

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

Взаимодействия грибов и дождевых червей *Eisenia fetida*

Выполнила:
Комкова А.М.

Научный руководитель:
д. б. н. Кураков А.В.

Актуальность

Влияние дождевых червей на грибные сообщества

- Может быть метабиотическое, не прямое – путем изменения порозности и структуры почв, ее химических свойств, перемешивание, измельчение и потребление растительных остатков, создание принципиально новых эконих для грибов и форическое – перенос спор и фрагментов мицелия по почвенному профилю в горизонтальном и вертикальном направлениях,
- Трофическое и метаболическое – действие выделяемых в пищеварительном тракте биологически-активных соединений (аминокислот, витаминов, пищеварительных ферментов, киллерных веществ и т.д.) на жизнеспособность грибов и органоминеральных частиц на жизнеспособность пропагул.

Действие целомической жидкости

- В основном исследовали метабиотическое и форическое действие червей на грибы.
- Выполнен ряд работ о влиянии кишечной жидкости на бактерии и сапротрофные микроскопические грибы (Бызов 2005; Харин 2008), однако практически не изучено влияние на фитопатогены, гумусовые базидиомицеты. Исследований же посвященных влиянию целомической жидкости на грибы единичны.

Цель и задачи

Целью работы является изучение влияния кишечной и целомической жидкостей *Eisenia fetida* на представителей фитопатогенных, гумусовых и копротрофных грибов.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- ▶ Провести анализ отечественной и зарубежной литературы о влиянии кишечной и целомической жидкостей *Eisenia fetida* на представителей фитопатогенов, гумусовых, ксилотрофных и копротрофных сапротрофов.
- ▶ Изучить влияние кишечной и целомической жидкостей *E. fetida* на жизнеспособность и характер прорастания спор представителей грибов – фитопатогенов и сапротрофов.
- ▶ Оценить действие кишечной и целомической жидкостей дождевых червей *E. fetida* на жизнеспособность мицелия и линейную скорость роста грибов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались штаммы следующих видов, из ВИЗР, ВНИИКР и коллекции кафедры.

| | | |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------|
| <i>Alternaria solani</i> 10к | Фитопатоген | ВИЗР |
| <i>Monilia fructigena</i> 21к | Фитопатоген | ВНИИКР |
| <i>Monilia laxa</i> 11к | Фитопатоген | ВНИИКР |
| <i>Fusarium anguioides</i> 12к | Фитопатоген | ВИЗР |
| <i>Fusarium solani</i> 13к | Фитопатоген | ВИЗР |
| <i>Agaricus bisporus</i> ма1 | Сапротроф гумусовый | Коллекция кафедры |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> ма5 | Сапротроф- ксилотроф | Коллекция кафедры |
| <i>Panellus serotinus</i> ма10 | Сапротроф- ксилотроф | Коллекция кафедры |
| <i>Fomitopsis pinicola</i> ма15 | Сапротроф- ксилотроф | Коллекция кафедры |
| <i>Coprinus comatus</i> ма25 | Сапротроф- копрофил | Коллекция кафедры |



Дождевые черви *Eisenia fetida*

Красные калифорнийские черви (подстилочные).

Животных содержали в вермикомпостерах при 20-25°C и влажности 60-80% от полной влагоемкости (ПВ).

В качестве корма использовали навоз конский и коровий с добавками органических субстратов.



Вермикомпостер

Получение кишечной жидкости дождевых червей

Для выделения кишечной жидкости червей умерщвляли, погружая в кипящую воду на 1 сек.

Червя размещали на морозильном столике (элемент Пелтье), где охлаждали до минус 16° С за 20-30 сек.

Далее проводили вскрытие червя, и в момент размораживания извлекали кишечник и/или его содержимое.

Извлеченную массу центрифугировали при 12000 об./мин в течение 10 мин для осаждения содержимого и стерилизации.

Стерилизацию жидкостей проводили в стерильном боксе с помощью стерильного шприцевого фильтра с размером пор в 0,22 мкм. Супернатант проверялся на стерильность методом посева без разведения на сусло-агар, инкубация производилась при 20° С в течение 7 дней.

Посев не выявил бактерий и грибов. До начала тестирования кишечную жидкость хранили при минус 18°С (Харин, 2009).

Было получено 3,42 мл кишечной жидкости из приблизительно 150 червей.

Получение целомической жидкости дождевых червей

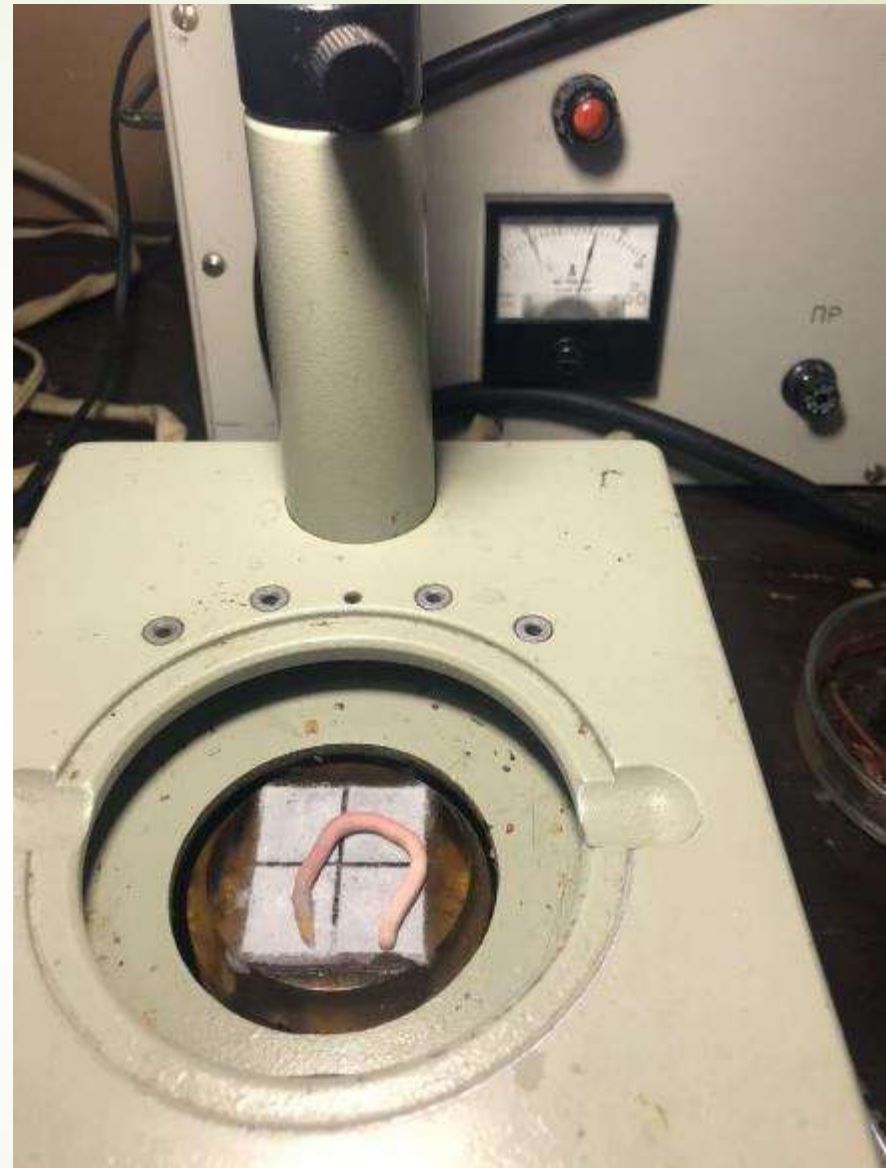
Для получения целомической жидкости было опробовано два метода, оба были модифицированы под условия работы. Первый метод заключался в том, что дождевых червей помещали в физиологический раствор и подвергали электрошоку, чтобы стимулировать экструдицию целомической жидкости и целомоцитов. В ходе экспериментов было обнаружено, что более эффективным методом является механическое раздражение внешних покровов тела червей.

На следующем этапе проводили сбор целомической жидкости с помощью микропипетки. Так же хорошо себя зарекомендовали стерильные медицинские шприцы малых объемов. Жидкость помещали в пробирку и держали на льду, в морозильной камере при минус 18° С. Посев на питательную среду не выявил роста микроорганизмов.

Всего было получено чуть больше 3 мл жидкости из приблизительно 200 червей.



Дождевые черви рода *Eisenia*



Дождевой червь на морозильном
столике
с элементом Пельтье

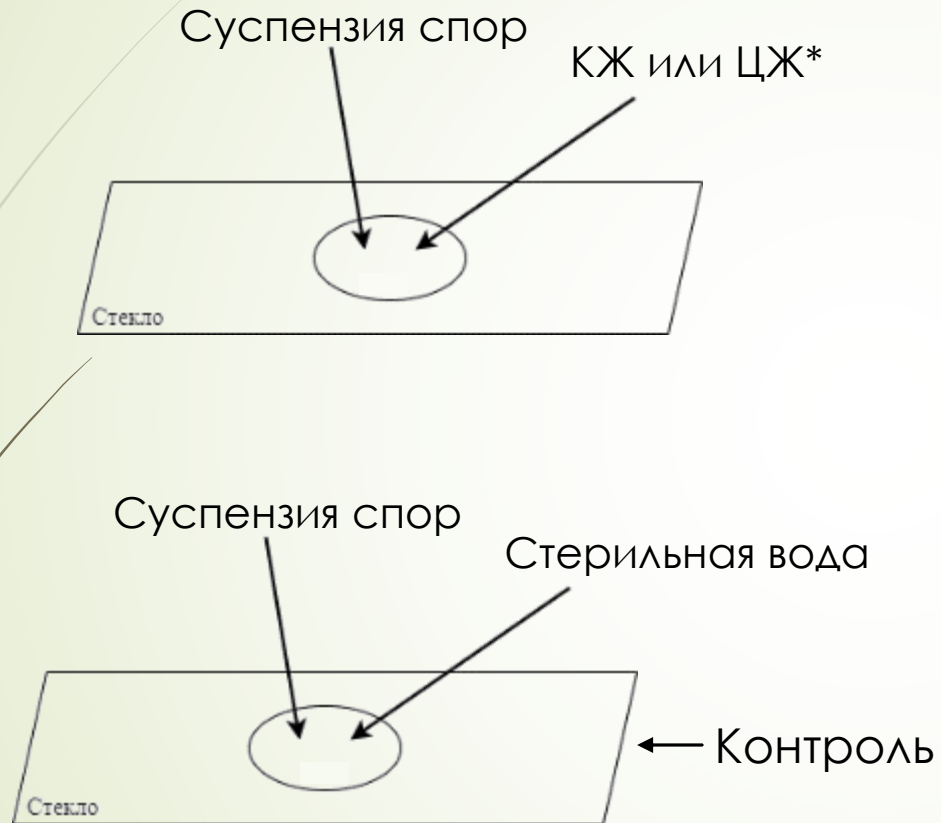


Эппендорфы на 1,5 мл с кишечной и
целомической жидкостью до
центрифугирования



Пробы с жидкостями перед
закладкой в морозильную камеру

Схема эксперимента по определению действия жидкостей на прорастание спор



***КЖ и ЦЖ – Кишечная и Целомическая жидкости, соответственно**

Стекла инкубировали в изолированных влажных камерах при 18-20°C.

Подсчет прорастающих спор проводили через трое суток в световом микроскопе при увеличении $\times 400$ по 10 полям зрения микроскопа.

При оценке уровня прорастания учитывали не менее 100 спор (при плотности нанесения их на стекло 4-15 спор в поле зрения при увеличении $\times 400$).

Результаты

Таблица 1. Влияние кишечной и целомической жидкости *Eisenia fetida* на прорастание спор фитопатогенных грибов (в %)

| Вид/штамм | Кишечная жидкость | Целомическая жидкость | Контроль |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------|----------|
| Alternaria solani 10к | 18% | 63% | 27% |
| Monilia fructigena 21к | 26% | 42% | 38% |
| Monilia laxa 11к | 25% | 46% | 30% |
| Fusarium anguioides 12к | 30% | 85% | 61% |
| Fusarium | 34% | 89% | 65% |

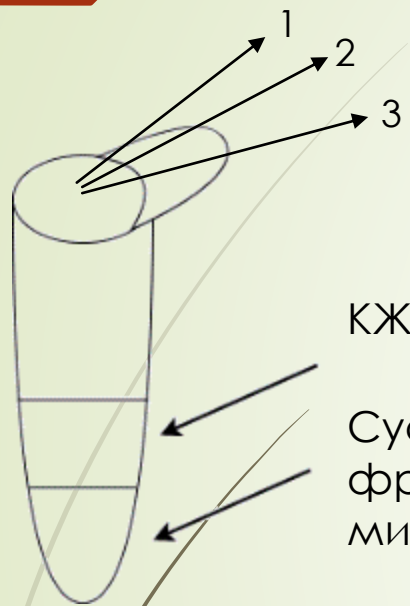
В таблице 1 в процентах указано количество проросших спор по отношению к общему количеству спор в препарате; коэффициент вариации данных 10-15%.

В данном эксперименте использовали споры фитопатогенных грибов (таблица 1).

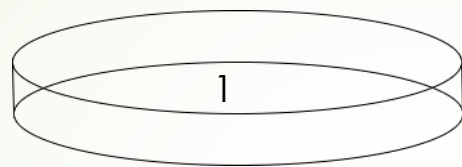
В большинстве случаев наблюдали несколько более высокий или близкий процент прорастания спор при нахождении их в целомической жидкости червей. После прорастания спор, мицелий имел сходную или несколько более высокую скорость роста, чем в контроле.

В кишечной жидкости, напротив, доля прорастающих спор этих грибов уменьшалась. Скорость роста мицелия также была ниже, чем в контроле.

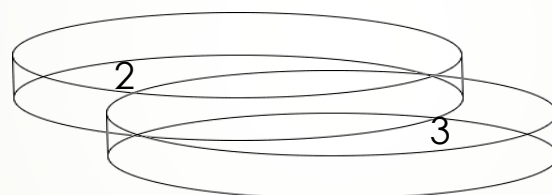
Схема эксперимента по оценке влияния кишечной и целомической жидкостей на жизнеспособность мицелия и линейную скорость роста грибов после совместной их инкубации



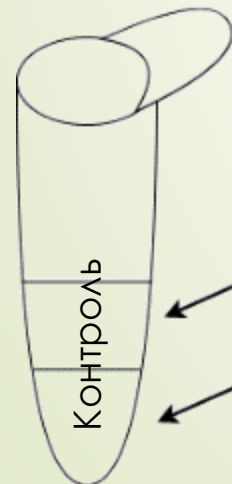
Инкубация мицелия гриба и периодический отбор проб с посевом на сусло-агар (подсчет линейной скорости роста колоний)



Посев через 1-2 мин**



Посев через 2 ч** и 24 часа



Через 24 ч**

*КЖ и ЦЖ – Кишечная и Целомическая жидкости соответственно
** время после смешения суспензии с КЖ или ЦЖ в эппендорфе.

Проводили посев суспензии фрагментов мицелия грибов, инкубировавшегося с КЖ или ЦЖ *Eisenia fetida*.

В контроле вместо КЖ или ЦЖ была использована стерильная вода с фрагментами мицелия.

Результаты

В таблице 2 представлены средние линейные скорости всех протестированных штаммов грибов после инкубации в целомической и кишечной жидкостях *E. fetida*.

- Установлено, что фитопатогенные грибы под влиянием инкубации мицелия в кишечной жидкости *E. fetida* снижали скорость роста. В ряде вариантов у *Monilia fructigena* и *Monilia laxa* мицелий погибал в кишечной жидкости.
- Действие целомической жидкости червей было заметно слабее. На скорость роста представителей гумусовых, копрофильных и ксилотрофных сапротрофных кишечная жидкость *E. fetida* оказывала очень небольшой негативный эффект, а в подавляющем большинстве случаев ЦЖ не действовала на рост .

ВЫВОДЫ

- ▶ Проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по оценке влияния кишечной и целомической жидкостей *Eisenia fetida* на представителей фитопатогенных, гумусовых, ксилотрофных и копрофильных грибов. Найденные исследования касались в основном антибактериальной активности целомической жидкости, работ о влиянии целомической жидкости на фитопатогенные грибы, базидиомицеты отсутствовали. Большое количество работ посвящены метабиотическим и форическим воздействиям червей на грибы, и есть исследования влияния кишечной жидкости на бактерии и сапротрофные микроскопические грибы.
- ▶ Установлено, что кишечная жидкость *Eisenia fetida* оказывает ингибирующее действие на прорастание спор фитопатогенных грибов. Она также снижала жизнеспособность мицелия и линейную скорость роста фитопатогенных грибов. Целомическая жидкость оказывала на изученные штаммы фитопатогенов значительно более слабое воздействие.
- ▶ Кишечная жидкость оказывала слабое воздействие или не влияла в большинстве случаев на линейную скорость роста и жизнеспособность гумусовых, копрофильных и ксилотрофных видов грибов-базидиомицетов. Ингибирующего действия на представителей этих грибов целомической жидкости не наблюдали.



Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю, А. В. Куракову, за помощь на всех этапах работы; Рецензенту – Е. Н. Биланенко; А так же В. В. Тихонову и А. В. Якушеву за предоставление животных объектов, оборудования и помощь с практическо-методической частью работы.

Спасибо за внимание!

