



Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

Грибы, ассоциированные с наземными беспозвоночными, и их антибиотическая активность

Выполнила студентка IV курса
Бутаева Г. Б.
Научный руководитель
д. б. н. Кураков А.В.

Москва 2017

Антибиотики – наиболее изученная группа вторичных метаболитов грибов

- Известно более 8600 биологически активных вторичных метаболитов грибов
- Из них около 5000 – антибиотические вещества
- Но только несколько десятков применяются в медицине (гризеофульвин, пенициллины, цефалоспорины и т. д.)

Цель

Провести выделение и отбор микроскопических грибов, ассоциированных с наземными беспозвоночными животными – жуками-короедами *Polygraphus proximus* Blandford 1894, *Ips sexdentatus* Börner 1766 и *Ips typographus* L. 1758 – и их местообитаниями и определить их антибиотическую активность.

Задачи

1. Выделить штаммы грибов с хитинового покрова, из пищеварительного тракта и буровой муки жуков-короедов.
2. Отобрать коллекционные штаммы грибов, изолированные из местообитаний, связанных с дождевыми червями *Eisenia foetida* Savigny 1826 и *Lumbricus rubellus* Hoffmeister 1843 и муравьями *Lasius niger* L. 1758.
3. Дать описание таксономического состава грибов, часто выделяемых с поверхности, из пищеварительного этих беспозвоночных и их мест обитания.
4. Провести тестирование штаммов на антибактериальную и антимикотическую активность и отобрать наиболее активные штаммы.

Объекты



Polygraphus proximus
Blandford



Ips sexdentatus Borner



Ips typographus L.

(Фотографии взяты с сайта coleoptera.ksib.pl)

Методы

Посев на твердые питательные среды (агаризованное сусло и среда Чапека) с добавлением ампициллина и оксациллина для подавления роста бактерий

Идентификация по культурально-морфологическим признакам



Aspergillus ochraceus G. Wilh.



Trichoderma harzianum Rifai



Purpureocillium lilacinum (Thom)
Luangsa-ard, Houbraken,
Hywel-Jones & Samson



Gibberella pulicaris (Kunze) Sacc.

Методы

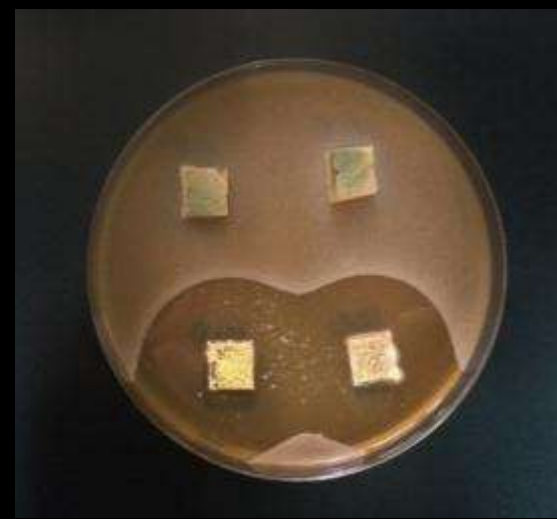
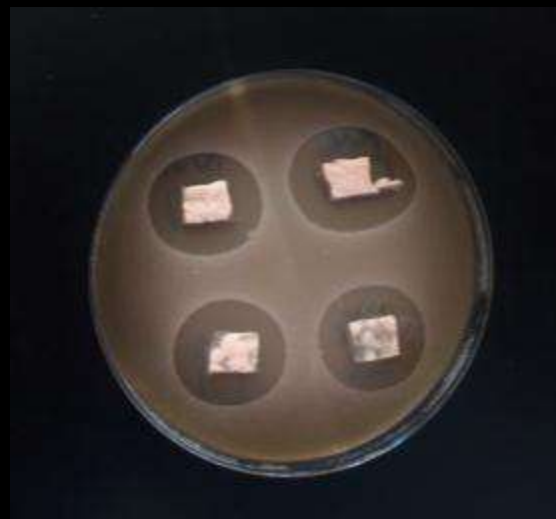
Тестирование на антибиотическую активность проводилось методом диффузии в агар с помощью агаровых блоков (Гаузе, 1958)

Неактивные – 0 мм

Слабоактивные – до 15 мм

Умеренно активные – 15-25 мм

Высокоактивные – >25 мм



Пример тестов в отношении *Aspergillus niger* INA 00760

Пример тестов в отношении *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Методы

Наиболее активные штаммы были выращены на жидких средах (Сабуро и Чапека), их активность была проверена методом «лунок» (Билай, 1973)



Пример теста в отношении
Aspergillus niger INA 00760



Пример теста в отношении
Candida albicans ATCC 2091



Пример теста в отношении
Bacillus subtilis ATCC 6633

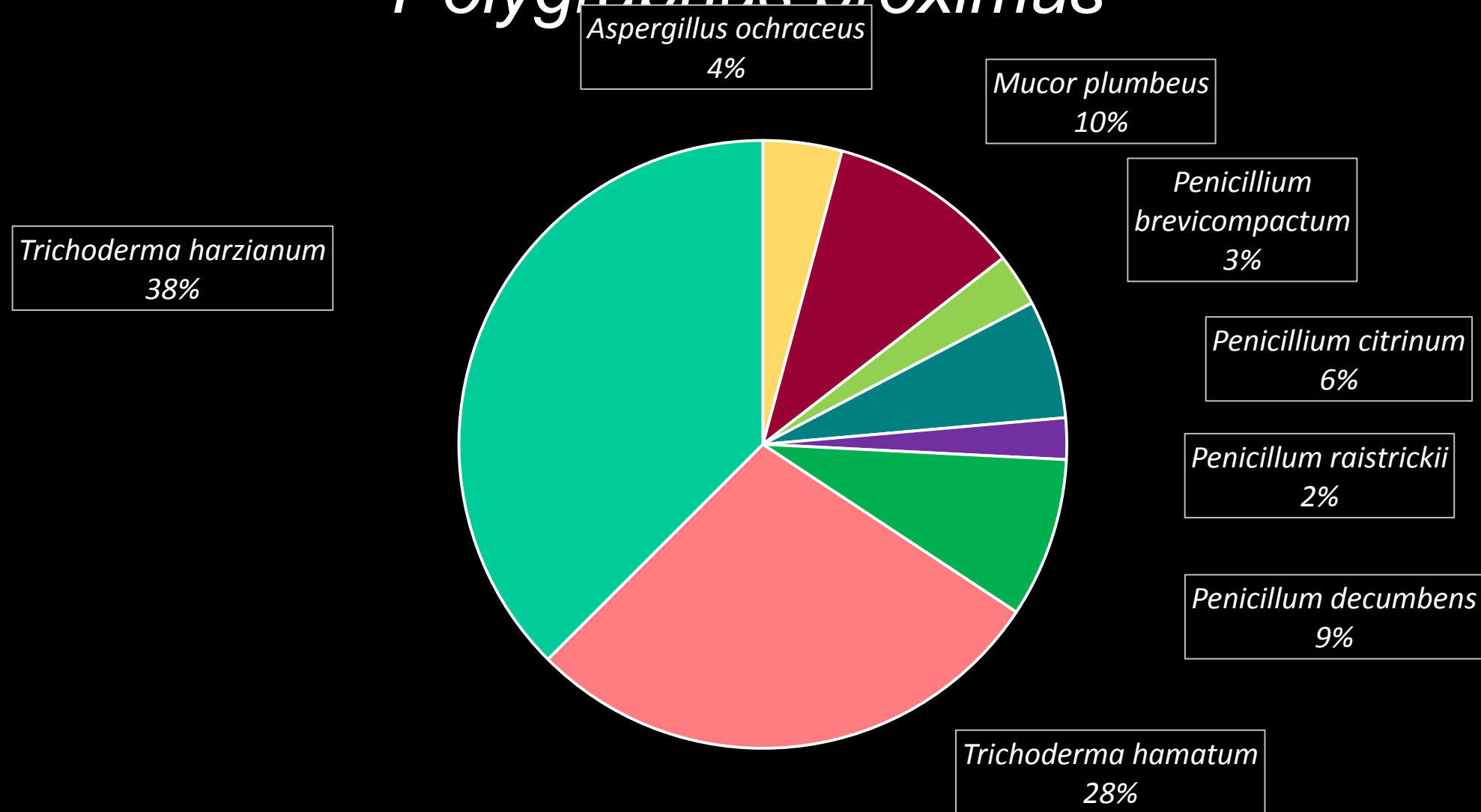
Результаты

Было получено 27 видов и 54 чистые культуры, выделенные с поверхности хитинового покрова и пищеварительного тракта жуков-короедов и их местообитаний.

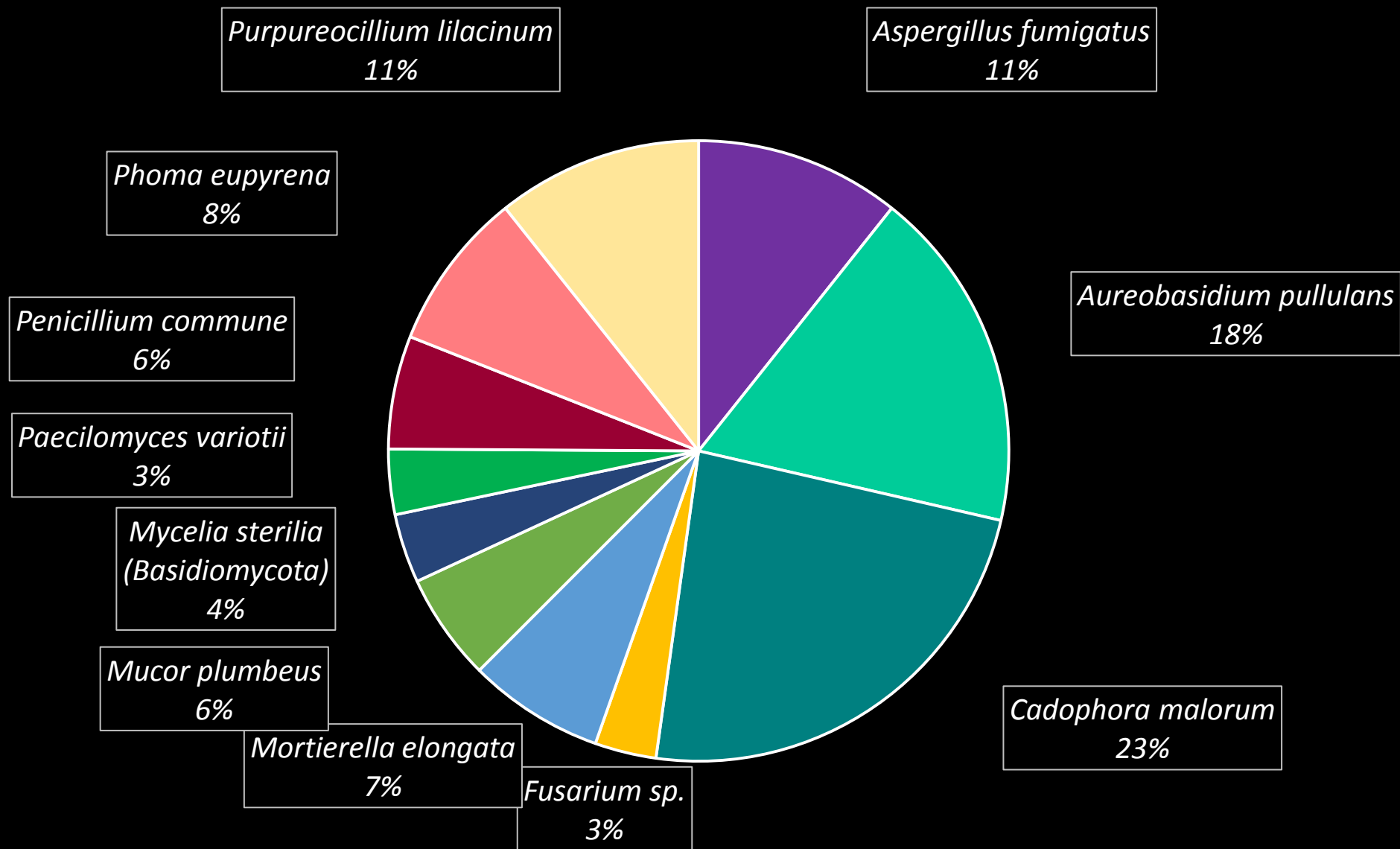
- 4 штамма (3 вида) относятся к отделу Zygomycota
- 49 штаммов (23 вида) относятся к отделу Ascomycota
- 1 штамм (1 вид) относится к отделу Basidiomycota

Относительное обилие видов грибов на ХИТИНОВОМ покрове

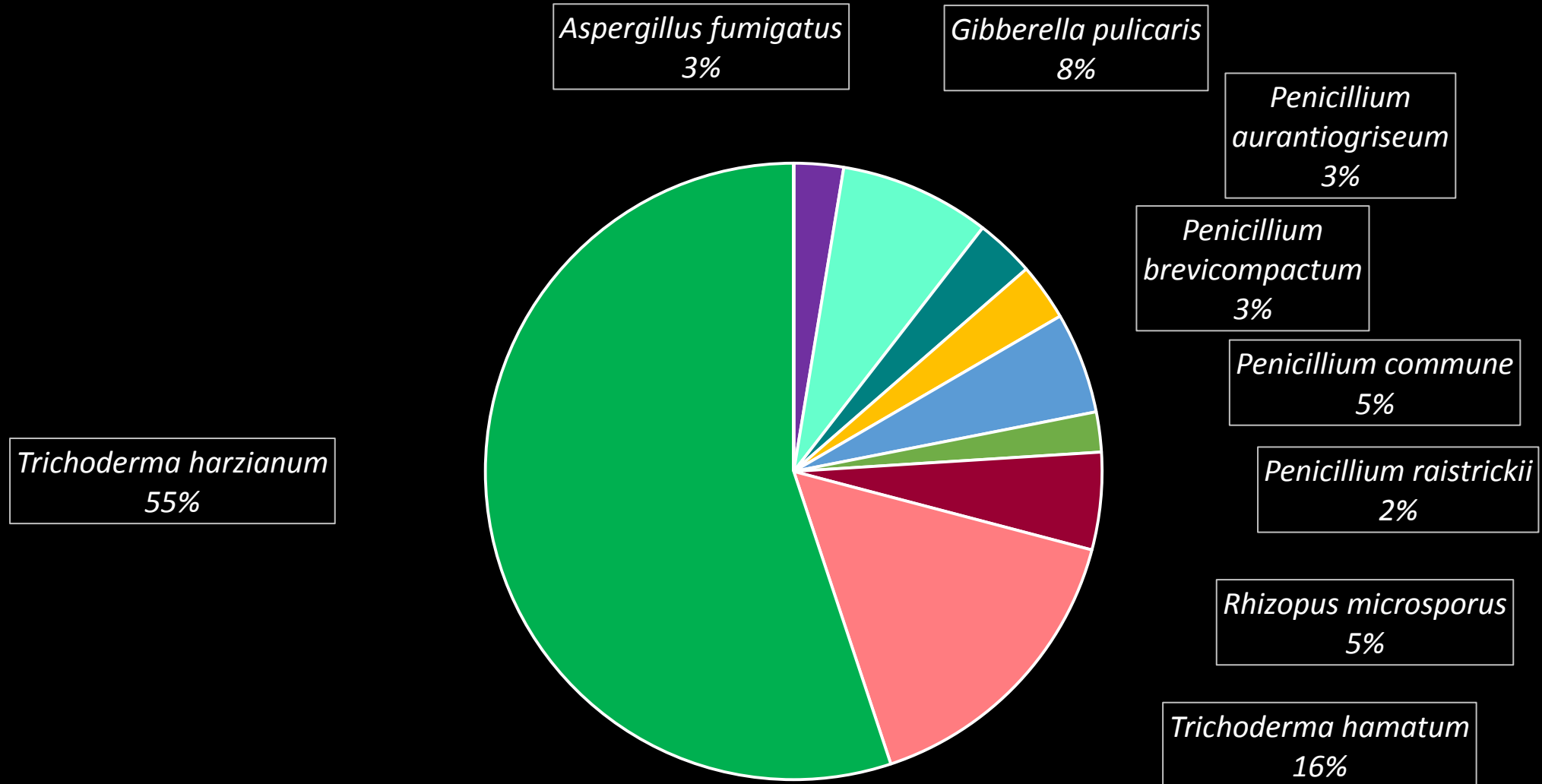
Polygraphus proximus



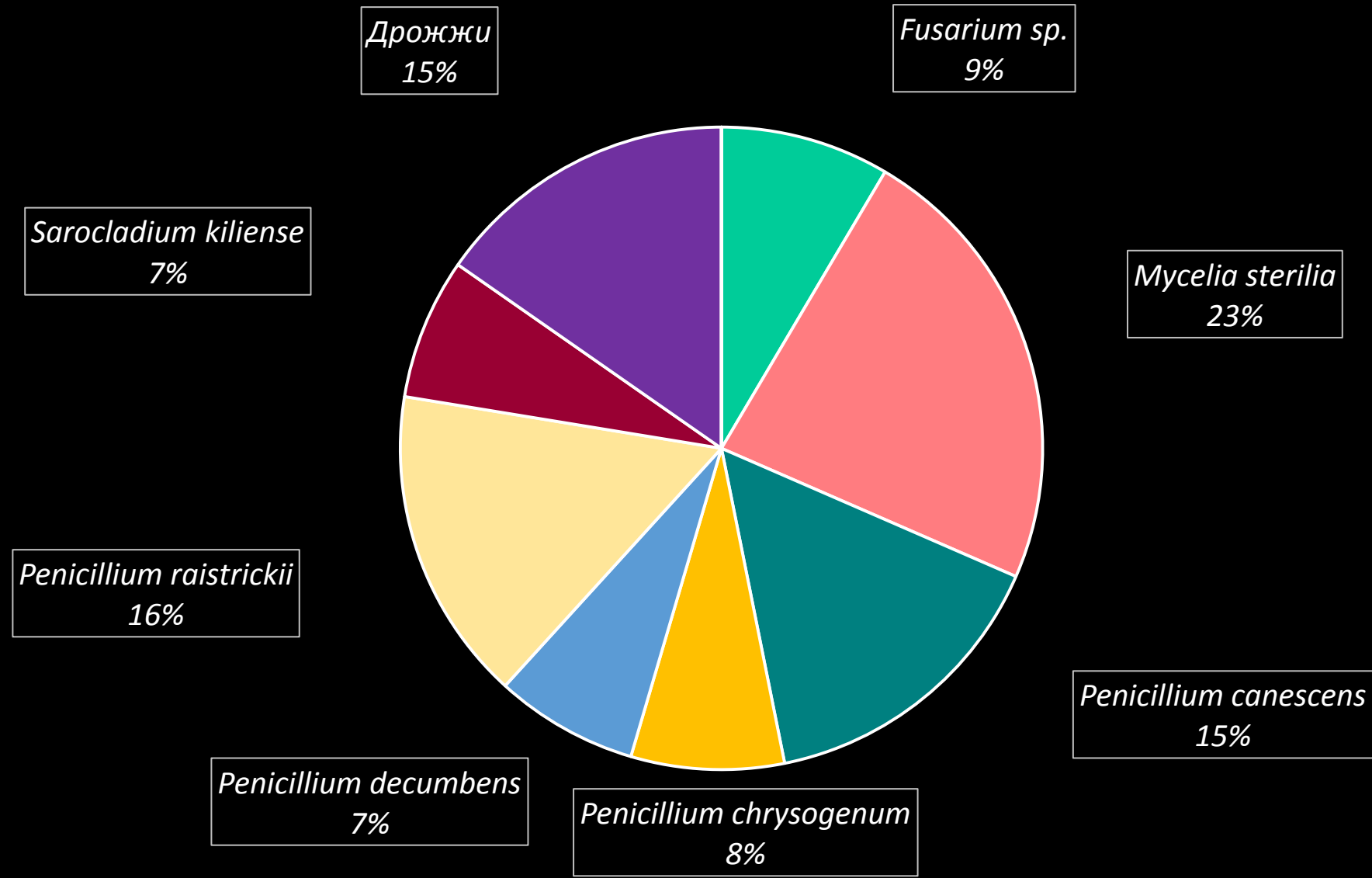
Относительное обилие видов грибов в пищеварительном тракте *Polygraphus proximus*



Относительное обилие видов грибов в буровой муке *Polygraphus proximus*



Относительное обилие видов в пищеварительном тракте *Ips sexdentatus*



A. ochraceus – патоген кофейного жука *Hurothenemus hampei* (Vega, Mercadier, 1998)

A. pullulans – с поверхности жуков-блестянок *Nitidulidae* (Rosa et al., 1994)

M. plumbeus – с поверхности короеда *Ips tyrographus* (Giordano et al., 2013)

P. variotii – ходы короеда *Dendroctonus ponderosae* (Ayer et al., 1991), ходы, покровы и кишечник точильщика *Xyleborinus saxesenii* (Biedermann et al., 2013)

S. kiliense – с поверхности короеда *Ips tyrographus* (Giordano et al., 2013)

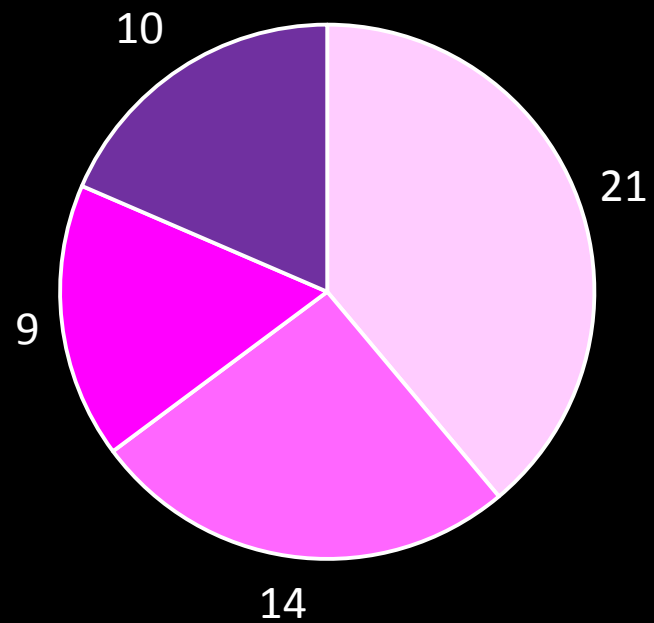
Определение антибиотической активности штаммов

Для определения антибиотической активности были взяты:

- выделенные штаммы
- коллекционные штаммы

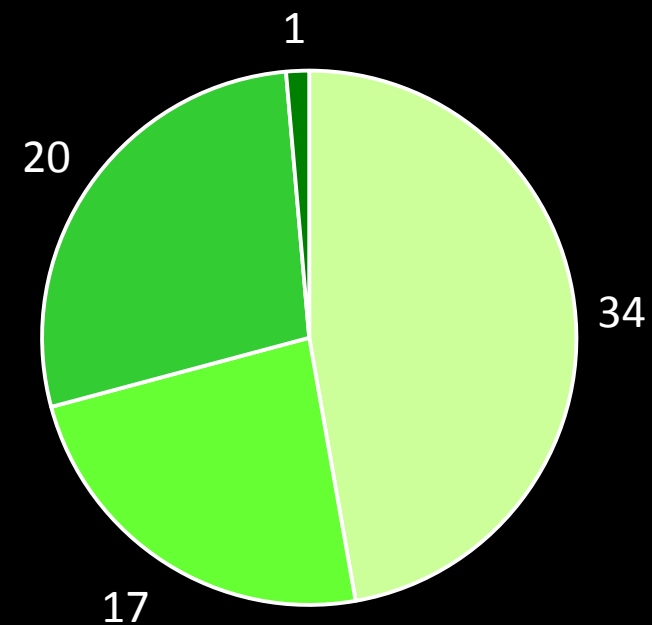
Субстрат	Виды
Хитиновый покров <i>L. niger</i>	<i>Mucor sp.</i> , <i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>P. lanosum</i> , <i>Phoma eupyrena</i>
Экскременты <i>L. niger</i>	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Gibberella trincta</i> , <i>P. simplicissimum</i>
Пищеварительный тракт <i>E. foetida</i>	<i>M. hiemalis</i> , <i>Mycelia sterilia</i> ¹
Копролиты <i>E. foetida</i>	<i>Bionectria solani</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>
Копролиты <i>L. rubellus</i>	<i>M. racemosus</i> , <i>Mycelia sterilia</i> ²

Антибактериальная активность штаммов



■ Неактивные ■ Слабоактивные ■ Умеренноактивные ■ Высокоактивные

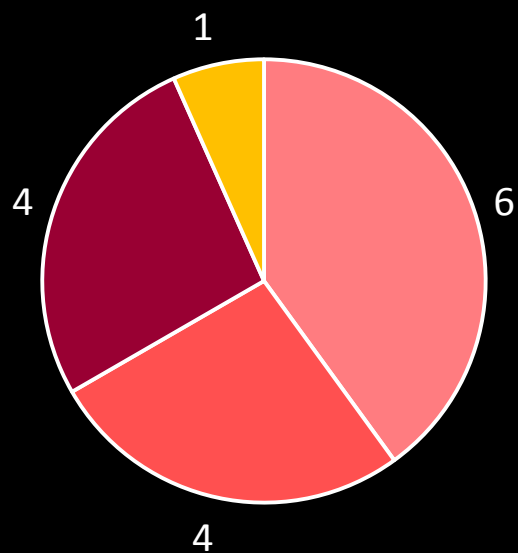
Антимикотическая активность штаммов



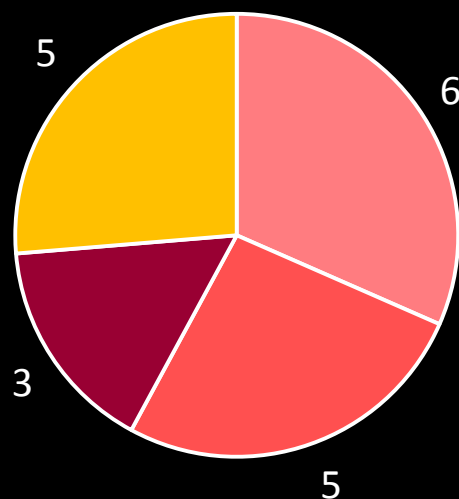
■ Неактивные ■ Слабоактивные ■ Умеренноактивные ■ Высокоактивные

Антибактериальная активность штаммов грибов из разных местообитаний

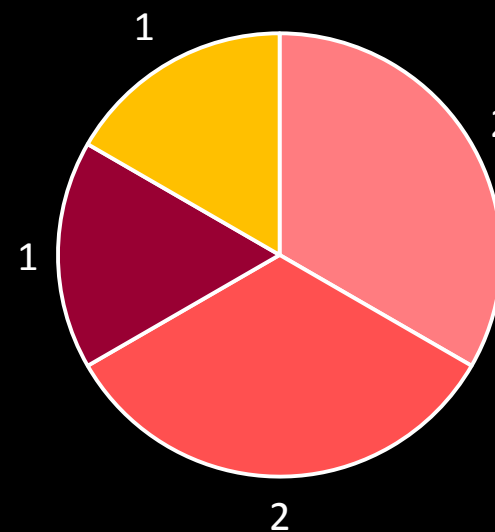
Хитиновый покров



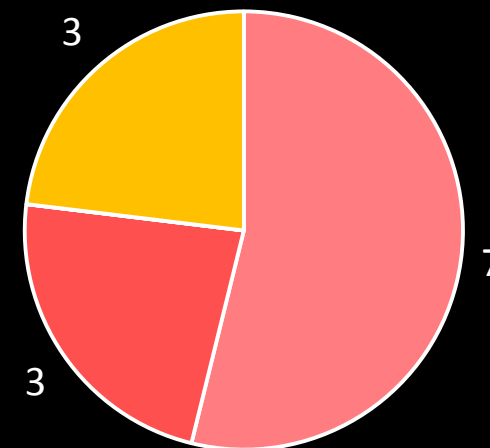
Пищеварительный тракт



Экскременты



Буровая мука



■ Неактивные ■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные ■ Высокоактивные

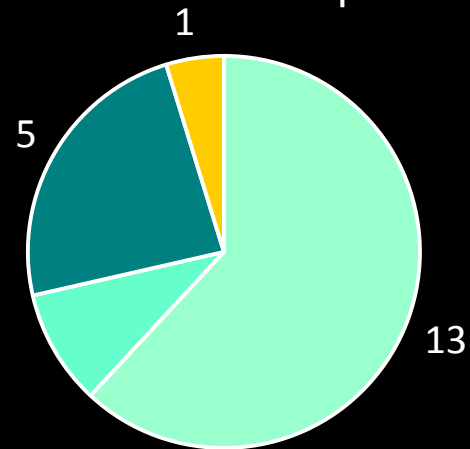
■ Неактивные ■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные ■ Высокоактивные

■ Неактивные ■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные ■ Высокоактивные

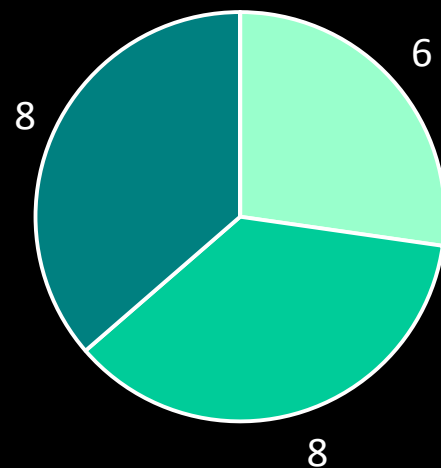
■ Неактивные ■ Слабоактивные
■ Высокоактивные

Антимикотическая активность штаммов грибов из разных местообитаний

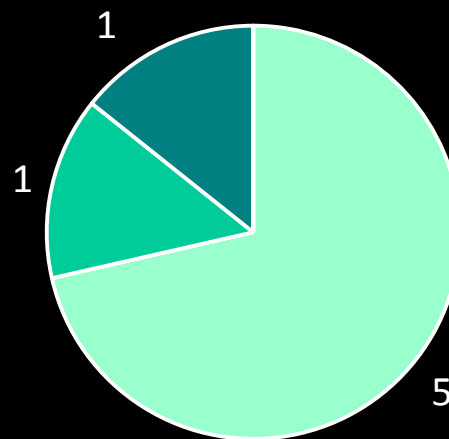
Хитиновый покров



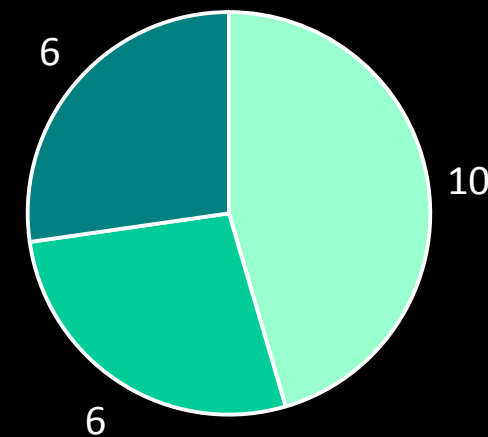
Пищеварительный тракт



Экскременты



Буровая мука



■ Неактивные
■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные
■ Высокоактивные

■ Неактивные
■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные

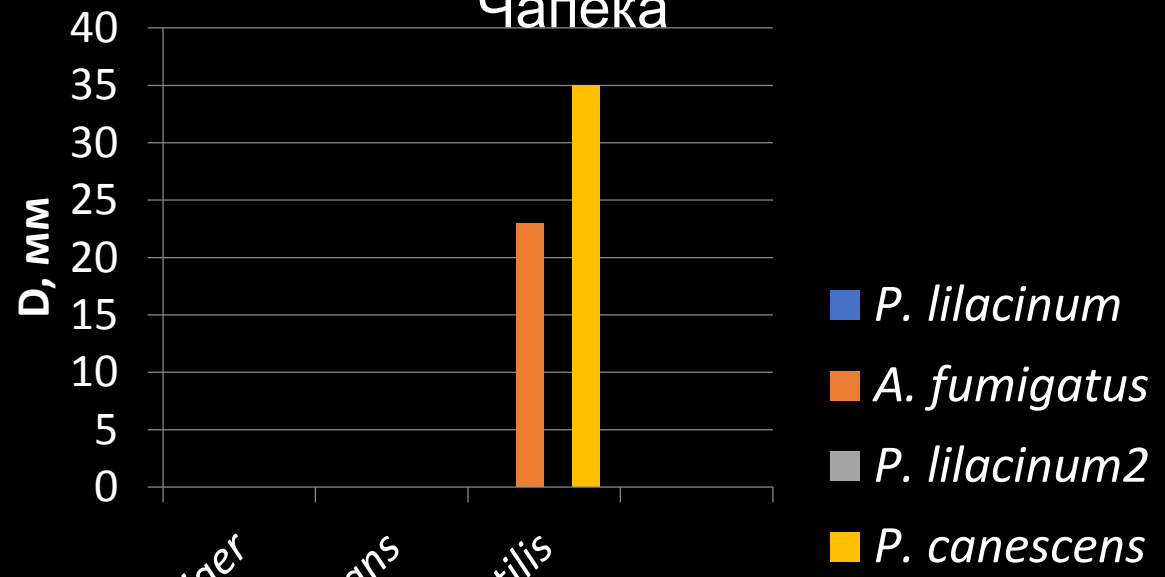
■ Неактивные
■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные

■ Неактивные
■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные

Определение антибиотической активности наиболее активных штаммов грибов при росте на жидких средах

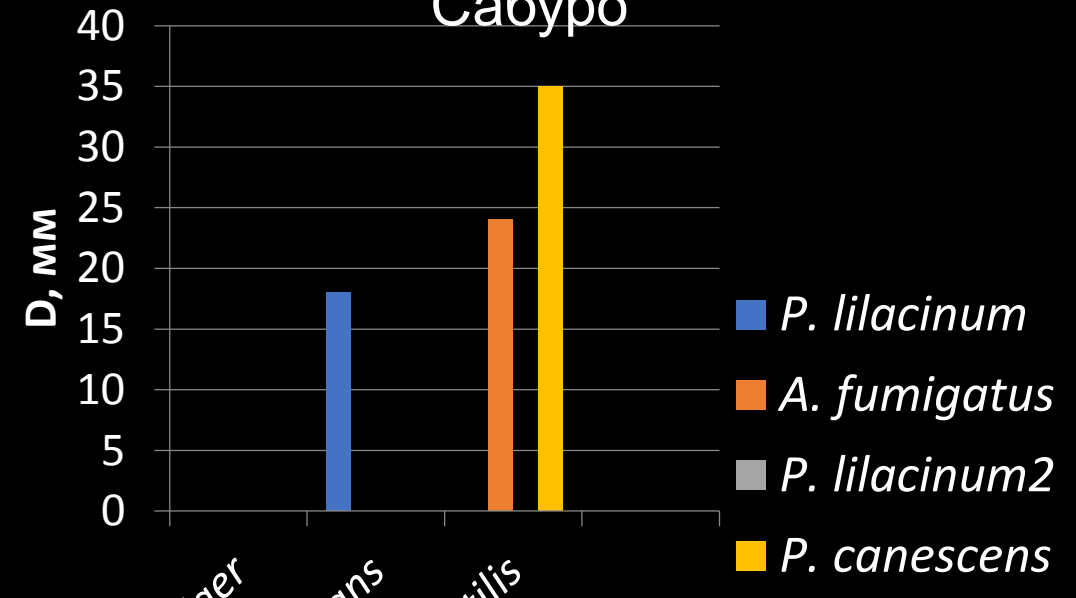
Активность штаммов на среде

Чапека



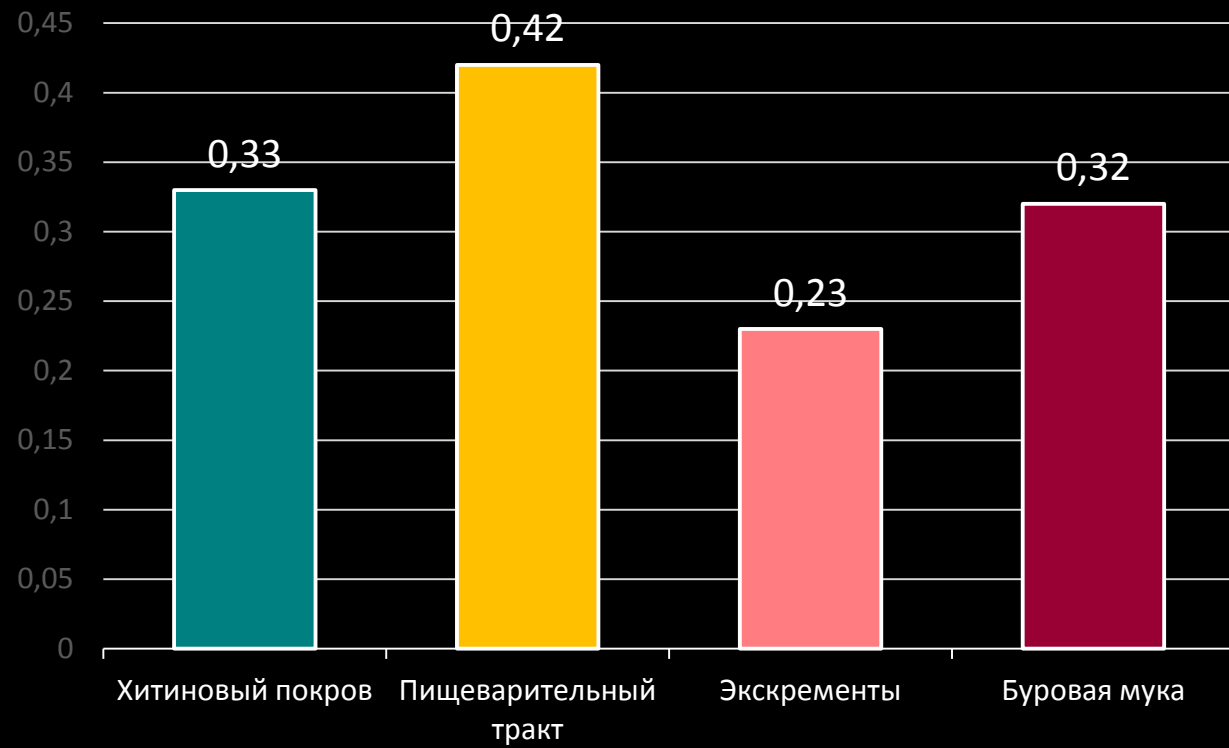
Активность штаммов среде

Сабуро

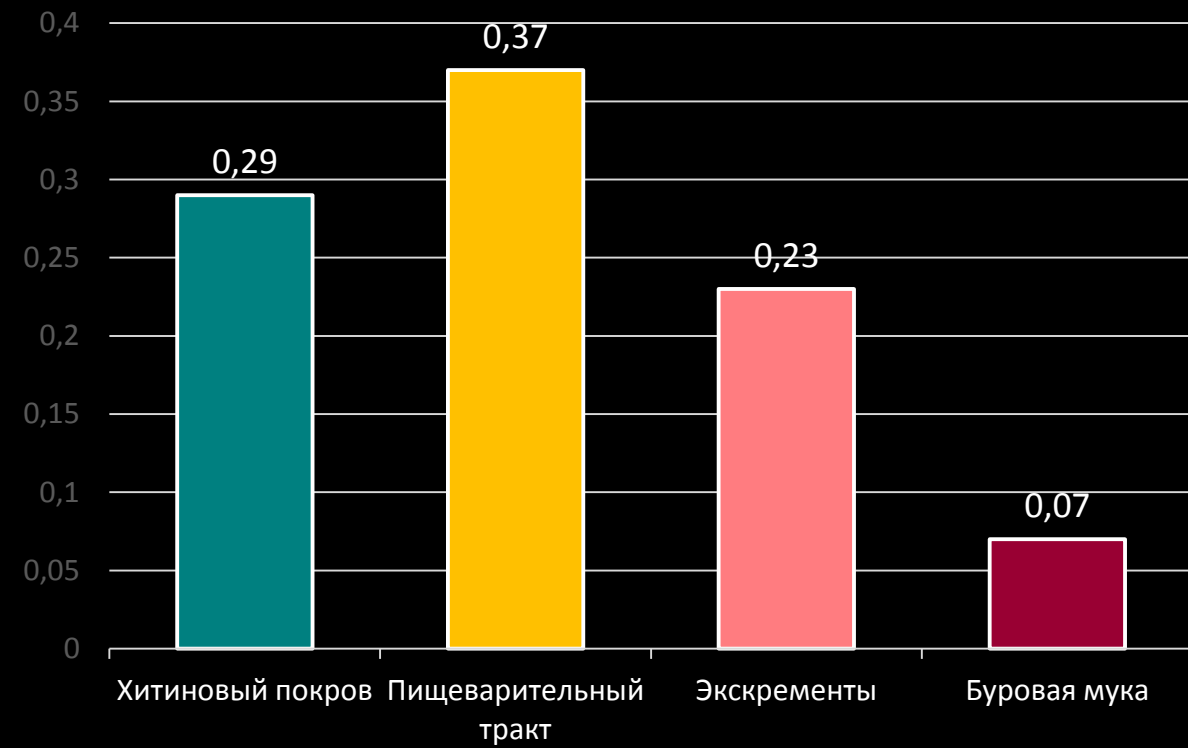


Доля штаммов проявивших высокую и умеренную антибиотическую активность из разных местообитаний

Антибактериальная активность

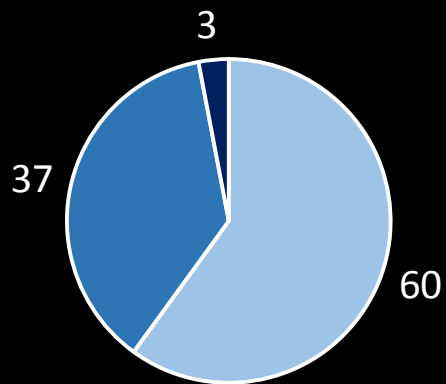


Антимикотическая активность

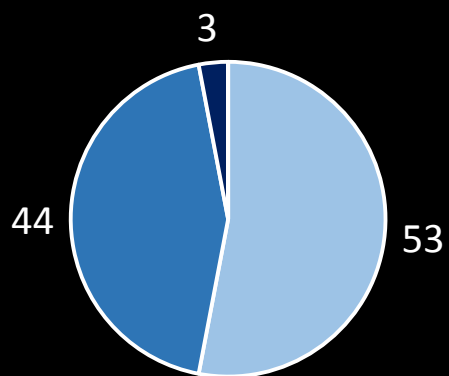


Антимикотическая активность штаммов микромицетов из различных экотопов (в % доля изолятов с разной активностью)

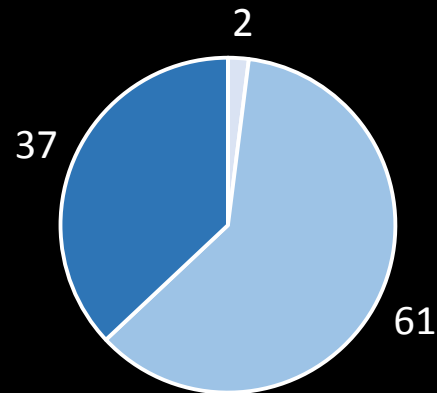
Верхние горизонты почв зональных типов



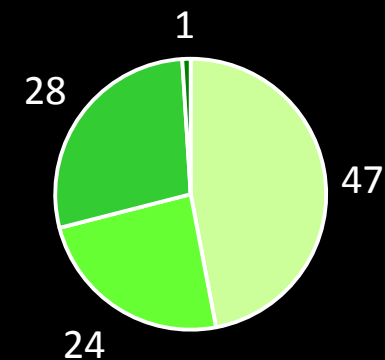
Разрушающиеся растительные субстраты



Экстремальные местообитания



Местообитания, связанные с беспозвоночными



■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные
■ Высокоактивные

■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные
■ Высокоактивные

■ Неактивные
■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные

■ Неактивные
■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные

■ Неактивные
■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные
■ Высокоактивные

■ Неактивные
■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные
■ Высокоактивные

■ Неактивные
■ Слабоактивные
■ Умеренноактивные
■ Высокоактивные

Выводы

- Среди штаммов, выделенных с поверхности хитинового покрова, из пищеварительного тракта и продуктов жизнедеятельности изученных видов беспозвоночных животных, доля штаммов активных в отношении тест-бактерий была 61% (умеренно активных 17% высокоактивных – 18%); штаммов активных в отношении грибов – 53% (умеренно активных – 28%, высокоактивных – 1%).
- Большая часть штаммов с антибиотической активностью (40% с антибактериальной, 42% с антимикотической) была выделена из пищеварительного тракта беспозвоночных, что указывает на перспективность поиска новых эффективных штаммов в этом местообитании.
- Из местообитаний, связанных с наземными беспозвоночными, 1% штаммов обладал высокой антимикотической активностью, что сопоставимо с встречаемостью аналогичных по активности культур, выделенных из разлагающихся растительных субстратов (3%) и верхних горизонтов почв зонального типа (3%).
- Максимальная антибактериальная активность установлена у *P. canescens*, выделенного из пищеварительного тракта *I. sexdentatus*, а антимикотическая у *P. lilacinum* из пищеварительного тракта *P. proximus*.