

Московский Государственный Университет
им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

Контаминанты и паразитические грибы грибоводческих хозяйств. Структура рода *Trichoderma* на разных этапах производственного процесса

Выполнила А.А. Сенькова
Руководители: д.б.н., вед.н.с. А.В. Александрова
ведущий инженер М.Ю. Дьяков

Введение

На промышленных комплексах по культивированию шампиньона соблюдаются строгие санитарные предписания. Однако, присутствие микромицетов неизбежно. Они составляют контаминантную и паразитическую микобиоту хозяйства.

Присутствие микроскопических грибов в сырье для культивирования часто приводит к потерям урожая, а заражение некоторыми видами очень существенно снижают объемы выпускаемой продукции. Одним из агрессивных контаминантов является *Trichoderma aggressivum*, с которым связаны масштабные поражения культуры шампиньона на производствах Северной Америки и Европы.

Для успешного ведения хозяйства необходимы регулярные лабораторные исследования сырья на присутствие опасных контаминантов и паразитов и оценка чистоты помещений.



Цель

Изучить видовой состав микромицетов контаминантов и паразитов на грибном комплексе "Подмосковье".

Задачи

1. выявить видовой состав микромицетов-контаминантов на производстве;
2. описать видовой состав микромицетов на разных технологических стадиях производства;
3. изучить выявленные изоляты рода *Trichoderma* и уточнить их видовую принадлежность с помощью молекулярных методов.

Грибной комплекс «Подмосковье»

- Грибной комплекс «Подмосковье» (ООО «Агротехмаркет») - один из трех крупных шампиньонных производств на



территории Московской области. Располагается в деревне Долгое Лёдово Щёлковского района. Это перспективное предприятие, и с 2014 г. оно находится на стадии активного развития и расширения. Планируется увеличить объем выпускаемой продукции до 3,2 тыс. тонн грибов в год. Это больше, чем производят все хозяйства Подмосковья на данный момент.



- На ферме установлено новое современное оборудование голландской фирмы «Dalsem», известной в мире как одна из передовых компаний в области технического обеспечения грибоводства.
- Компост для культивирования шампиньона предприятие закупает за границей (Польша), покровную смесь в России, однако, запланировано строительство собственного компостного завода.

Грибной комплекс «Подмосковье»



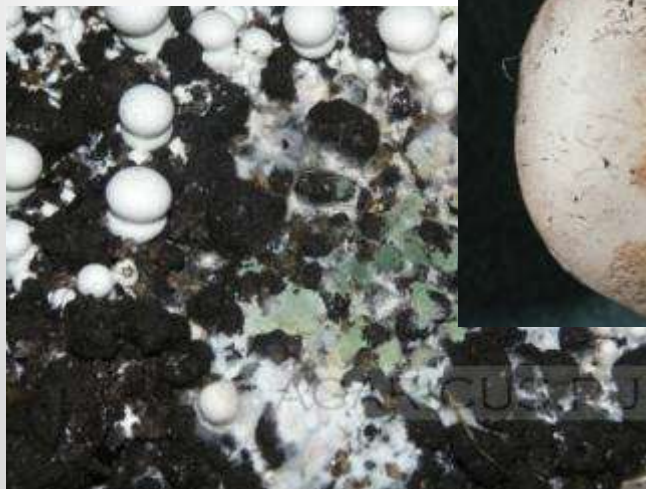
Территория, занятая производственными помещениями.

Сбор материала

Сбор материала проводился дважды: **03 июля** и **17 июля 2015 г.**

Всего было взято 22 образца пяти типов:

- покровная смесь до выгонки плодовых тел и на стадии третьей волны плодоношения шампиньона – 2 образца;
- компост до выгонки плодовых тел и на стадии третьей волны плодоношения шампиньона – 2 образца;
- отпечатки с разных поверхностей внутри помещения камер – 8 образцов;
- плесневые поражения на покровной почве в камере на стадии третьей волны плодоношения шампиньона, а также пораженные плодовые тела – 5 образцов;
- пробы воздуха – 5 образцов.



Методы выделения культур

Выделение культур проводили на твердые питательные среды двух типов: сусло-агар и среда Чапека.

<u>Тип образца</u>	<u>Способ посева</u>
Компост и покровная смесь на разных стадиях производственного процесса	Почвенный посев из 3-х разведений (10^{-3} - 10^{-5}) на твердые среды (сусло-агар, среда Чапека)
Поверхность стен и стеллажей внутри культивационных камер	Отпечаток на среду
Проба воздуха	Седиментация на среду (сусло-агар)
Пораженные плодовые тела и заращение покровной смеси	Непосредственный перенос видимого мицелия

Формирование коллекции изолятов рода *Trichoderma*

С чашек первичных посевов были выделены штаммы видов рода *Trichoderma* – 32 изолята.

Количество изолятов рода <i>Trichoderma</i> из разных образцов			
Образец/Технологический этап	Перед началом культивации	1-ая волна плодоношения	3-я волна плодоношения
Покровная смесь	6		6
Компост			6
Отпечаток		2	4
Зарастание покровной смеси			4
Пораженное плодовое тело			2
Проба воздуха	1	1	

Определение изолятов проводилось в три этапа:

- по морфологическим признакам (культуральные и микроскопические)
- молекулярный анализ и идентификация
- сопоставление полученных данных и окончательное отнесение к виду

Морфологическое определение изолятов *Trichoderma*

Для первичного определения штаммы культивировали 7 суток на двух средах – сусло-агар и SNA.

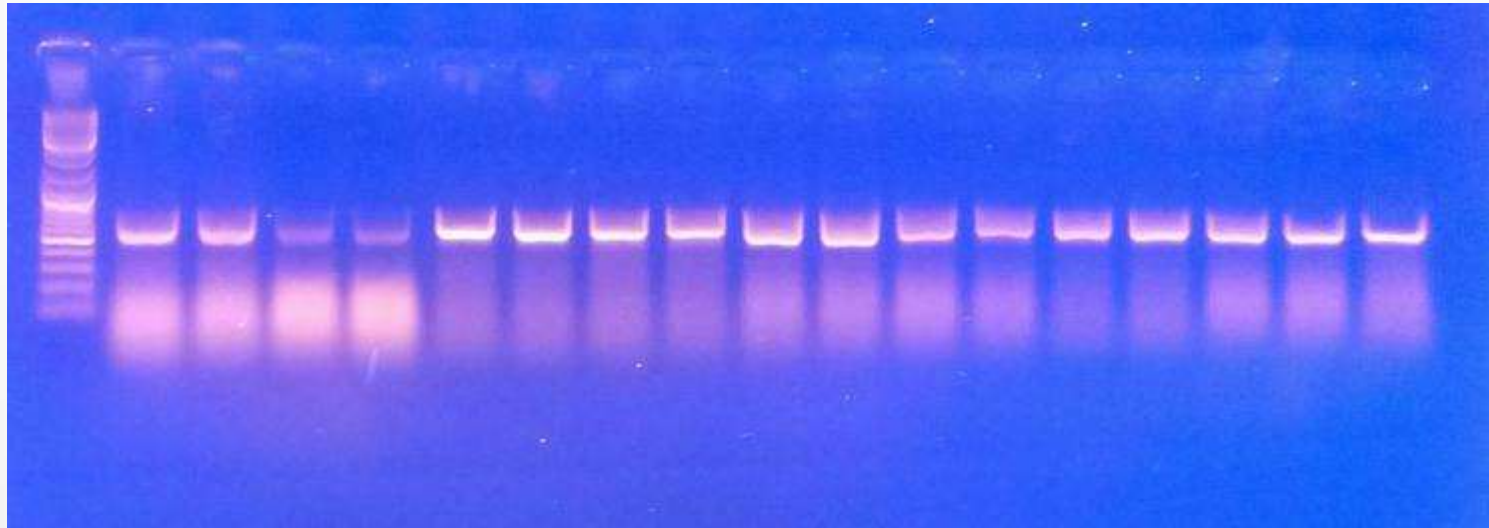
Идентификация велась по культуральным и микроскопическим морфологическим признакам.

Для каждого изолята составлено подробное описание и сделаны фотографии.



Молекулярный анализ изолятов *Trichoderma*

1. Секвенирование ITS-последовательностей (компания «Евроген»)
2. Построение филогенетического дерева методом Maximum Likelihood (программа MEGA6)



Результаты

В результате проведенной работы на грибном комплексе «Подмосковье» выявлено 34 вида микроскопических грибов (а также 4 изолята с неясным положением), относящихся к 19-ти родам, 11 семействам, 10 порядкам, 6 классам, 3 отделам (30 видов аскомицетов, три вида зигомицетов и один вид базидиомицетов).

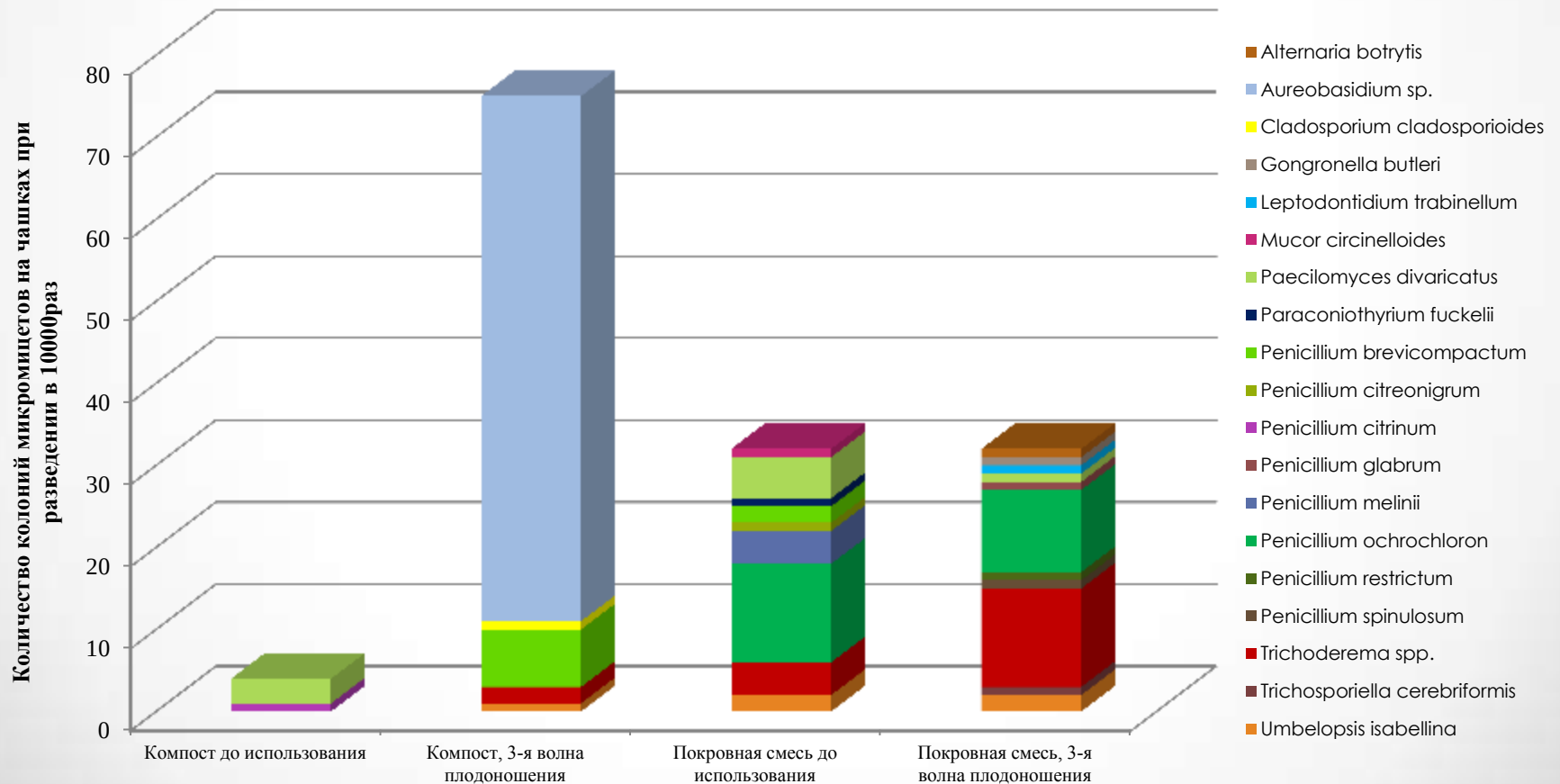
Наибольшее разнообразие отмечено для родов *Penicillium* (9 видов) и *Trichoderma* (8 видов). Для остальных родов выявлены единичные представители.

Результаты

1. Покровная смесь и компост

- В 4-х образцах выявлено присутствие 24-х видов микромицетов
- До использования в производстве в компосте присутствовали 2 вида, в покровной смеси – 13 видов. На третьей волне плодоношения в компосте обнаружены 6 видов, в покровной смеси – 14 видов.

Число колоний микромицетов в компосте и покровной смеси на разных технологических этапах



Результаты

2. Производственные поверхности, проба воздуха

- Образцы отпечатков с поверхностей производственных помещений на разных этапах производства показали присутствие двух видов рода *Trichoderma*: *T. atrobrunneum*, *T. simmonsii*. Они выявлены в культивационных камерах, где идет 1-ая и 3-я волна плодоношения.
- Проба воздуха. Воздушное пространство помещений производства содержит споры 15 видов микромицетов. Контаминация воздуха камер происходит после загрузки субстрата для культивирования.

Определено присутствие спор патогена *Cladobotryum mycophilum*.

Результаты

3. Заращение покровной смеси, поражение плодового тела. Паразиты шампиньона хозяйства «Подмосковье»

Из образцов заращения покровной смеси выделены 4 вида рода *Trichoderma* и патоген *Cladobotryum mycophilum*.

Из образцов пораженных плодовых тел был выделен патоген *Mycogone* sp.



Паутинистая
плесень

Белая
гниль

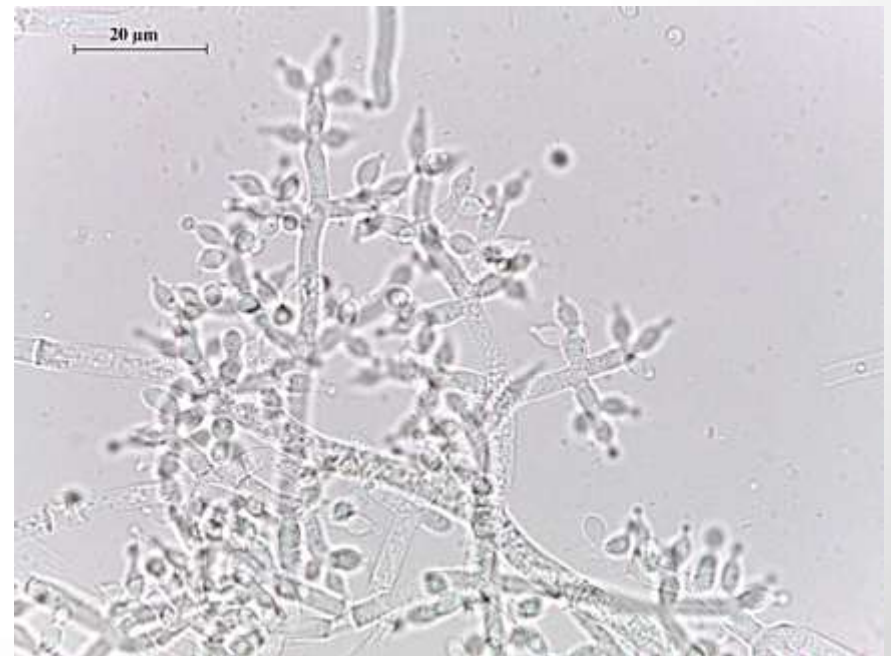
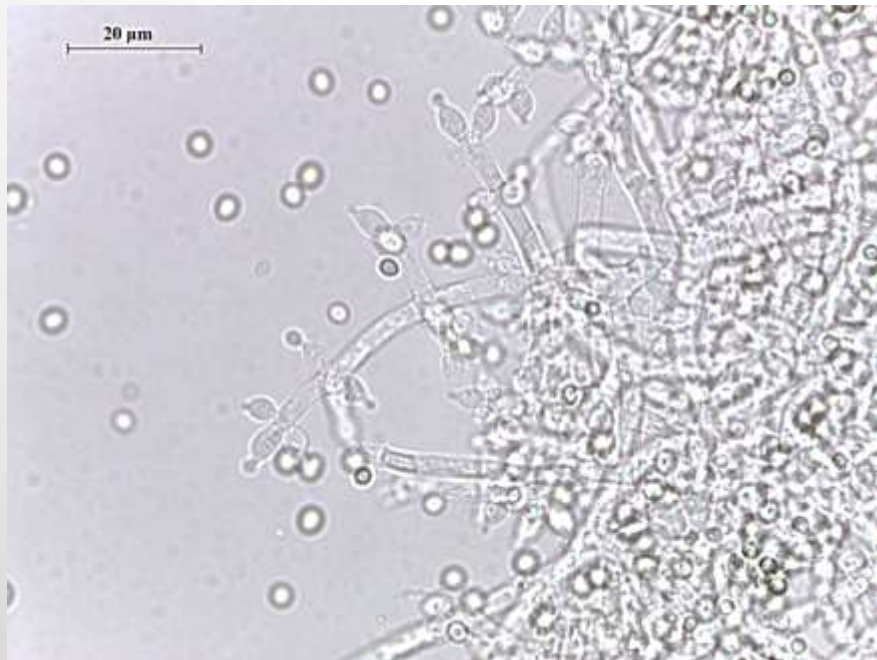


(Fletcher, Gaze, 2007)

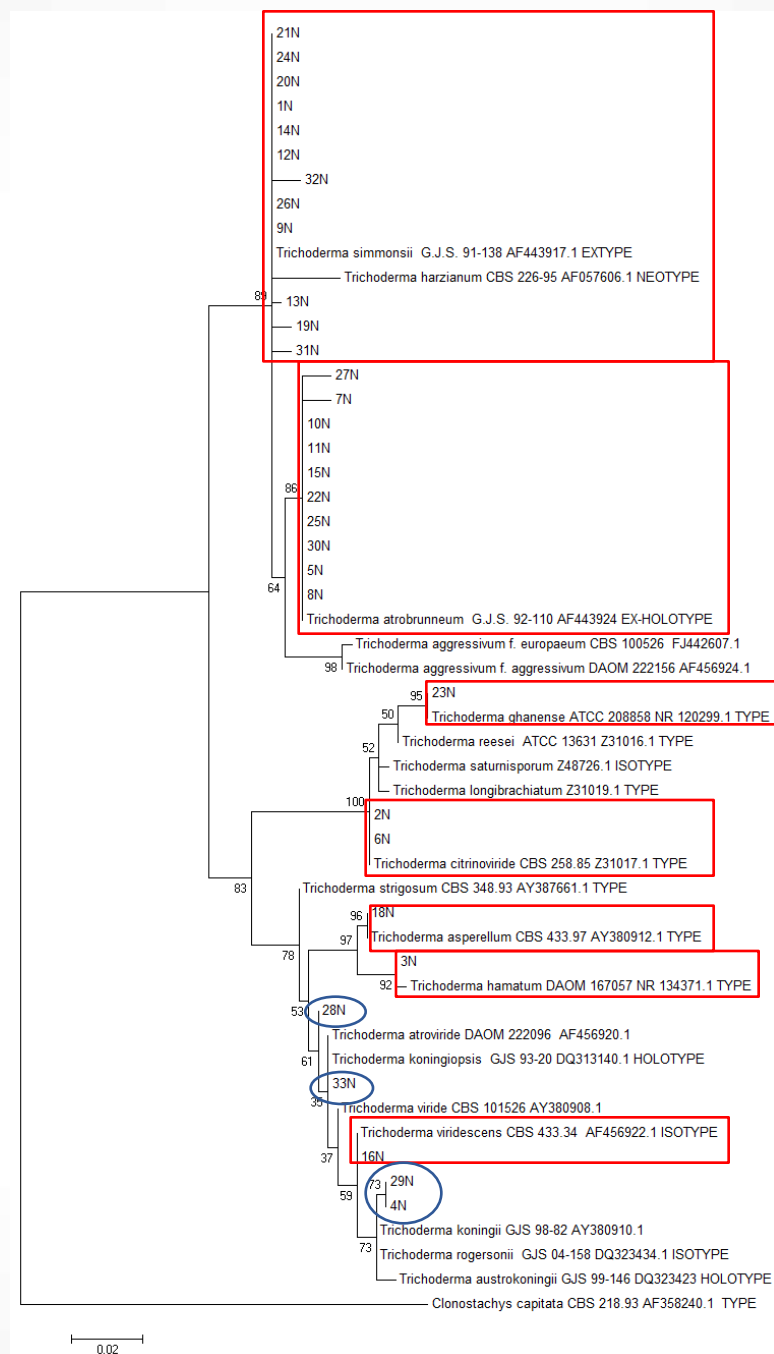
Результаты

4. Виды рода *Trichoderma* на производстве

- Отобранные 32 изолята относятся к 8-ти видам *Trichoderma*
- Чаще других выделяются виды *T. atrobrunneum*, *T. simmonsii*
- На разных этапах производственного процесса видовой состав изменяется



Образец	Вид по морфологии	Вид после применения молекулярных и филогенетических методов
Зона загрузки (до использования)/чистая камера (проба воздуха)		
Покровная смесь	<i>T. atroviride</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
	<i>T. citrinoviride</i>	<i>T. citrinoviride</i>
	<i>T. hamatum</i>	<i>T. hamatum</i>
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. atrobrunneum</i> , <i>T. simmonsii</i>
Проба воздуха	<i>T. harzianum</i>	<i>T. simmonsii</i>
Камера с 1-ой волной плодоношения		
Отпечатки с технологических поверхностей	<i>T. harzianum</i>	<i>T. atrobrunneum</i> , <i>T. simmonsii</i>
Проба воздуха	<i>T. harzianum</i>	<i>T. atrobrunneum</i>
Камера с 3-ей волной плодоношения		
Компост	<i>T. harzianum</i>	<i>T. atrobrunneum</i> , <i>T. simmonsii</i>
Покровная смесь	<i>T. atroviride</i>	<i>Trichoderma</i> sp. (sect. <i>Trichoderma</i>)
	<i>T. strigosum</i>	<i>T. viridescens</i>
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. atrobrunneum</i> , <i>T. simmonsii</i>
	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>
Зарастание покровной смеси	<i>T. harzianum</i>	<i>T. atrobrunneum</i> , <i>T. simmonsii</i>
	<i>T. longibrachiatum</i>	<i>T. ghanense</i>
	<i>T. atroviride</i>	<i>Trichoderma</i> sp. (sect. <i>Trichoderma</i>), <i>Trichoderma</i> sp.
Отпечатки с технологических поверхностей	<i>T. harzianum</i>	<i>T. atrobrunneum</i> , <i>T. simmonsii</i>



T. harzianum - комплекс

Заключение

В целом хозяйство успешно справляется с соблюдением санитарных норм. Тем не менее, в ходе этапов производства происходит контаминация помещений и субстрата.

В таких условиях активное плодоношение имеет не более 3 волн. Можно сказать, что основная часть микромицетов попадает с покровной смесью и с воздушными потоками.

На производстве выявлено присутствие опасных паразитов культуры *Cladobotryum mycophilum* и *Mycogone* sp. При этом наиболее агрессивный контаминант *Trichoderma aggressivum* не обнаружен.

Выводы

1. На грибном комплексе «Подмосковье» выявлено 34 вида микроскопических грибов из 19 родов (из них 88% – аскомицеты, 9% – зигомицеты, 3% – базидиомицеты). Наибольшее разнообразие отмечено для родов *Penicillium* (9 видов) и *Trichoderma* (8 видов).
2. Анализ сырьевой базы шампиньонного производства показал, что основным источником контаминации является покровная смесь (выявлено 13 видов). На второй волне плодоношения в пробах воздуха было выявлено 6 видов микромицетов, среди которых – патоген *Cladobotryum mycophilum*. К третьей волне в образцах компоста и покровной смеси выявлены 20 видов. Наиболее часто выделяются *Raecilomyces divaricatus*, *Trichoderma atrobrunneum*, *T. simmonsii*, *Umbelopsis isabellina*. Патогенная микобиота хозяйства представлена видами *Mycogone* sp. и *C. mycophilum*, результат их развития на культуре замечен уже на третьей волне плодоношения.
3. Микромицеты рода *Trichoderma* представлены на производстве 8 видами. Агрессивный к культуре шампиньона вид *T. aggressivum* не обнаружен.

Спасибо за внимание!

