

ГРИБНОЕ СООБЩЕСТВО КОМПоста И ЕГО ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ПРОХОЖДЕНИИ ЧЕРЕЗ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫЙ ТРАКТ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *EISENIA FETIDA*

© 2019 г. А. В. Кураков^{1,*}, Сун Фуцянь², С. А. Харин^{3,**}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

² Хэйлунцзянский университет, 201203 Харбин, Китай

³ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия

*e-mail: kurakov57@mail.ru

**e-mail: info@imbp.ru

Поступила в редакцию 24.03.2018 г.

После доработки 25.04.2018 г.

Принята к публикации 29.05.2018 г.

Методами посева на глюкозо-пептонный агар, люминесцентной микроскопии (с калькофлюором и флюоресцеин-диацетатом) и на основе динамики появления колоний грибов на среде (подход Хаттори) охарактеризовано влияние на микроскопические грибы компоста процесса их прохождения через пищеварительный тракт червей *Eisenia fetida*. Различий в численности колониеобразующих единиц грибов в потребляемом *E. fetida* компосте, содержимом кишечника и копролитах не обнаружено. При микроскопировании установлено, что общая и жизнеспособная биомасса мицелия в пищеварительном тракте червей и копролитах меньше на 30–50%, чем в компосте. Физиологическая активность грибов (продолжительность лаг-фазы и вероятность размножения), разнообразие и выравненность видов по относительному обилию также были ниже в содержимом пищеварительного тракта и копролитах в сравнении с компостом. Обилие многих представителей родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* и *Trichoderma*, видов *Chaetomium globosum*, *Coprinus* sp. и *Macrolepiota* sp. стало меньше, а таких таксонов как *Dipodascus geotrichum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor* spp. и стерильных форм мицелия — больше в содержимом пищеварительного тракта, чем в потребляемом субстрате. В копролитах преобладали грибы порядка *Mucorales*, увеличилось по сравнению с содержимым кишечника обилие видов родов *Trichoderma* и *Fusarium*, некоторых представителей рода *Aspergillus*, *Cephalotrichum stemonitis*, уменьшилось — *Dipodascus geotrichum*, стерильных форм мицелия. Таким образом, при прохождении профагул грибов с компостом через *Eisenia fetida* меняется состав и относительное обилие многих видов, снижается их разнообразие, биомасса и активность в содержимом пищеварительного тракта и односточных копролитах.

Ключевые слова: биомасса, вермикомпостирование, видовой состав, микроскопические грибы, физиологическая активность, *Eisenia fetida*

DOI: 10.1134/S0026364819040068

ВВЕДЕНИЕ

Представитель эпигейной группы дождевых червей *Eisenia fetida* Savigny широко используется при вермикомпостировании. В результате деятельности этих червей измельчаются и перемещаются компостируемые субстраты, формируются копролитные агрегаты, повышается их аэрированность, содержание обменного и водорастворимого кальция, активность минерализации и нитрификации, снижается концентрация газообразных продуктов анаэробных процессов (Barois et al., 1986; Lavelle et al., 1995; Sinha Rajiv et al., 2010; Blouin et al., 2013). На состав и активность грибов в компосте должны влиять как изменение его физико-химических свойств, условий обитания, так и пря-

мое воздействие при прохождении через пищеварительный тракт животных. В большинстве работ изучали изменение состава и численности грибов в ходе вермикомпостирования (Edwards et al., 1988; Schönholzer et al., 1999). Крайне редко оценивали непосредственное воздействие пассажа грибов через пищеварительный тракт дождевых червей на их разнообразие, биомассу и физиологическую активность (Schönholzer et al., 1999; Parthasarathi et al., 2007; Kurakov et al., 2016).

Для микроорганизмов в пищеварительном тракте дождевых червей имеются благоприятные условия по обеспеченности питательными веществами, водой и диапазон рН, способствующие их размножению (Barois et al., 1986). В то же время

механическое воздействие и переваривание микроорганизмов под действием ферментов должны уменьшать их видовое разнообразие и обилие (Devliegher et al., 1995). Показано, что бактерии, попадающие с органическим веществом в пищеварительный тракт дождевых червей, подвергаются своеобразному селективному отбору (Munnoli et al., 2010). Некоторые из них активно размножаются при продвижении через кишечник, численность других остается без изменений, а некоторые из них перевариваются (Albasha et al., 2014; Aira et al., 2016). Такая трофическая избирательность приводит, например, к 98%-му снижению популяции колиформных бактерий, в частности *Escherichia coli*. При этом уменьшение бактериальной биомассы (оцененной по углероду) в кишечнике не происходит. Исследований в этом направлении с грибами проведено значительно меньше (McLean et al., 1998; Tiunov et al., 2000; Vamidele et al., 2014; Kurakov et al., 2016). Цель данной работы — выяснение влияния на состав, биомассу и физиологическое состояние грибов их прохождения через пищеварительный тракт *Eisenia fetida*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили с навозными червями *E. fetida*, отобранными на конюшне центральной усадьбы Центрально-Лесного государственного биосферного заповедника (Тверская обл.). Червей (по 10–15 особей на 100 г субстрата) содержали в пластмассовых ваннах с предварительно выдержанным, компостировавшимся в течение 2,5 месяца конским навозом. В него были добавлены древесные опилки, известь (CaCO_3) и песок. Вермикомпостирование с *E. fetida* проводили при влажности 70% от полной влагоемкости и температуре 18–20°C.

Отбор образцов содержимого кишечника, очищенного пищеварительного тракта и потребляемого субстрата (компоста) проводили в 5-кратной повторности после 3-недельного обитания в нем *E. fetida*. Образцы копролитов получали, выдерживая червей в чашках Петри на увлажненной стерильной фильтровальной бумаге при температуре 4–5°C в течение нескольких часов.

Очищение пищеварительной системы червей от содержимого проводили в стаканчиках на 100 мл со стерильным песком в течение 5–7 дней (по 3–5 червей на стакан). Черви пропускали песок, освобождая кишечник от старой пищи. Просмотр пищевого тракта такого червя через световой микроскоп позволял контролировать его освобождение от компостируемых субстратов. Для извлечения пищеварительного тракта и его содержимого червей умерщвляли, погружая в кипяток на 1 секунду. Червь размещался на морозильном столике (элемент Пелтье), где охлаждался до –16°C за 20–30 сек. Далее производили вскрытие червя и в мо-

мент размораживания извлекали пищеварительный тракт и его содержимое. Пищеварительный тракт в ряде опытов разделяли на четыре отдела: глотка и желудок, задний, средний, передний отделы кишечника.

Численность грибов и их состав определяли методом посева водных разведений на глюкозо-пептонный агар со стрептомицинсульфатом. Посевы проводили в 5-кратной повторности образцов и 3-кратной повторности чашек Петри из 2-х разведений. Для описания структуры грибного сообщества использовали показатель относительного обилия (доля изолятов конкретного вида от общего числа всех изолятов из данного местообитания). Видовое разнообразие грибов характеризовали индексами разнообразия Шеннона и выравненности Пиелу (Kurakov, 2001), а для оценки различий или близости их биоты в изучаемых местообитаниях применяли двухфакторный анализ методом главных компонент. Современное таксономическое положение видов дано по базам данных: The MycoBank Fungal databases (MycoBank, 2019) и Index Fungorum (2019).

Грибы идентифицировали по культурально-морфологическим признакам по рекомендуемым определителям (Ellis, 1971; Booth, 1977; Kirilenko, 1978; Hoog de et al., 2000; Klich, 2002; Domsch et al., 2007; Samson et al., 2011; Samson et al., 2011), а также на основе полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием ампликонов и анализом сиквенсов (GenBank Data system: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Для определения длины грибных гиф, числа спор и клеток бактерий применяли люминесцентную микроскопию. Грибные гифы и споры окрашивали диацетатом флюоресцеина (для оценки живого мицелия и спор) или калькофлюором белым (общий мицелий и споры), бактериальные клетки — акридином оранжевым. При расчетах массу 1 м грибной гифы диаметром 5 мкм принимали равной 3.9×10^{-6} г, споры диаметром 5 мкм — 1×10^{-11} г, сухой бактериальной клетки объемом 0.1 мкм^3 — 2×10^{-14} г (Kozhevnikov, 1989).

Для выяснения физиологического состояния грибных популяций в местообитаниях, связанных с дождевыми червями, использовали подход, предложенный Хаттори для оценки активности бактерий в почве и водных средах (Hattori, 1982). Ранее нами была показана его применимость для характеристики физиологического состояния грибов в разных местообитаниях, в том числе ассоциированных с дождевыми червями (Kharin et al., 2014). Суть метода состоит в анализе расписания появления колоний на плотных питательных средах. Для этого после посева периодически учитывают число вновь образовавшихся колоний. Динамика появления колоний описывается экспоненциальным уравнением: $N(t) = N_{\infty}[1 - \exp(-\lambda(t - t_r))]$, где

$N(t)$ – число колоний к данному моменту времени t ; N_{∞} – финальное число колоний; λ – вероятность образования колоний отдельной клеткой в единицу времени; t_r – время задержки (включающее в себя лаг-период и время до образования колонии, видимой невооруженным глазом). Условие возможности использования данного уравнения – соответствие расписания появления колоний на твердых средах распределению Пуассона, что было подтверждено в экспериментах с чистыми культурами для микромицетов, интродуцированных в стерильную почву, и для грибов в нативных почвах (Kharin et al., 2014). Значение t_r и λ определяли методом наименьших квадратов.

Опыты проведены в 3-кратной повторности. Статистическую обработку результатов и оценку достоверности различий средних значений проводили по критерию Стьюдента для уровня вероятности не менее 95% с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Численность грибов в компосте, содержимом кишечника и копролитах *E. fetida* была сходной,

немного выше она была в 3-суточных копролитах, чем потребляемом червями субстрате:

Субстрат	КОЕ/г $\times 10^5$
Компост	4.4 \pm 1.2
Содержимое кишечника	6.4 \pm 2.9
Копролиты	6.2 \pm 0.1

Посевы из разных отделов пищеварительного тракта не выявили заметных различий численности КОЕ грибов по мере их прохождения с компостом через *E. fetida*:

КОЕ/отдел пищеварительного тракта $\times 10^3$	
желудок	2.2 \pm 1.0
передний кишечник	3.2 \pm 1.3
средний кишечник	2.6 \pm 1.6
задний кишечник	2.4 \pm 1.3

Метод микроскопирования показал наличие достоверных измерений в биомассе грибов при их пассаже через пищеварительную систему *E. fetida*:

Биомасса (мг/г субстрата)	Краситель*	Компост	Содержимое кишечника	Пустой пищеварительный тракт	Копролиты
Грибной мицелий	КФ	3.4 \pm 0.5	2.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	1.9 \pm 0.3
	ФДА	2.7 \pm 0.5	1.5 \pm 0.2	0.3 \pm 0.0	1.8 \pm 0.2
Бактерии ($\times 10^{-2}$)	АО	12.2 \pm 2.6	8.8 \pm 3.4	5.3 \pm 2.8	11.4 \pm 5.1

*КФ – калькофлюор белый, ФДА – флюоресцеин диацетат, АО – акридин оранжевый, количество спор было низким во всех вариантах, и эти данные не приводятся.

Содержание мицелия уменьшилось в пищеварительном тракте на 35–55% и было на 33–56% ниже в копролитах, чем в потребляемом субстрате. Минимальное его количество было в очищенном пищеварительном тракте червей, на порядок ниже, чем в исходных и поглощенных им субстратах и копролитах. Сходные отличия обнаружены в биомассе бактерий: она была ниже в содержимом кишечника и пустом пищеварительном тракте. Но резко возростала в копролитах (в отличие от грибной биомассы) до уровня в исходном потребляемом червями компосте.

Использование одновременно калькофлюора белого и флюоресцеиндиацетата позволили сравнить изменение общей и жизнеспособной биомассы мицелия при прохождении через пищеварительный тракт *E. fetida*. Оно было сходным, но ясно прослежено, что количество живого мицелия снизилось в содержимом кишечника в значительно большей степени (на 55%), чем общего мицелия (на 35%), по сравнению с исходным субстра-

том. Поэтому если в потребляемом компосте доля живого мицелия составляла 80% от его общего количества, то в содержимом кишечника и пустом пищеварительном тракте была 68 и 44%, соответственно. Рост грибов быстро активизируется при инкубации копролитов, и доля живого мицелия в копролитах достигает 95% от общего количества. Это могло быть связано также и с тем, что при пассаже через пищеварительный тракт основная часть мертвого мицелия была разрушена.

На основе анализа динамики появления колоний в посевах были рассчитаны значения показателя вероятности размножения (λ) и периода лаг-фазы для грибов в изучаемых местообитаниях:

	Компост	Содержимое кишечника	Копролиты
t_r (ч)	29.2	30.9	37.1
λ (ч ⁻¹)	0.035	0.025	0.015

Величина λ была максимальной для микобиоты потребляемого червями компоста, и уменьшалась для грибов содержимого пищеварительного тракта и копролитов. Значения лаг-фазы (t_l) для грибов в этом ряду эконисш, напротив, росли. То есть физиологическое состояние грибов снижается при прохождении через пищеварительный тракт *E. fetida*.

В составе и структуре грибных сообществ компоста, содержимого кишечника и копролитов имеются заметные различия (табл. 1). В компосте преобладали виды родов *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *A. sclerotiorum* и ряд других) и *Eurotium repens* (суммарное относительное обилие 45.5%), порядка *Mucorales* (*Absidia glauca*, *Actinomucor elegans*, *Mucor hiemalis*, *M. racemosus*, *Mucor* sp., *Rhizopus arrhizus* — суммарное относительное обилие 6.5%), *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. koningi*, *T. viride*, *Trichoderma* sp. — суммарное относительное обилие 5%), *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. griseoroseum*, *P. olsonii*, *Penicillium* spp.) и *Talaromyces* (*T. purpureogenus*, *T. funiculosus*) (суммарное относительное обилие 5%), *Cladosporium* (*C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum* суммарное относительное обилие 4%), *Dipodascus geotrichum* и виды в форме стерильного светлого мицелия — суммарное относительное обилие 13%. Часто обнаруживали *Chaetomium globosum*, виды рода *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *Fusarium* sp.) и реже *Acremonium murorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Acrostalagmus luteoalbus*, *Verticillium epiphytum*, виды родов *Ulocladium*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces*, *Humicola*, агарикоидные базидиомицеты родов *Coprinus* и *Macrolepiota*. Состав и структура биоты грибов в содержимом кишечника *Eisenia fetida* претерпела заметные изменения. В нем по сравнению с компостом достоверно снизилось относительное обилие видов родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Chaetomium globosum*, *Coprinus* sp. и *Macrolepiota* sp. Число видов, представленных стерильным светлоокрашенным мицелием, *Dipodascus geotrichum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus arrhizus* и рода *Mucor* возросло, большинства других грибов — не изменилось. Микобиота в копролитах отличалась от содержимого кишечника *Eisenia fetida*. Обилие видов родов *Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Cephalotrichum stemonitis*, некоторых аспергиллов (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*) увеличилось, родов *Mucor*, *Penicillium*, *Paecilomyces variotii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ulocladium* sp. — практически не изменилось, *Absidia glauca*, *Dipodascus geotrichum*, видов, представленные стерильным светлым мицелием, *Cladosporium* (*C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*) — уменьшилось, а многие виды (*Verticillium epiphytum*, *Acrostalagmus luteoalbus*, *Actinomucor elegans*, *Aspergillus candidus*, *A. sclerotiorum*, *Coprinus* sp. и *Macrolepiota* sp.) в нем не были обнаружены.

В копролитах существенно выше в сравнении с исходным потребляемым субстратом обилие представителей родов *Trichoderma*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Cephalotrichum stemonitis*, а меньше — видов родов *Acremonium*, *Aspergillus* (табл. 1). В микобиоте при пассаже компоста через *Eisenia fetida* не изменилось содержание темноокрашенных грибов родов *Alternaria*, *Humicola*, *Ulocladium*, но существенно возросло для *Cephalotrichum stemonitis* и снизилось для *Cladosporium cladosporioides* и *C. sphaerospermum*.

Видовое богатство и разнообразие грибов существенно уменьшилось, а степень доминирования видов, напротив, возросла при прохождении компоста через пищеварительный тракт. Об этом свидетельствуют значения индексов видового разнообразия Шеннона и выровненности Пиелу для грибных сообществ в потребляемом червями компосте, содержимом кишечника и копролитах:

	Компост	Содержимое кишечника	Копролиты
1	43	40	32
2	3.47	3.11	2.46
3	0.92	0.84	0.71

1 — видовое богатство (число видов), 2 — индекс разнообразия Шеннона, 3 — индекс выровненности Пиелу.

При прохождении грибов через пищеварительный тракт червей их судьба может быть различной — гибель и переваривание мицелия и спор одних видов, ингибирование или активация их прорастания других, фрагментация мицелия, десорбция грибных пропагул с органоминеральных частиц, дезинтеграция спор. Нельзя исключать и способность грибов к быстрому размножению, например, почкование у дрожжей. Каково влияние каждого из этих факторов во многом не известно, а их действие разнонаправленно.

Достоверных различий в численности КОЕ грибов в потребляемом *Eisenia fetida* компосте, содержимом пищеварительного тракта и копролитах обнаружено не было. Однако прямая микроскопия образцов показала, что биомасса общего и живого мицелия грибов уменьшается при прохождении компоста через пищеварительный тракт *E. fetida*. Снижение запасов жизнеспособного мицелия было более значимым в содержимом пищеварительного тракта *E. fetida* — представителя эпигейных червей, чем у червей других эколого-трофических групп (*Lumbricus terrestris* и *Aporectodea caliginosa*) (Kurakov et al., 2016). Уменьшение количества мицелия на 30–50% после прохождения потребляемого субстрата через пищеварительный тракт дождевых червей указывает, что грибы для них — существенный источник питания.

Грибы содержимого кишечника и копролитов имеют более продолжительный период лаг-фазы

Таблица 1. Видовой состав и обилие микроскопических грибов в компосте, содержимом кишечника и копролитах *Eisenia fetida*

Таксон	Компост	Содержимое кишечника	Копролиты
	обилие, %		
<i>Absidia glauca</i> Hagem**	1.5	1	—*
<i>Actinomucor elegans</i> (Eidam) C.R. Benj. et Hesselt.**	1.5	0.1	—
<i>Acremonium</i> [<i>A. murorum</i> (Corda) W. Gams**, <i>Acremonium</i> sp.]	2	—	1
<i>Alternaria</i> [<i>A. alternata</i> (Fr.) Keissl., <i>A. brassicicola</i> (Schwein.) Wiltshire**, <i>A. tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire**]	0.5	1	1
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	24	4	18
<i>A. candidus</i> Link**	2.5	0.5	—
<i>A. niger</i> Tiegh.	3	0.5	5
<i>A. flavus</i> Link	3	0.1	1
<i>A. sclerotiorum</i> G.A. Huber**	3	0.5	—
<i>A. terreus</i> Thom	4	3	5
<i>A. ustus</i> (Bainier) Thom et Church	2	—	1
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	3	0.5	1
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze**	3	0.5	—
<i>Cladosporium</i> [<i>C. cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries, <i>C. sphaerospermum</i> Penz.]	4	2	0.5
<i>Coprinus</i> sp.**	1	0.5	—
<i>Cephalotrichum stemonitis</i> (Pers.) Nees	0.1	0.1	7
<i>Eurotium repens</i> de Bary**	1	0.5	—
<i>Fusarium</i> [<i>F. oxysporum</i> Schltdl., <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc., <i>Fusarium</i> sp.]	3	1	7
<i>Graphium</i> sp.	1.5	—	0.5
<i>Humicola</i> sp.	1	0.1	0.5
<i>Macrolepiota</i> sp.**	1	0.5	—
<i>Mortierella</i> sp.	1.5	0.5	—
<i>Mucor</i> [<i>M. hiemalis</i> Wehmer**, <i>M. racemosus</i> Fresen.**, <i>Mucor</i> sp.]	3	10	7
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	1	4	3.5
<i>Penicillium</i> [<i>P. chrysogenum</i> Thom, <i>P. griseoroseum</i> Dierckx, <i>P. olsonii</i> Bainier et Sartory**, <i>Penicillium</i> spp.]	5	4	3
<i>Talaromyces</i> [<i>T. purpureogenus</i> Samson, N. Yilmaz, Houbraken, Spierenb., Seifert, Peterson, Varga et Frisvad, <i>T. funiculosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert]			
<i>Rhizopus arrhizus</i> A. Fisch., in Winter**	0.5	2	4.5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary**	1.5	0.5	1.5
<i>Trichoderma</i> [<i>T. harzianum</i> Rifai, <i>T. koningi</i> Oudem., <i>T. viride</i> Pers., <i>Trichoderma</i> sp.**]	5	1	12
<i>Verticillium</i> [<i>V. epiphytum</i> Hansf.**, <i>Acrostalagmus luteoalbus</i> (Link) Zare, W. Gams et Schroers]	1	0.5	—
<i>Dipodascus geotrichum</i> (E.E. Butler et L.J. Petersen) Arx и виды, представленные стерильным светлым мицелием	13	55	14
<i>Microascus brevicaulis</i> S.P. Abbott in Abbott, Sigler et Currah	1.5	2	—
<i>Ulocladium</i> sp.	1.5	1	1

Примечание. *Организм не обнаружен или его обилие было ниже 0.05%. **Идентифицирован по 28S рДНК (D1/D2 домен).

и меньшие значения показателя вероятности размножения — λ , чем в потребленном *Eisenia fetida* компосте. Сходные различия установлены в физиологическом состоянии грибов при их прохождении с почвой и растительными остатками через пищеварительный тракт *Lumbricus terrestris* и *Aporectodea caliginosa* (Kharin et al., 2014; Kurakov et al., 2016). Вместе с тем, воздействие *Eisenia fetida* на физиологическую активность грибов было более сильным, чем дождевых червей *Aporectodea caliginosa* и *Lumbricus terrestris*. Длительный лаг-период и низкая вероятность размножения у грибов сохранялись дольше в копролитах *Eisenia fetida*, чем у *Aporectodea caliginosa* и *Lumbricus terrestris*. Об уменьшении микробной активности в кишечном тракте *L. terrestris* свидетельствуют значения метаболического коэффициента микробной биомассы (qCO_2), которые в пищеварительном тракте ниже на 35%, чем в потребляемом им субстрате (Devliegher et al., 1995). При переработке свиного навоза с использованием *Eisenia fetida* также наблюдали уменьшение микробной биомассы и микробной активности (дыхания, субстратиндуцированного дыхания и дегидрогеназы) в верми-компосте (Aira et al., 2002).

Снижение физиологической активности грибов в пищеварительном тракте дождевых червей обусловлено, помимо механического разрушения пропагул и мицелия, ферментами и киллерными соединениями. В их пищеварительном тракте установлена активность липазы, хитиназы, протеазы, амилазы, а у некоторых видов — целлюлазы (Zhang et al., 1993; Lattaud et al., 1999; Vamidele et al., 2014). Пищеварительная жидкость *Aporectodea caliginosa*, *Eisenia fetida* и *Lumbricus terrestris* обладает киллерным действием в отношении бактерий и дрожжей, а *A. caliginosa* также в отношении мицелиальных грибов (Byzov et al., 2004, 2007; Khomyakov et al., 2007; Kurakov et al., 2015). Мицелий штаммов *Trichoderma harzianum* и *Penicillium decumbens* Thom терял жизнеспособность после инкубации в пищеварительной жидкости *A. caliginosa* в течение 1–2 мин, у ряда видов снижалась линейная скорость роста (Kurakov et al., 2015). Прорастание спор штаммов *Aspergillus niger*, *A. terreus* и *Purpureocillium lilacinum* практически полностью подавлялось при кратковременном воздействии его пищеварительной жидкости. Это свидетельствует о наличии в ней киллерного соединения, обладающего острым токсическим действием. Гибель мицелия, подавление прорастания спор многих видов и снижение их скорости роста согласуется со снижением физиологической активности грибов в пищеварительном тракте червя.

Видовое богатство, разнообразие и выровненность относительного обилия видов в сообществе грибов уменьшается в содержимом пищеварительного тракта и копролитах *Eisenia fetida* по сравнению с компостом. Сходные изменения в

микобиоте происходили при прохождении почвы через пищеварительный тракт *Aporectodea caliginosa* и *Lumbricus terrestris* (Kurakov et al., 2016). В содержимом пищеварительного тракта *Eisenia fetida* снизилось относительное обилие видов родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* и видов *Chaetomium globosum*, *Coprinus* sp. и *Macrolepota* sp. — видов, представленных стерильным светлоокрашенным мицелием, *Dipodascus geotrichum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus arrhizus*, рода *Mucor* возросло, обилие других — не изменилось. В копролитах доминировали по обилию грибы порядка *Mucorales*, в них возросло обилие представителей рода *Trichoderma*, *Fusarium*, *Cephalotrichum stemonitis*, ряда видов рода *Aspergillus*, а представленных стерильным светлым мицелием и *Dipodascus geotrichum* — уменьшилось. МакЛин и Паркинсон (McLean et al., 1998) также наблюдали повышение обилия быстро растущих видов рода *Trichoderma* в присутствии эпигейного дождевого червя *Dendrobaena octaedra* в подстилке в сосновом лесу, как это было в наших опытах с *Aporectodea caliginosa*, *Lumbricus terrestris* и *Eisenia fetida*. Есть мнение, что темноокрашенные грибы чувствительны к воздействию среды пищеварительного тракта червей, что ведет к уменьшению их численности в копролитах (Тупнов et al., 2000). Согласно полученным нами данным при прохождении почвы через пищеварительный тракт *Lumbricus terrestris* и *Aporectodea caliginosa* уменьшается численность темноокрашенных микромицетов родов *Humicola*, *Ulocladium* и *Alternaria* в пищеварительном тракте и копролитах, но возрастает обилие представителей рода *Cladosporium* и *Cephalotrichum stemonitis* (Kurakov et al., 2016). При пассаже компоста через *Eisenia fetida* содержание темноокрашенных грибов родов *Alternaria*, *Humicola*, *Ulocladium* не изменилось, существенно возросло *Cephalotrichum stemonitis* и снизилось у *Cladosporium*. Есть наблюдение, что *Cladosporium cladosporioides* привлекал *Eisenia fetida* как источник пищи в отличие от *Aspergillus niger* (Marfenina et al., 1997).

Следует отметить несколько важных аспектов в изменении состава микобиоты при пассаже через дождевых червей. В копролитах *Eisenia fetida* относительное обилие большинства видов рода *Aspergillus* снижалось или достоверно не изменялось, но ряд потенциально опасных аспергиллов сохранял высокое обилие. Таким образом, вопрос о том, насколько вермикультура может улучшить санитарно-эпидемиологические характеристики компоста, требует дальнейшего исследования. Важно акцентировать внимание на возможность всплеска развития грибов и повышении обилия таких видов уже через несколько суток инкубации вермикомпоста, особенно, если субстрат не был окончательно переработан червями. Увеличение обилия представителей рода *Trichoderma* в копролитах, наряду с таковым бактерий, стимулирую-

щими рост растений, и поступлением физиологически-активных метаболитов с экскретами червей связывают супрессивность вермикомпоста к фитопатогенам и его фитостимулирующие свойства (Sinha Rajiv et al., 2010; Sadykova et al., 2013). Неоднократно отмечали накопление в копролитах гумусовых веществ (Kurcheva, 1971; Kozlovskaya, 1976). Это может быть обусловлено тем, что в пищеварительном тракте червей благодаря фрагментации и измельчению клеточных стенок меланин-содержащих грибов, разрыву связи меланинов с белками и другими соединениями, меланины, которые по строению и свойствам сходны с гуминовыми кислотами, в большем количестве накапливаются в содержимом пищеварительного тракта и копролитах дождевых червей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Видовой состав, биомасса и активность грибов существенно меняется при их прохождении через пищеварительный тракт червей *Eisenia fetida*. На 30–50% уменьшилась биомасса общего и жизнеспособного мицелия в пищеварительном тракте червей и копролитах. Видовое разнообразие и физиологическая активность грибов (продолжительность лаг-фазы и вероятность размножения) также были ниже в содержимом пищеварительного тракта и копролитах, чем в потребляемом червями компосте. Характер этих изменений сходен с таковыми в микобиоте при прохождении через пищеварительную систему других дождевых червей (*Lumbricus terrestris* и *Aporectodea caliginosa*) (Kurakov et al., 2016). Наряду с этим изменение плотности популяций конкретных видов, их относительное обилие в пищеварительном тракте и копролитах, по сравнению с пищевым субстратом, при наличии определенных сходств, нередко заметно различается у разных червей. Это может быть обусловлено трофическими особенностями животных, различием в исходной плотности популяций разных таксонов грибов в потребляемом субстрате, устойчивостью их клеточных стенок к ферментам и киллерным соединениям, механическим воздействиям в пищеварительном тракте и способностью к размножению при нахождении в нем.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-25073мк.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aira M., Monroy F., Domínguez J., Salustiano Mato S. How earthworm density affects microbial biomass and activity in pig manure. *Eur. J. Soil Biology*. 2002. V. 38. P. 7–10. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01116-5](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01116-5)
- Aira M., Olcina J., Pérez-Losada M., Domínguez J. Characterization of the bacterial communities of casts from *Eisenia andrei* fed with different substrates. *Appl. Soil Ecol.* 2016. V. 98. P. 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.10.002>
- Albasha M.O., Gupta P., Ramteke P.W. Isolation of microflora in earthworms guts from different substrates. *Amer. J. Agric. Forestry*. 2014. V. 4. P. 206–208. <https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20140204.24>
- Bamidele J., Idowu A., Ademolu K., Atayese A. Microbial diversity and digestive enzyme activities in the gut of earthworms found in sawmill industries in Abeokuta, Nigeria. *Int. J. Trop. Biol.* 2014. V. 62(3). P. 1241–1249.
- Barois I., Lavelle P. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (*Glossoscolecidae*, *Oligochaeta*). *Soil Biol. Biochem.* 1986. V. 18 (5). P. 539–541.
- Blouin M., Hodson M.E., Delgado E.A., Baker G., Brussaard L., Butt K.R., Dai J., Dendooven L., Peres G., Tondoh J.E., Cluzeau D., Brun J.J. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Europ. J. Soil Sci.* 2013. V. 64. P. 161–182. <https://doi.org/10.1111/ejss.12025>
- Booth C. *Fusarium. Laboratory Guide to the Identification of the Major Species*. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, 1977.
- Byzov B.A., Khomyakov N.V. The microbicidal activity of the earthworm gut extracts. Abstracts XIVth International colloquium on soil zoology and eology. Mont Saint Aignan, 2004. P. 120.
- Byzov B.A., Khomyakov N.V., Kharin S.A., Kurakov A.V. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. *Eur. J. Soil Biology*. 2007. V. 43. P. 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.012>
- Devliegher W., Verstraete W. *Lumbricus terrestris* in a soil core experiment: nutrient-enrichment processes (NEP) and gut-associated processes (GAP) and their effect on microbial biomass and microbial activity. *Soil Biol. Biochem.* 1995. V. 27. P. 1573–1580.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. *Compendium of soil fungi*. Second edition revised by W. Gams. IHW-Verlag, Verlagsbuchhandlung, 2007.
- Edwards C.A., Fletcher K.E. Interactions between earthworms and microorganisms in organic matter breakdown. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 1988. V. 24 (1–3). P. 235–247. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(88\)90069-2](https://doi.org/10.1016/0167-8809(88)90069-2)
- Ellis M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, 1971.
- Hattori T. Mathematical equations describing the behaviour of soil bacteria. *Soil. Biol. Biochem.* 1982. V. 14. P. 523–527. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90113-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90113-4)
- Hoog de G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. *Atlas of clinical fungi*. 2nd edition. Universitat Rovira i Virgili: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2000.
- Index Fungorum*. 2019. <http://www.indexfungorum.org>. Accessed 25.01.2019.
- Kharin S.A., Kurakov A.V. Characterization of the physiological state of Fungi by dynamics of Colony Emergence on Solid Media. *Microbiologiya*. 2014. V. 83 (1). P. 83–89. <https://doi.org/10.1134/S0026261714010056>
- Khomyakov N.V., Kharin S.A., Byzov B.A., Zvyagintsev D.G., Nechitailo T.Yu., Golyshin P.N., Kurakov A.V. Reaction of microorganisms to the digestive fluid of earthworms.

- Mikrobiologiya. 2007. V. 76 (1). P. 45–54.
<https://doi.org/10.1134/S0026261709030151>
- Kirilenko T.S. Determinant of soil marsupial fungi. Kiev, Naukova dumka, 1978 (in Russ.).
- Klich M.A. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.
- Kozhevina P.A. Microbial populations in nature. Moskva, 1989 (in Russ.).
- Kozlovskaya L.S. Role of soil invertebrates in the transformation of the organic matter of bog soils. Moskva, Nauka, 1976 (in Russ.).
- Kurakov A.V. Methods of isolation and characteristics of the structure of microscopic fungi complexes of terrestrial ecosystems. Moskva, Maks Press, 2001 (in Russ.).
- Kurakov A.V., Kharin S.A. Interaction of fungi and earthworms. Proceedings of the VII All-Russian mycological school-conference with international Participation Moskva, 2015 (in Russ.).
- Kurakov A.V., Kharin S.A., Byzov B.A. Changes in the composition and physiological and biochemical properties of fungi during passage through the digestive tract of earthworms. Biology Bull. 2016. V. 43 (4). P. 290–299. <https://doi.org/10.1134/S1062359016040075>
- Kurcheva G.F. Role of soil animals in the decomposition and humification of plant residues. Moskva, Nauka, 1971 (in Russ.).
- Lattaud C., Mora P., Garvín M., Locatil S., Rouland C. Enzymatic digestive capabilities in geophagous earthworms – origin and activities of cellulolytic enzymes. Pedobiologia. 1999. V. 43. P. 842–850.
- Lavelle P., Lattaud C., Trigo D., Barois I. Mutualism and biodiversity in soils. In: H.P. Collins (eds). The significance and regulation of soil biodiversity. Amsterdam, Kluwer Academic Publisher, 1995. P. 23–33.
- Marfenina O.E., Ishchenko I.A. Preference of earthworms for soil microscopic fungi. Biology Bull. 1997. V. 24 (4). P. 414–416.
- McLean M.A., Parkinson D. Impacts of the epigeic earthworm *Dendrobaena octaedra* on microfungus community structure in pine forest floor – a mesocosm study. Appl. Soil Ecol. 1998. V. 8. P. 61–75. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(97\)00067-X](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(97)00067-X)
- Munnoli P.M., Teixeira da Silva J.A., Bhosle S. Dynamics of the soil-earthworm-plant relationship. Vermitechnology. 2010 V. 1. P. 1–21.
- Mycobank Fungal databases. 2019. <http://www.mycobank.org/>. Accessed 25.01.2019.
- Parthasarathi K., Ranganathan L.S., Anandi V., Zeyer J. Diversity of microflora in the gut and casts of tropical composting earthworms reared on different substrates. J. Environm. Biology. 2007 V. 28 (1). P. 87–97.
- Sadykova V.S., Kurakov A.V. Prospects of using the strains of genus *Trichoderma* for getting vermicomposts with fungicide and growth stimulating properties. Doklady Rossiyskoy akademii selskokhozyaystvennykh nauk. 2013. V. 2. P. 37–40. <https://doi.org/10.3103/S106836741303018X>
- Samson R.A., Houbraken J. Phylogenetic and taxonomic studies on the genera *Penicillium* and *Talaromyces*. Stud. Mycol. 2011. V. 70. P. 183.
- Samson R.A., Varga J., Frisvad J.C. Taxonomic studies on the genus *Aspergillus*. Studies in Mycol. 2011. V. 69. P. 96.
- Schönholzer F., Hanh D., Zeyer J. Origins and fate of fungi and bacteria in the gut of *Lumbricus terrestris* L. studied by image analysis. FEMS Microbial Ecol. 1999. V. 28 (3). P. 235–248.
- Sinha Rajiv K., Agarwal S., Chauhan K., Chandran V., Soni Brijal K. Vermiculture technology: reviving the dreams of sir Charles Darwin for scientific use of earthworms in sustainable development programs. Technology and Investment. 2010. V. 1. P. 155–172. <https://doi.org/10.4236/ti.2010.13019>
- Tiunov A.V., Scheu S. Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L.: a laboratory experiment. Appl. Soil Ecol. 2000. V. 14. P. 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(99\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00050-5)
- Zhang B.G., Rouland C., Lattaud C., Lavelle P. Activity and origin of digestive enzymes in gut of the tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus*. Eur. J. Soil Biology. 1993. V. 29. P. 7–11.
- Кириленко Т.С. (Kirilenko) Определитель почвенных сумчатых грибов. Киев: Наукова Думка, 1978. 263 с.
- Кожевин П.А. (Kozhevina) Микробные популяции в природе. М.: Изд-во МГУ, 1989. 171 с.
- Козловская Л.С. (Kozlovskaya) Роль почвенных беспозвоночных в трансформации органического вещества болотных почв. Л.: Наука, 1976. 211 с.
- Кураков А.В. (Kurakov) Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем. М.: Макс Пресс, 2001. 89 с.
- Кураков А.В., Харин С.А. (Kurakov, Kharin) Взаимодействие грибов и дождевых червей // Материалы VII всероссийской микологической школы-конференции с международным участием “Биотические связи грибов: мосты между царствами”. М.: Изд-во СТД-Восток, 2015. С. 105.
- Кураков А.В., Харин С.А., Бызов Б.А. (Kurakov et al.) Изменение состава и физиолого-биохимических свойств грибов при прохождении через пищеварительный тракт дождевых червей. Известия РАН. Сер. Биол. 2016. № 4. С. 348–357.
- Курчева Г.Ф. (Kurcheva) Роль почвенных животных в разложении и гумификации растительных остатков. М.: Наука, 1971. 155 с.
- Марфенина О.Е., Ищенко И.А. (Marfenina, Ishchenko) Избирательность дождевых червей по отношению к почвенным микроскопическим грибам. Известия РАН. Сер. Биол. 1997. № 4. С. 504–506.
- Садькова В.С., Кураков А.В. (Sadykova, Kurakov) Перспективы использования штаммов рода *Trichoderma* для получения вермикомпостов с фунгицидными и рост стимулирующими свойствами. Доклады РАСХН. 2013. № 2. С. 37–40.
- Харин С.А., Кураков А.В. (Kharin, Kurakov) Характеристика физиологического состояния грибов по распространению появления колоний на твердых средах. Микробиология. 2014. Т. 83. № 1. С. 83–89. <https://doi.org/10.7868/S0026365614010054>
- Хомяков Н.В., Харин С.А., Нечитайло Т.Ю., Гольишин П.Н., Кураков А.В., Бызов Б.А., Звягинцев Д.Г. (Khomyakov et al.) Реакция микроорганизмов на воздействие пищеварительной жидкости дождевых червей. Микробиология. 2007. Т. 76. № 1. С. 55–65.

Fungal Community of Compost and Its Changes During the Passage Through the Digestive Tract of Earthworm *Eisenia fetida*

A. V. Kurakov^{a, #}, Sun Funciang^b, and S. A. Kharin^c

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^b Heilongjiang University, Harbin, China

^c Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[#] E-mail: kurakov57@mail.ru

Abstract—The influence of the passage through the digestive tract of the earthworm *Eisenia fetida* on microscopic fungi by application of the plating on solid nutrient medium, fluorescent microscopy and analysis of the dynamics of the appearance of colonies of fungi (the Hattori approach) was studied. The differences in the number of colony forming units of fungi in the compost is consumed, the contents of the digestive tract and fresh coprolites was not detected. It was established that the biomass of the total and alive mycelium in the contents of the digestive tract of worms and coprolites decreased by 30–50%. The physiological activity of fungi (the duration of the lag phase of the appearance of colonies and the probability of reproduction), diversity, uniformity of relative abundance of species were also less in the contents of the digestive tract and the coprolites compared with the compost. It was detected that the abundance of many representatives of the genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Trichoderma*, species of *Chaetomium globosum*, *Coprinus* sp. and *Macrolepota* sp. decreased, and *Dipodascus geotrichum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor* spp. and sterile forms of the mycelium became more in the contents of the intestine than in the consumed substrate. The fungi of the order Mucorales dominated in the fresh coprolites, the abundance of the genera *Trichoderma* and *Fusarium*, some species of the genus *Aspergillus*, *Cephalotrichum stemonitis* increased and *Dipodascus geotrichum*, sterile forms of mycelia decreased in the coprolites compared to digestive tract content. So, when the fungi composting substrate passing *Eisenia fetida*, their composition and relative abundance of species changed, the total species diversity, biomass and activity decreased in digestive tract content and 1-days coprolites.

Keywords: biomass, *Eisenia fetida*, microscopic fungi, physiological activity, species composition, vermicomposting