

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

**ГРИБЫ
В ПРЕСНОВОДНЫХ ИСТОЧНИКАХ
МОСКОВСКОГО РЕГИОНА**

Дипломная работа студентки 4 курса Шумаковой А.А.

Научный руководитель:

доктор биологических наук Кураков А.В.

Москва, 2021

АКТУАЛЬНОСТЬ

Микобиота пресных водоемов и водотоков, подземных водах изучена намного хуже таковой в морских местообитаниях, засоленных и содовых озер. В то же время нам важно знать, как роль грибов в функционировании пресноводных экосистем, так и разнообразие грибов в грунтовых водах, местах их выхода на поверхность и водоемах, которые используются для водоснабжения людей, являются непосредственными источниками питьевой воды.

Кроме того, число видов пресноводных грибов недооценено в связи с малой изученностью прежде всего их подземных экотопов. Для оценки качества воды, используемой в питьевых и хозяйственно-бытовых целях, давно используется согласно федеральному законодательству разнообразные (около 36) физико-химические показатели (мутность, цвет, запах, привкус, содержание нефтепродуктов, ПАВ, неорганических и органических соединений, pH, нитратов, нитритов, тяжелых металлов).



АКТУАЛЬНОСТЬ

Принято несколько микробиологических критериев (общее микробное число (не более 50 КОЕ/100 см³), отсутствие колиформных бактерий и термотолерантных колиформных бактерий (в 100 см³). Однако такие показатели по грибам отсутствуют в наших санитарно-эпидемиологических нормативах. К тому же, проведено очень мало работ по микобиоте в питьевых источниках, грунтовых водах, колодцах, системе городского и больничного водоснабжения. Однако известно, что некоторые виды грибов способны придать воде неприятный привкус и запах, а другие продуцируют аллергены и микотоксины. Внимание специалистов, ответственных за качество воды, до недавнего времени было направлено главным образом на контроль патогенов бактериальной, вирусной и протистной этиологии. Появление условно-патогенных грибов, спектр видов которых очень широкий, в воде муниципальных систем, колодцах и общественных источниках, вода из которых активно используется для питья и приготовления пищи, как правило, не контролируется, а, реально, полностью игнорируется. Однако возможность того, что источником инвазивных оппортунистических грибных инфекций, таких как аспергиллез, у пациентов с ослабленным иммунитетом могут быть споры, переносимые водой, получает все большее признание. Один из путей привлечь к этой проблеме внимание – начать активное исследование состава и плотности популяций грибов в воде, используемой в питьевых целях, в разных регионах и странах и разработать критерии микологического контроля воды.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить видовое разнообразие грибов в нескольких пресноводных источниках, используемых для питья, на территории Москвы и Московской области.



ОБЪЕКТЫ

Образцы воды были отобраны в стерильные стеклянные ёмкости (в 3-х повторностях) из холодных пресноводных водотоков - источников, колодца, пруда в который впадает источник, в июне и июле 2021 года. Отбор воды **21.06.2021** был произведён из общественного колодца в деревне Аладыно Серпуховского района и в 30 м от начала источника в городе Мытищи Московской области.

02.07.21 был проведён отбор воды из группы источников Кадочка в парке Коломенское в Голосовом овраге (г.Москва).

09.07.21 отбирали воду из источника возле ФГБУ «ВНИИ Экология» и из источника на территории Битцевского парка в г.Москва.

21.07.21 был проведён забор воды из частного колодца (закрытого от внешней среды и редко используемого) в садовом товариществе Тарасково Наро-Фоминского района Московской области.



Температура воды в источниках и колодце 5-8 С.

Все пробы были отобраны в стерильную стеклянную тару объёмом 0,5 с помощью чистого пластикового мерного стакана объёмом 0,5 л и чистой пластиковой воронки. Стерилизацию емкостей проводилась методом кипячения.

Не всегда была возможность получить пробу с илом, но большая часть эксперимента включает в себя таковые.

Порядок действий при отборе был таковым:

- необходимо было мерным стаканом зачерпнуть нужное количество воды из источника;
- с помощью воронки вода переливалась из стакана в стерильную стеклянную тару;
- тара закрывалась завинчивающейся крышкой, но не до конца, чтобы был доступ кислорода для грибных организмов в воде.

После отбора ёмкости с образцами помещали в термосумку на время транспортировки.

ОБОРУДОВАНИЕ

Оборудование для отбора проб соответствовало стандартам ГОСТа:

- Ёмкость из стекла для отбора проб с плотной крышкой
- Мерный стакан пластиковый стерильный
- Воронка пластиковая стерильная
- Термосумка с охлаждающим элементом для транспортировки проб

В данном эксперименте необходимым количеством, удобным для дальнейшей работы, был объём одной пробы 0,5 литра, а общий объём 3-х повторностей конкретной пробы достигал полутора литров.





МЕТОДЫ

Посев проводили в течение суток после забора проб воды, выделение чистых культур из появляющихся колоний начинали после трёх-пяти календарных дней инкубации чашек и продолжали в течение 2-3 недель.

СРЕДА

Использовали сусло-агар и Чапек-агар, которые стерилизовали автоклавированием (1 атм).

В состав среды Чапека входят следующие ингредиенты: дистиллированная вода 500 мл, сахара 15 г, агар 10 г, NaNO_3 1,0 г, KH_2PO_4 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 г, KCl 0,25 г. Для подавления роста бактерий в расплавленную остывшую среду добавляли антибиотик цефотаксим в количестве 50 мг в 500 мл среды, его в виде порошка наносили также на комочки ила при их нанесении на поверхность среды.



МЕТОДЫ

ПРОВЕДЕНИЕ ПОСЕВА

Посев проводили непосредственно из воды и фильтров, через которые была отобранная вода профильтрована. Образцы воды в количествах 0,5 мл, 1 мл, 2 мл и 3 мл при помощи стерильной пипетки наливали в стерильные чашки Петри, после чего в них заливали питательную среду, а сами чашки оборачивали плёнкой для предохранения от контаминации среды и её высыхания.

Фильтрацию образцов воды проводили в специально оборудованном помещении (боксе).

Пробы ила в виде комочков стерильным ланцетом помещали на поверхность питательной среды, сверху дополнительно посыпали порошком антибиотика цефотаксима, и чашки Петри также заворачивали плёнкой.

Посев проводили из каждой отдельной пробы воды на 6-7 чашек Петри. В целом, из одного объекта с использованием разного объема аликвоты для посева была повторность чашек Петри - 30-40.



МЕТОДЫ

ИНКУБАЦИЯ ПОСЕВОВ

Посевы инкубировали в термостате при $+10-15^{\circ}\text{C}$. После 1-2 недель проводили подсчёта грибных колоний для дальнейшего пересчета в число КОЕ в 1 л. По большей части в чашках было от нескольких до сотни колоний. Подсчёт проводили визуально, отмечая отдельные колонии на нижней стороне чашек Петри.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ГРИБОВ

Для дальнейшей работы необходимо было отобрать колонии, из которых можно было бы вырастить монокультуры и их идентифицировать



МЕТОДЫ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ГРИБОВ

Идентификацию изолятов проводили по морфолого-культуральным признакам по рекомендуемым определителям для каждой таксономической группы грибов и молекулярно-генетическим методом (секвенированием региона ITS рибосомальной ДНК) в компании Синтол (Москва). Выделение геномной ДНК проводилось с помощью набора «Проба-Экспресс» (СИНТОЛ, кат. номер EX-517)

ТАБЛИЦА КОЕ

Водный объект	Местоположение	Диапазон варьирования	Среднее число КОЕ грибов в 1 л
Источники	Парк Коломенское, Москва	35-530	310±160
Источник	Битцевский парк , Москва	60-100	80±20
Источник	Парк у ВНИИ Экология, Москва	10-20	13±7
Источник	Мытищи, Московская обл.	40-200	123±60
Колодец	Аладьино, Серпуховской р-н, МО	34-236	123±77
Колодец	Тарасково, Наро- Фоминский р-н, МО	30-50	35±15

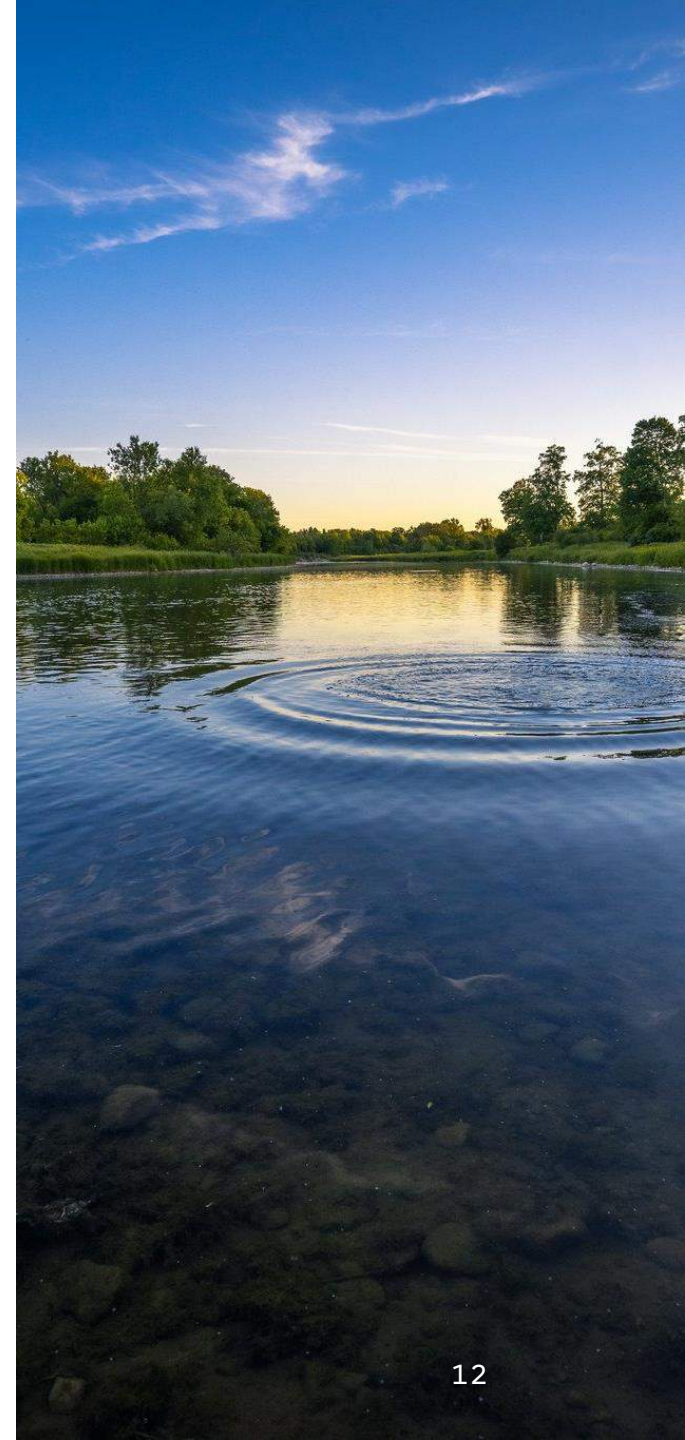


ТАБЛИЦА С ВИДАМИ (1)

Вид	Класс	Отдел
<i>Absidia cylindrospora</i> var. <i>nigra</i>	<i>Mucoromycetes</i>	<i>Mucoromycota</i>
<i>Mucor circinelloides</i>		
<i>Mucor hiemalis</i>		
<i>Rhizopus stolonifer</i>		
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Ascomycota</i>
<i>Alternaria</i> sect. <i>Gymsophilae</i> <i>A. nobilis</i>		
<i>Amorocoelophoma cassiae</i>		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>		
<i>Phoma herbarum</i>		
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Aspergillus oryzae</i>		
<i>Aspergillus versicolor</i>		
<i>Eladia saccula</i>		
<i>Penicillium brevicompactum</i>		
<i>Penicillium chalabudae</i>		
<i>Penicillium chrysogenum</i>		
<i>Penicillium citreonigrum</i>		
<i>Penicillium corylophilum</i>		
<i>Penicillium glabrum</i>		
<i>Penicillium goetzii</i>		
<i>Penicillium expansum</i>		
<i>Penicillium restrictum</i>		



ТАБЛИЦА С ВИДАМИ (2)

Вид	Класс	Отдел
<i>Candida solani</i>	Saccharomycetes	Ascomycota
<i>Candida zeylanoides</i>		
<i>Galactomyces pseudocandidus</i>		
<i>Acremonium potronii</i>	Sordariomycetes	
<i>Chaetomium sp.</i>		
<i>Cytospora leucostoma</i>		
<i>Fusarium moniliforme</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i>		
<i>Fusarium tricinctum</i>		
<i>Myrothecium cinctum</i>		
<i>Myrothecium leucotrichum</i>		
<i>Plectosphaerella plurivora</i>		
<i>Trichoderma atroviride</i>		
<i>Trichoderma citrinoviride</i>		
<i>Trichoderma harzianum</i>		
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>		
<i>Mrakia gelida</i>	Tremellomycetes	Basidiomycota
<i>Vishniacozyma victoriae</i>		
<i>Phlebia acerina</i>	Agaricomycetes	
<i>Psathyrella candolleana</i>		
<i>Thanatephorus cucumeris</i>		



САМЫЕ РАСПРОСТРАНЁННЫЕ ВИДЫ

Среди наиболее часто встречающихся видов и с высоким числом КОЕ обнаружены следующие виды:

ASPERGILLUS NIGER

представлен в четырёх пробах: Мытищи, Аладьино, Коломенское и Битцевский парк. Для воды из источника в г.Мытищи число КОЕ/л составляет 9,33, в колодец в д.Аладьино количество варьирует от 4 до 20 КОЕ/л, в пробах из источника в Коломенском и пруда в Битцевском парке количество составило 0,5 КОЕ/мл, что при пересчёте на литр будет на один-два порядка выше, чем у двух предыдущих проб.

CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES

встречался не так часто, его удалось выделить только из проб г.Мытищи и Коломенского. Обнаружить этот вид удалось в пробах суспензии ила, и он был представлен в достаточно значительных количествах - 2,5 КОЕ/мл для источника в г.Мытищи и 13,5 КОЕ/мл для источника в Коломенском.



САМЫЕ РАСПРОСТРАНЁННЫЕ ВИДЫ (2)

MRAKIA GELIDA

Базидиомицетный гриб *Mrakia gelida* встречался достаточно часто и был выделен из четырёх проб (Мытищи, Аладыно, Битцевский парк и колодец в д.Тарасково). Выделялся он из проб воды и из суспензии ила. В пробе из источника в г.Мытищи обнаружено 8 КОЕ/л, в колодце в Аладыно - 6 КОЕ/л, в колодце в д.Тарасково - 10 КОЕ/л. Для проб суспензии ила из пруда в Битцевском парке было подсчитано количество КОЕ/мл, которое составило 2,5 КОЕ/мл.

MUCOR HIEMALIS

Представитель муковых *Mucor hiemalis* был представлен в двух пробах суспензии ила из Коломенского и Института Экологии. В Коломенском количество КОЕ/мл составило 8,5, для Института Экологии это число составило 3,43.

PENICILLIUM CHRYSOGENUM

был выделен из всех проб, за исключением проб из Коломенского. Он был отмечен во всех видах проб, и количество КОЕ было различным. Так, в Мытищах было выявлено 18 КОЕ/л, в Аладыно - от 4 до 54 единиц. В пробах суспензии ила из Битцевского парка было обнаружено 6,5 КОЕ/мл, из проб Института Экологии - 0,86 КОЕ/мл, в пробах воды из Тарасково - 2-2,6 КОЕ/мл.

САМЫЕ РАСПРОСТРАНЁННЫЕ ВИДЫ (3)

RHIZOPUS STOLONIFER

присутствовал в пробах из Аладыно, Коломенского и Битцевского парка, причём мог являться причиной зарастания чашек мицелием поверх уже выросших колоний, что было достаточно сложно предотвратить. В пробах из Аладыно количество КОЕ/л варьировало от 4 до 16, в пробах из Битцевского парка количество составило 70. Из суспензии ила в Коломенском было выделено 5 КОЕ/мл, а из посева воды - 0,33.

TRICHODERMA CITRINOVIRIDE

был обнаружен в воде из Аладыно и Тарасково. Для пробы из Аладыно КОЕ/л составило 20-64, для пробы из Тарасково - 1070-2470 (что может быть обусловлено погрешностью восприятия и ручного подсчёта колоний. Вероятно, на чашках Петри была представлена одна сильно разветвлённая колония, но в ходе исследования было принято решение считать индивидуальными отдельные мелкие колонии, из которых она состояла).

TRICHODERMA HARZIANUM

Ещё один вид - *Trichoderma harzianum* - был представлен в пробах воды из источника возле Института Экологии и из колодца в д.Тарасково. В пробе воды из источника около Института экологии было выявлено 4 КОЕ/мл, в пробе суспензии ила из колодца в д.Тарасково выявлено 4,8 КОЕ/мл.

ТАБЛИЦА ПО ИЛАМ

Название	Номера источников*		
	1	3	5
<i>Absidia cylindrospora</i> var. <i>Nigra</i> Hesselt. & J.J. Ellis	-	-	+
<i>Acremonium potronii</i> Vuill	+	-	-
<i>Amorocoelephoma cassiae</i> Jayasiri, E.B.G. Jones & K.D. Hyde	-	-	+
<i>Aspergillus flavus</i> Link	+	+	-
<i>Candida zeylanoides</i> (Castell.) Langeron & Guerra	-	-	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	+	+	-
<i>Eladia saccula</i> (E. Dale) G. Sm.	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	-	-	+
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	-	+	+
<i>Myrothecium cinctum</i> (Corda) Sacc.	+	-	-
<i>Myrothecium leucotrichum</i> (Peck) M.C. Tulloch	-	-	+
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	+	-	-
<i>Penicillium chalabudae</i> Visagie	+	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	+	-	+
<i>Penicillium expansum</i> Link	-	+	-
<i>Penicillium restrictum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbott	-	+	-
<i>Phoma herbarum</i> Westend.	-	-	+
<i>Plectosphaerella plurivora</i> A.J.L. Phillips, A. Carlucci & M.L. Raimondo	+	-	-
<i>Psathyrella candolleana</i> (Fr.) Maire	+	-	-
<i>Thanatephorus cucumeris</i> (A.B. Frank) Donk	+	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	-	-	+
<i>Vishniacozyma victoriae</i> (M.J. Montes, Belloch, Galiana, M.D. García, C. Andrés, S. Ferrer, Torr.-Rodr. & J. Guinea) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout	+	-	-

*: 1 – источник, г. Мытищи Московская область, 3 – источники ключей Кадочка, Коломенское, г.Москва, 5 – источник, ФГБУ «ВНИИ Экология», г.Москва.



ВЫВОДЫ

1. Был проведён анализ видового состава грибов в пресноводных источниках и колодцах на территории Москвы и Московской области.
2. Пресноводные источники обладают высоким разнообразием микобиоты.
3. В воде можно обнаружить грибы, принадлежащие к отделам Ascomycota, Basidiomycota и Mucoromycota.
4. Наиболее обильно встречающимися можно назвать виды *Aspergillus flavus*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma citrinoviride*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma harzianum*, *Mucor hiemalis*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Candida zeylanoides*, *Mrakia gelida*.
5. Наибольшее разнообразие представлено видами из отдела Ascomycota порядков Eurotiomycetes и Sordariomycetes.
6. Отдел Mucoromycota представлен 4 видами, Basidiomycota - пятью.

ВЫВОДЫ

7. В пробах обнаружены дрожжевые аскомицеты, принадлежащие к порядку *Saccaromycetes*.
8. Наибольшее количество видов наблюдается в пробах, отобранных в д.Аладыно Серпуховского района и в г.Мытищи Московской области. Это может быть обусловлено регулярным посещением данных водоёмов и заносами.
9. Наименьшее количество видов выявлено в колодце в д.Тарасково Московской области, что может быть связано с изолированностью и закрытостью колодца.
10. Наибольшее количество КОЕ/л пробы обнаружено в воде из источника в парке Коломенское в г.Москва.
11. Наименьшее количество КОЕ/л обнаружено в источнике на территории ФГБУ «ВНИИ Экология» и в колодце в д.Тарасково.
12. Воду из всех мест отбора проб следует употреблять с осторожностью и подвергать предварительному кипячению. Желательно воздержаться от употребления воды из источников, которые являются часто посещаемыми или расположены возле трассы.