анализа



- | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| 1 – Дерново-подзолистая почва | 4 – Кишечник <i>L. terrestris</i> | 6 – Компост |
| 2 – Кишечник <i>A. caliginosa</i> | 5 – Копролиты <i>L. terrestris</i> | 7 – Кишечник <i>E. fetida</i> |
| 3 – Копролиты <i>A. caliginosa</i> | | 8 – Копролиты <i>E. fetida</i> |

Физиологическое состояние грибных популяций в местообитаниях, связанных с дождевыми червями

Расписание появления колоний бактерий на поверхности твердых питательных сред при посевах из чистых культур и почв, согласно Хаттори (Ishikuri S., Hattori T., 1984), описывается следующим экспоненциальным уравнением:

$$N(t) = N_{\infty}(1 - e^{-\lambda(t - tr)}) \quad (1)$$

$N(t)$ - количество колоний к данному моменту времени t ; N_{∞} - финальное число колоний; λ - вероятность образования колоний отдельной клеткой в единицу времени; tr - время задержки (включающее в себя lag-период и время до образования колонии, видимой невооруженным глазом).

Условием применения уравнения (1) для определения tr – времени появления колоний и λ - вероятности размножения клеток, которые характеризует их физиологическое состояние, служит соответствие расписания появления колоний микроорганизмов на твердых средах распределению Пуассона (2).

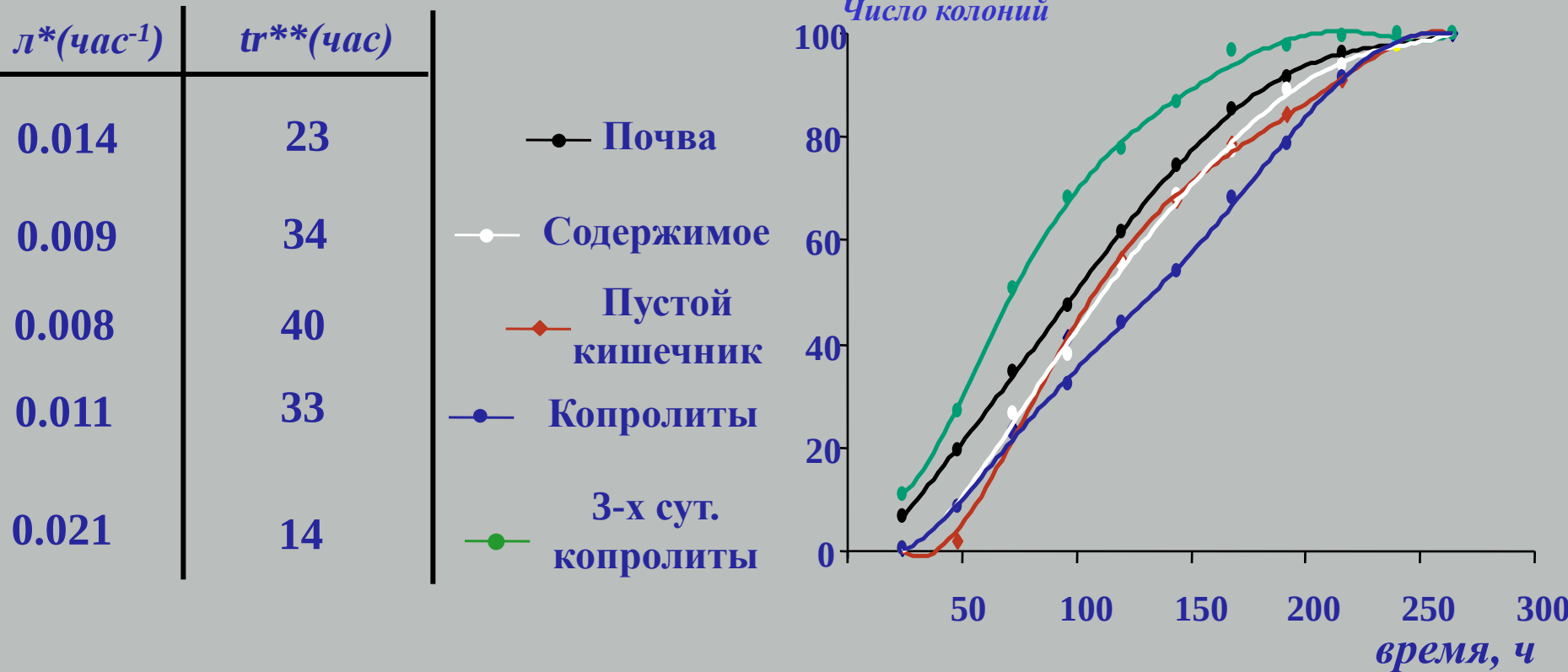
$$P = x_{cp}^x e^{-x_{cp}} / x! \quad (2)$$

Одним из доказательств того, что на твердых питательных средах колонии появляются с частотами, соответствующими распределению Пуассона, является достоверное равенство среднего числа появления колоний в единицу времени и дисперсии этого среднего (3).

$$x_{cp} = \sigma^2 \quad (3)$$

То есть при отсутствии значимых отличий между x_{cp} и σ^2 можно считать, что вероятностное распределение частот появления колоний подчиняется закону Пуассона.

Расписание появления колоний грибов в посевах образцов местообитаний, связанных с дождевым червем *A. caliginosa*



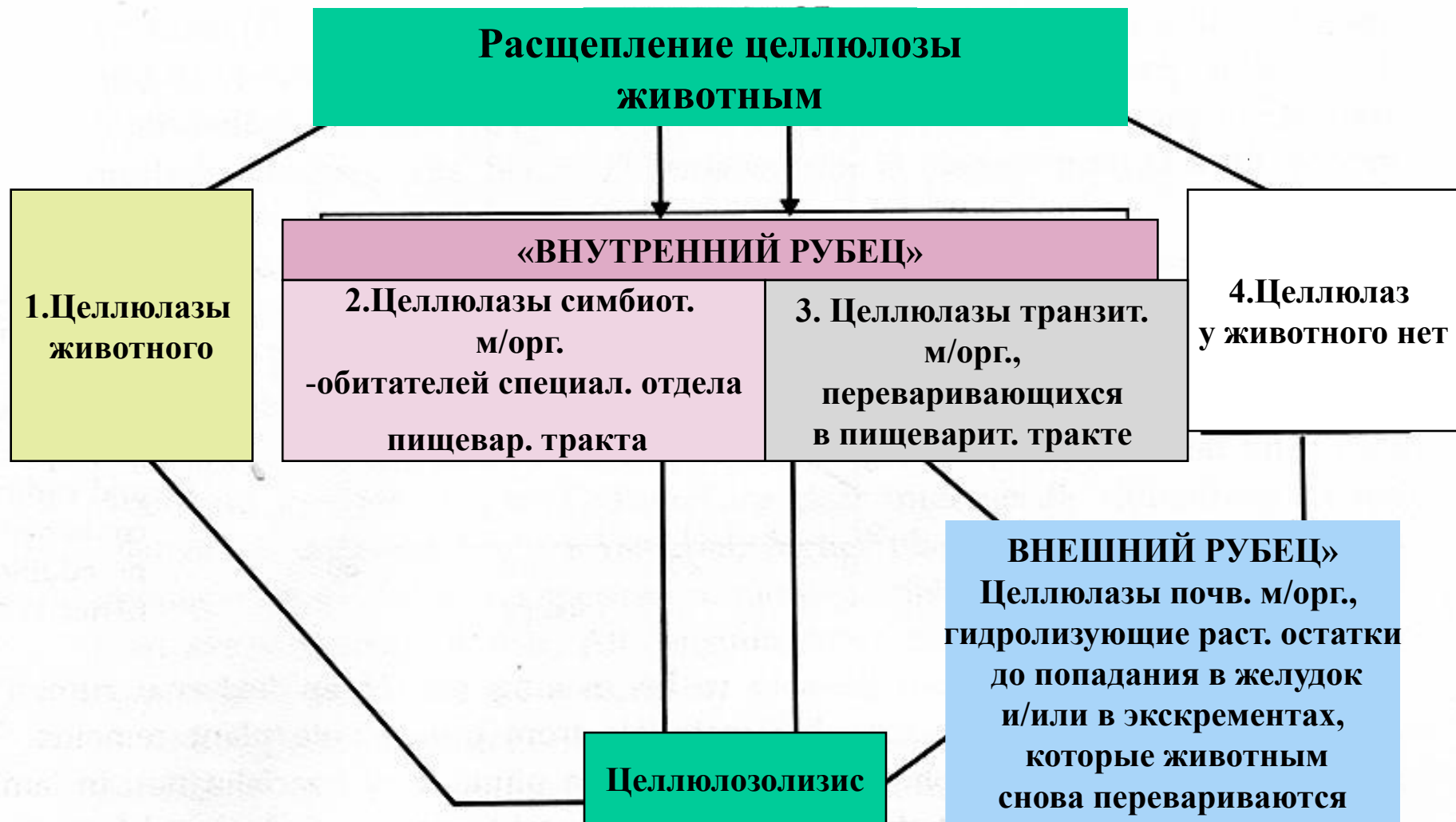
λ^* - вероятность размножения, tr^{**} - lag-период

Метаболическая активность (усвоение 23 соединений) микробными сообществами почвы, кишечника и копролитов *A. caliginosa*



Трофическое воздействие

- Грибы – пищевой источник для дождевых червей
- N, P, аминокислоты
- Пищеварительные ферменты
- Разложение целлюлозы



Спектр механизмов, используемых детритоядными животными для расщепления целлюлозы

**Механизмы модификации состава,
биомассы и активности грибов при
прохождении почвы через
пищеварительный тракт дождевых червей**

```
graph TD; A[Механизмы модификации состава, биомассы и активности грибов при прохождении почвы через пищеварительный тракт дождевых червей] --> B[Действие кишечной жидкости на мицелий и споры]; A --> C[Абразивный эффект минеральных частиц, повышающий уровень прорастания спор]; A --> D[Протекторное свойство минеральных частиц]
```

**Действие кишечной
жидкости на мицелий
и споры**

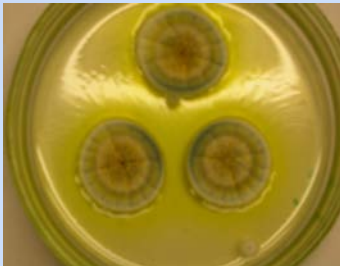
**Абразивный эффект
минеральных частиц,
повышающий уровень
прорастания спор**

**Протекторное
свойство
минеральных частиц**

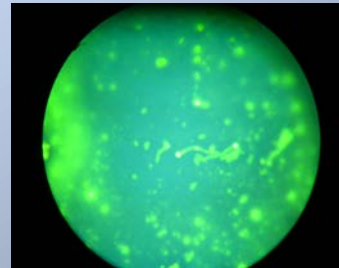
Методы изучения действия пищеварительной жидкости *Aporrectodea caliginosa* на грибы

Выдерживание мицелия и спор грибов в пищеварительной жидкости

Определение жизнеспособности фрагментов мицелия по росту **на средах**



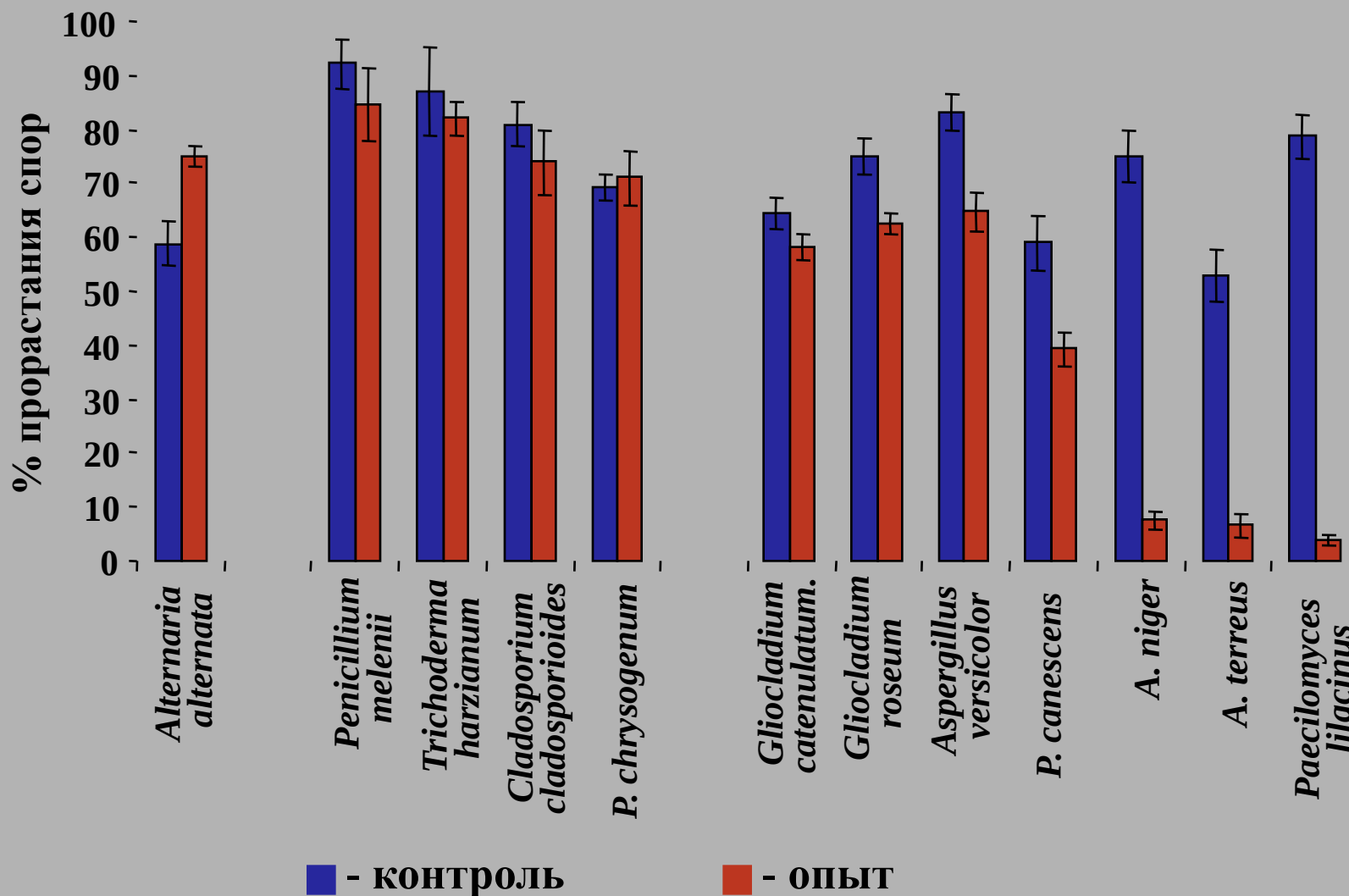
Определение жизнеспособности по прорастанию спор на агаризованных стеклах
(**Люминесцентная и световая микроскопия**)



Радиальная скорость роста грибов после инкубации их мицелия в пищеварительной жидкости *A. caliginosa*

Виды	Радиальная скорость роста, мм/час			
	Контроль	Время инкубации мицелия в пищеварительной жидкости		
		1-2 мин	2 часа	24 часа
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.17 ± 0.02	0 (нет роста)	0	0
<i>Penicillium decumbens</i>	0.13 ± 0.00	0	0	0
<i>P. chrysogenum</i>	0.09 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01
<i>Bjerkandera adusta</i>	0.20 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.00
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.10 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.01
<i>P. aurantiogriseum</i>	0.12 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01
<i>Gliocladium catenulatum</i>	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.05
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.00

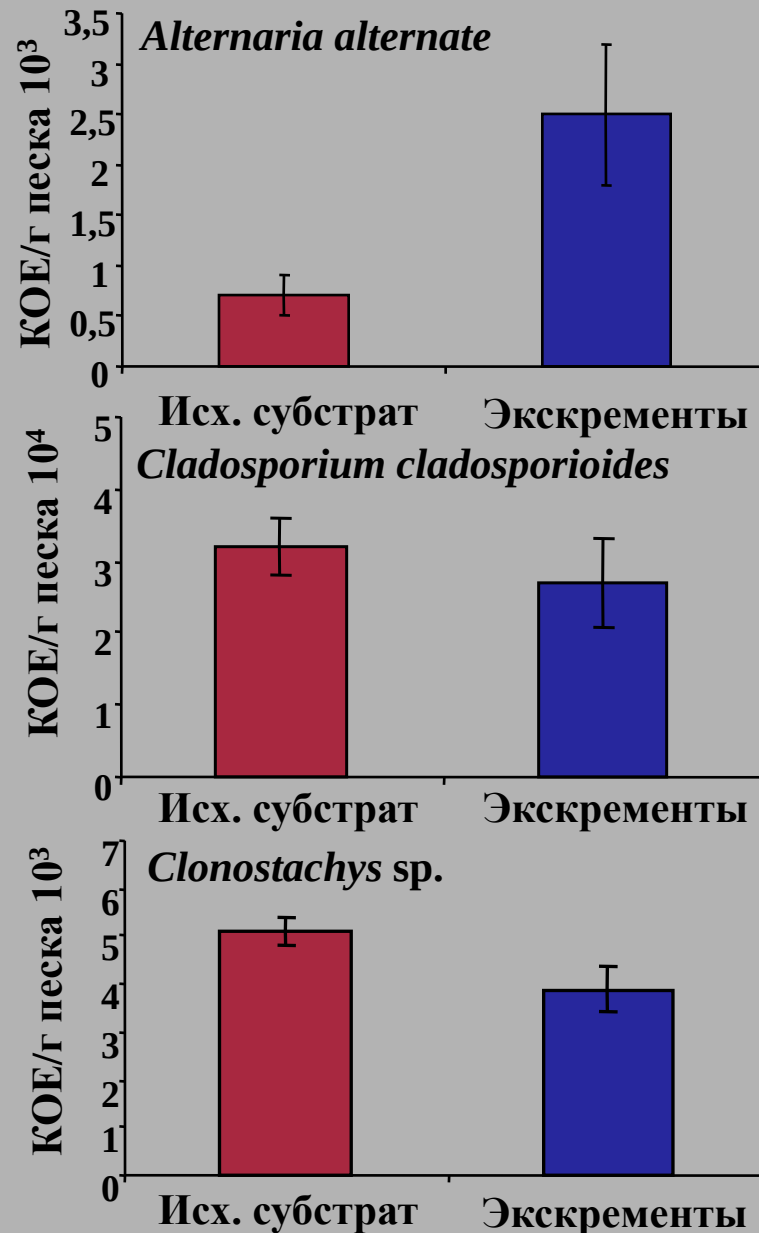
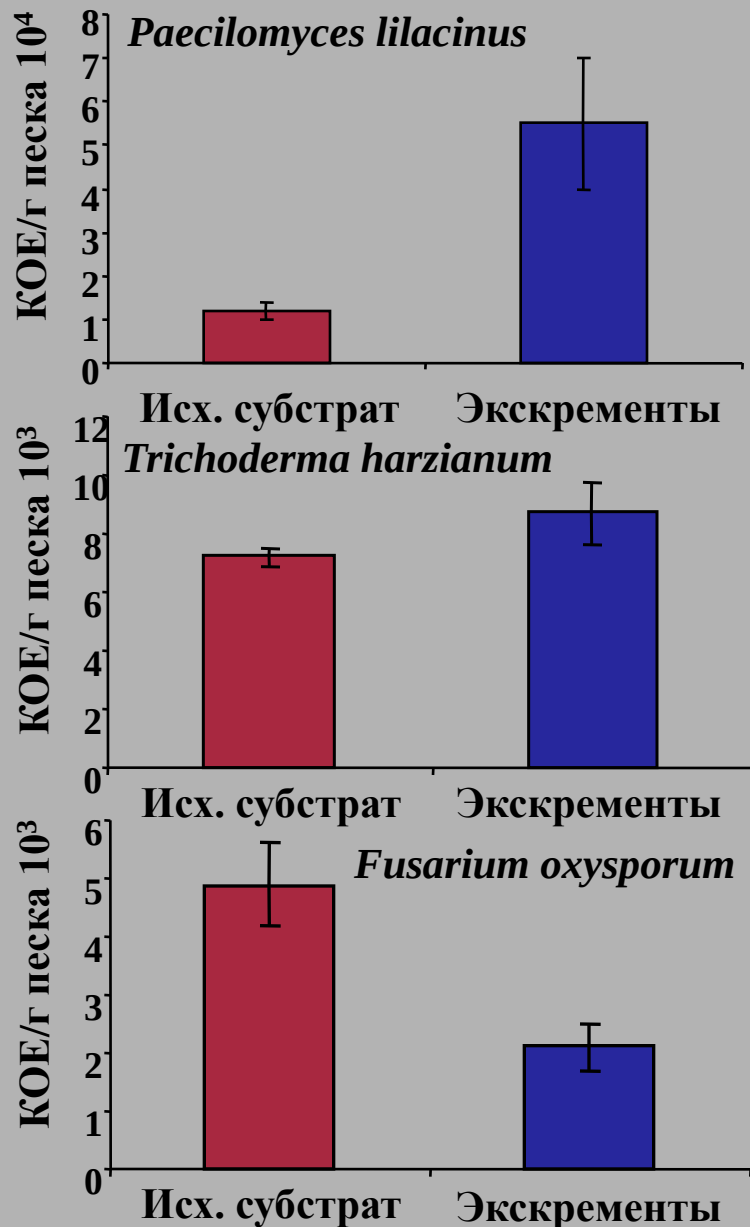
Прорастание спор грибов после кратковременного (2 мин.) воздействия на них пищеварительной жидкости *A. caliginosa*



Способ оценки жизнеспособности грибных спор после их прохождения с песчаными частицами через пищеварительный тракт *A. caliginosa*



Жизнеспособность спор после их пассажа через пищеварительный тракт *A. caliginosa*



Избирательность потребления и распространение грибов дождевыми червями в почвах

Существует точка зрения, что черви являются слишком крупными животными для того, чтобы иметь возможность эффективно выбирать из почвы грибной мицелий, и тем более мицелий определенных видов грибов.

Однако, дождевые черви существенно различаются по размерам, трофике и локализации в почве, что отражается на их возможности к избирательному питанию грибами.

Самыми предпочитаемыми видами для червей разных эколого-трофических групп были *Fusarium nivale* и *Cladosporium cladosporioides*, затем следовали быстрорастущие грибы, такие как *Rhizoctonia solani*, *Mucor sp.*, а виды базидиомицетов черви, обычно, отвергали.

Избирательность потребления и распространение грибов дождевыми червями в почвах

Эндогейные черви (*A. caliginosa*) предпочитали довольно многие виды грибов, эпигейные (*L. terrestris*) проявляли выраженное предпочтение небольшому числу конкретных видов.

Предпочтение ранних сукцессионных видов грибов червями, возможно, отражает механизм обнаружения ими свежих разлагающихся органических субстратов имеющих большую пищевую ценность.

На более поздних стадиях разложения растительных субстратов среди грибов (активных гидролитиков) больше видов, образующих вторичные метаболиты, включая и токсичные для животных.

Распространение дождевыми червями возможно грибов разных эколого-трофических групп (многие не гибнут при пассаже через их пищеварительный тракт).

В частности, в копролитах некоторых червей на порядок выше пропагул арбускулярно-микоризных грибов.

Влияние целомической жидкости дождевых червей на грибы

Добавление в разбавленное жидкое сусло целомической жидкости *E. fetida* (в соотношение 1:8 до 1:2) сдерживало рост дрожжей *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*, *Galactomyces geotrichum* и *Hyphopichia burtonii*. Эффект возрастал с повышением концентрации жидкости, но полностью рост дрожжей не прекращался (Бызов, 2005).

Бактерии и грибы, ассоциированные с пищеварительным трактом дождевых червей



- Мутуалистическое микробное сообщество пищеварительного тракта дождевых червей рассматриваются с точки зрения поставки отсутствующих у них или образуемых в недостаточных количествах ферментов для переваривания пищи, источников витаминов или иных физиологически важных соединений.
- Симбиотические бактерии рода *Acidovorax* обнаружены в нефридиях дождевых червей (Schramm et al., 2003).
- Они передаются от взрослых особей в капсулы коконов при спаривании, а не попадают из окружающей среды. При созревании нефридиевых каналов выделяются аттрактанты, индуцирующие селективную миграцию в них *Acidovorax*-подобных бактерий (Davidson, Stahl, 2008).
- Близкий к роду *Acidovorax* новый род и вид бактерий был идентифицирован - *Verminephrobacter* и *Verminephrobacter eiseniae* (Pinel et al., 2008).
- Наличие симбиотических бактерий рода *Verminephrobacter* показано в нефридиях 19 из 23 обследованных дождевых червей (Lund et al., 2010).
- Обнаружено, что нефридии *E. fetida* имеют три бактериальных симбионта (*V. eiseniae*, и представителя *Microbacteriaceae* и *Flexibacteriaceae*), передающиеся через капсулы кокона следующему поколению (Davidson et al., 2010).
- Роль этих бактерий точно не определена.
- Полагают это устранение токсичных соединений, протеолитическая деятельность, что может способствовать улучшению сорбции пептидов и аминокислот червями.

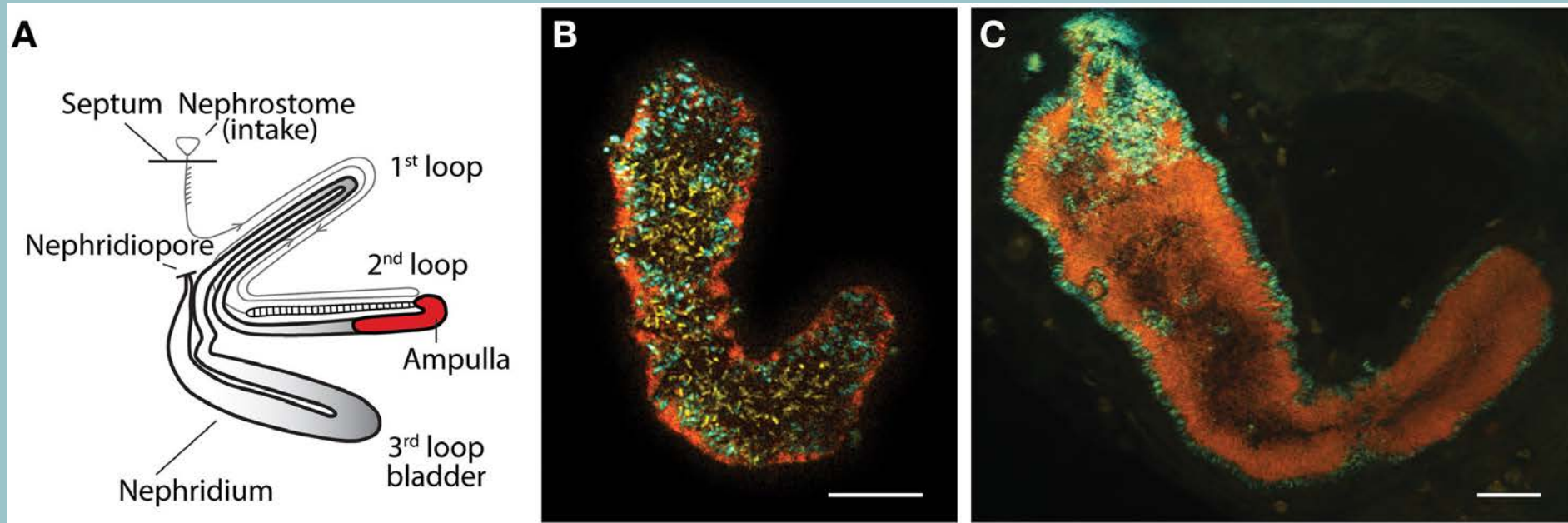


FIGURE 1|(A) Schematic outline of the structure of a single nephridium showing the three major loops and the ampulla (red) where the symbionts reside (modified from Schramm et al., 2003). **(B,C)** FISH images of ampullas from two earthworm species after triple hybridization with the general bacterial probe EUB338,-II,-III (yellow), a *Verminephrobacter*-specific probe LSB145 (cyan/green), and a probe specific for *Flexibacter*-like symbionts FLX-226 (red/orange). **(B)** *Al. chlorotica* showing the *Flexibacter*-like symbionts in close proximity to the ampulla epithelium and *Verminephrobacter* in the lumen. Notice the large amount of unidentified bacteria in the lumen. **(C)** *E. andrei* with *Verminephrobacter* lining the epithelium and the *Flexibacter*-like symbionts in the lumen. Scale bar is 20 μ m. (Davidson et al., 2012)

Численность КОЕ грибов в разных отделах пищеварительного тракта дождевых червей

Вид дождевого червя	КОЕ/(отдел кишечника) x 10 ³			
	Желудок	Передний отдел кишечника	Средний отдел кишечника	Задний отдел кишечника
<i>A. caliginosa</i>	0.7 ± 0.6	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.6	2.4 ± 0.8
<i>L. terrestris</i>	1.8 ± 1.4	1.8 ± 0.3	0.7 ± 0.5	3.3 ± 0.5
<i>E. fetida</i>	2.2 ± 1.0	3.2 ± 1.3	2.6 ± 1.6	2.4 ± 1.3

**Выявление видов грибов,
устойчивых к условиям
пищеварительного тракта дождевых
червей**

```
graph TD; A[Выявление видов грибов, устойчивых к условиям пищеварительного тракта дождевых червей] --> B[Выдерживание червей без пищи в чашках Петри, в стерильном песке]; A --> C[Выдерживание червей в стерильной почве с ее периодической сменой]; B --> D[Посев из кишечника]; B --> E[Микроскопия кишечника]; C --> F[Посев из кишечника];
```

**Выдерживание червей
без пищи в чашках
Петри, в стерильном
песке**

**Посев из
кишечника**

**Микроскопия
кишечника**

**Выдерживание червей в
стерильной почве с ее
периодической сменой**

**Посев из
кишечника**

Численность КОЕ микромицетов и длина мицелия в пищеварительном тракте *A. caliginosa*, не получавших пищи

Период инкубации дождевых червей на песке, сут			
5	20	30	40
КОЕ/г кишечника			
12000 ± 4000	13000 ± 3000	3000 ± 1000	2000± 1000
Длина жизнеспособного мицелия (ФДА), м/г			
63±17	-	-	35±15

Состав и обилие видов микромицетов в кишечнике

A. caliginosa, не получавших пищи

Червей выдерживали на стерильном песке

5 суток

20 суток

Geotrichum candidum,
и виды с стерильным
мицелием

Mucor hiemalis

P. chrysogenum,
P. canescens и др.

Rhizomucor
racemosus

Gliocladium
pennicilloides

Acremonium murorum

Trichoderma viride

Paecilomyces varioti

Fusarium oxysporum

Alternaria sp.

Cladosporium
sphaerospermum

Aspergillus versicolor

Candida vartiovaare,

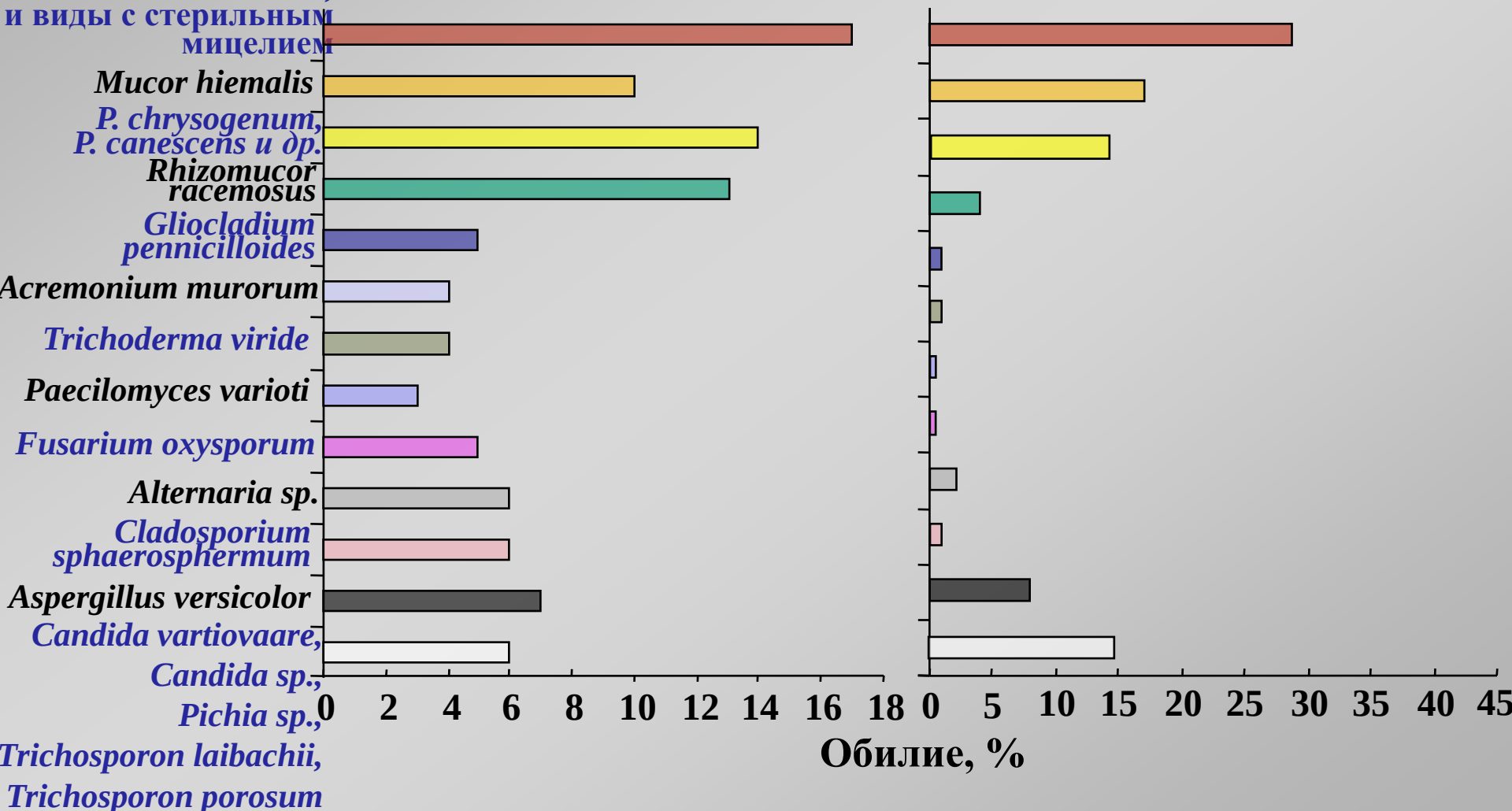
Candida sp.,

Pichia sp.,

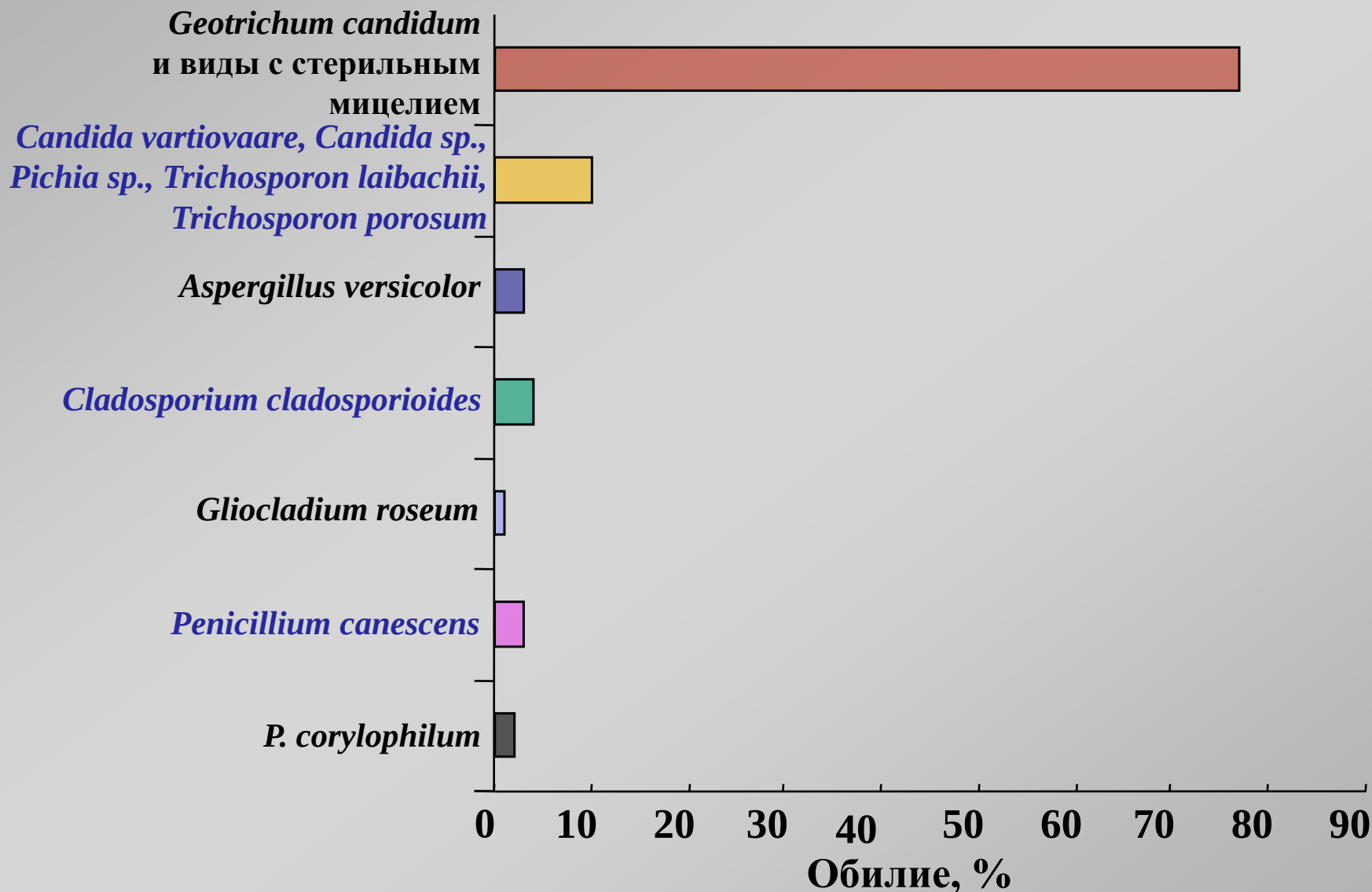
Trichosporon laibachii,

Trichosporon porosum

Обилие, %



Состав и обилие видов микромицетов в кишечнике *A. caliginosa*, живших в течение 25 суток в стерильной почве



Влияние грибов на дождевые черви

1. Существуют виды, потребление которых ведет отсутствию копролитов у червей в течение длительного периода и к гибели, считается из-за наличия микотоксинов
2. Есть виды, на которых черви могут длительно существовать и прибавлять в весе.

- 3. *Candida famata* и *Geotrichum candidum* эффективно влияют на рост и репродуктивный потенциал *E. fetida* (Бызов, 2005). Дрожжи, полагается, служили источником физиологически активных веществ, в частности витаминов группы В, аминокислот.

4. *T. asperellum* МГ/6 (обладает антагонистическими свойствами к грибным фитопатогенам, продуцирует фитогормон – индолиуксусную кислоту, целлюлолитик) повышал накопление биомассы и скорость формирования половозрелых особей *E. fetida*, число отложенных коконов, ускорял минерализацию органических соединений (Садыкова, Кураков, 2012).

- 5. Аттракция грибами дождевых червей.

Показано, что фильтраты из культуральной жидкости *G. candidum* привлекают *E. fetida*. Способностью аттракции *E. fetida* обладают из обнаруженных летучих веществ - этилпентаноат и этилгексаноат (Zirbes et al., 2010).

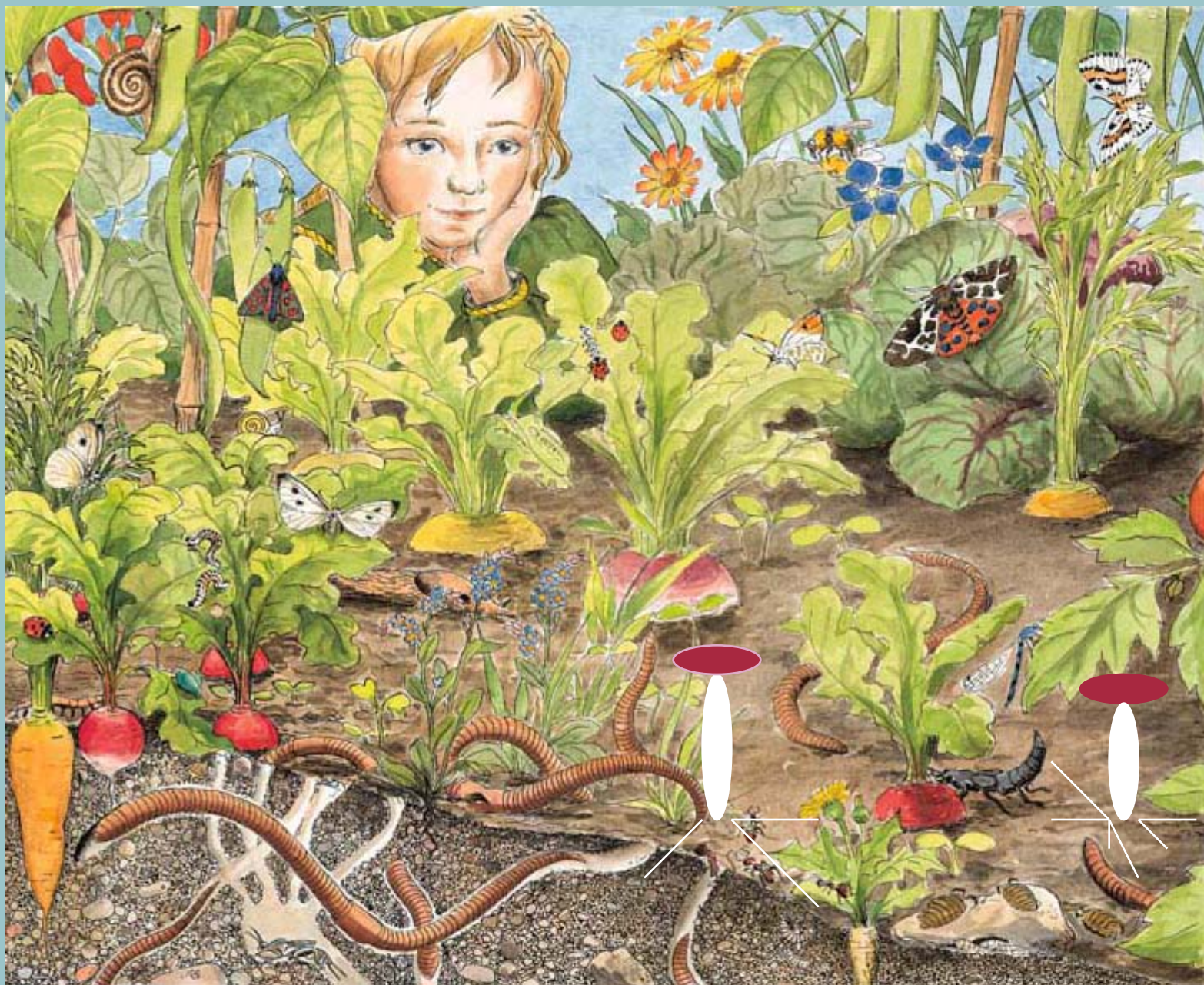
Функциональное значение взаимодействий дождевых червей и грибов

Взаимодействия между дождевыми червями и микроорганизмами, и грибами, как главными редуцентами растительных остатков, имеет важнейшее значение

в деградации органических веществ и поступлении минеральных элементов в почву (Lee, 1985).

В присутствии червей разложение органического вещества возрастает на 17-20%, что определяется как прямым воздействием, так и стимуляцией активности микроорганизмов (Satchell, 1983).

- **Повышении (в большинстве сообщений) микоризации АМ грибами растений**
- **Снижении заболеваемости растений грибными корневыми инфекциями**
- **Ускорении детоксикация почв, разложение микотоксинов**
- **Гумификации органических веществ в почвах.**
- **Расселении и колонизации грибами новых местообитаний, нарушенных и пионерных экосистем**
- **Активизация роста мицелия в свежих копролитах, обуславливает на 20-25% их повышенную водопрочность в сравнении с почвенными агрегатами (Кураков, Харин, 2012; Bear et al., 1996),**
- **Иммобилизация грибами минеральных форм азота в экскретах ведет к снижению (на 20%) эмиссии газообразных азотных соединений (Харин, Кураков, 2008).**



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ !