

УДК 582.28 + 595.142.34
ББК 40.402

Д.И. Стом
доктор биологических наук, профессор
Иркутского государственного университета, г. Иркутск
stomd@mail.ru

В.А. Быбин
младший научный сотрудник НИИ биологии при ИГУ,
г. Иркутск

А.А. Приставка
кандидат биологических наук, доцент
Иркутского государственного университета,
г. Иркутск

В.П. Саловарова
доктор биологических наук, профессор
Иркутского государственного университета, г. Иркутск

Б.Н. Огарков
доктор биологических наук, профессор
Иркутского государственного университета, г. Иркутск
Nadin_buk@mail.ru

ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДОЖДЕВЫМИ ЧЕРВЯМИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ TRICHODERMA VIRIDE

Аннотация: Рассматривается возможность обогащения кишечного тракта дождевых червей целлюлозоразрушающим штаммом микромицета - *Trichoderma viride*, а также взаимовлияние используемых организмов.

Ключевые слова: дождевые черви, целлюлоза, микроорганизмы, грибы.

D.I. Stom
Doctor of Biological Sciences, professor of
Irkutsk state university, Irkutsk
e-mail: stomd@mail.ru

V.A. Bybin
junior research scientist
Scientific research institute of biology at ISU,
Irkutsk

A.A. Pristavka
Cand. Biol. Sc., senior lecturer of
Irkutsk state university,
Irkutsk

V.P. Salovarova
Doctor of Biological Sciences, professor of
Irkutsk state university, Irkutsk

B.N. Ogarkov
Doctor of Biological Sciences, professor of
Irkutsk state university, Irkutsk

DIGESTION OF CELLULOSE BY EARTHWORMS UNDER TRICHODERMA VIRIDE

Annotation: The possibility of introduction of earthworms' intestine by cellulose-degrading fungi strain *Trichoderma viride* and interdependence of using organisms are considered

Key words: earthworms, cellulose, microorganisms, fungi

ВВЕДЕНИЕ. Сегодня в байкальском регионе остро стоит проблема переработки твердых отходов. Особенно велика доля отходов, содержащих целлюлозу. Ранее было показано усиление интенсивности трансформации загрязнителей в системе микроорганизмы-дождевые черви по сравнению с действием этих организмов по отдельности [3,6]. Поэтому можно было ожидать усиления способности дождевых червей утилизировать отходы, в частности целлюлозно-бумажной природы, при введении в микрофлору их кишечника штаммов микроорганизмов активных биодеструкторов. В этой связи изучали возможность обогащения кишечного тракта дождевых червей целлюлозоразрушающим штаммом микромицета - *Trichoderma viride*, а также взаимовлияние используемых организмов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Объектом исследования служили особи красного калифорнийского гибрида. В лаборатории червей разводили в лотках с почвой при температуре 20 – 25 °С и влажности 80 – 85 %. Животных кормили размоченной гречневой крупой. В опытах использовали половозрелых, имеющих поясковую зону червей длиной 8 – 10 см.

Штамм *T. viride* получен из коллекции д.б.н. Огаркова Б.Н. Он обладает высокой целлюлолитической активностью [1]. Для изучения сохранения *T. viride* в кишечниках дождевых червей суспензию гриба микроинъекционировали животным через ротовое отверстие с помощью инсули-

нового шприца со спиленным острием иглы. На 1-ые, 4-ые, 8-ые сутки дождевых червей вскрывали в асептических условиях с высевом содержимого отделов кишечника на среду Чапека. Для получения отделов кишечника внешние покровы червей предварительно стерилизовали промыванием в стерильной воде, 30-и секундной экспозицией в 70 % спиртовом растворе. Потом олигохет разрезали глазными ножницами вдоль тела, рассекая кожно-мышечный мешок. Вынимали отделы кишечника, перетирали их в ступке и суспензировали в физиологическом растворе. Посевы инкубировали при температуре 30 °С в течение недели. Затем производили подсчет выросших колоний [2]. Также оценивали воздействие инокуляции дождевых червей культурой грибов на иммунные свойства и выживаемость животных, влияние дождевых червей на прорастание спор *T. viride*. Изменение иммунных свойств фиксировали с помощью диско-диффузионного метода по диаметру зоны подавления роста газона тест-культуры (*Yarrowia lipolytica*) вокруг бумажного диска, пропитанного целомической жидкостью дождевых червей. Целомическую жидкость получали из целомической полости при рассечении кожно-мышечного мешка и мезентерия животных [5]. Прорастание спор грибов фиксировали после орошения засеянных спорами питательных сред водными суспензиями вермипрепаратов, полученных классическим методом [5]. Целлюлазную активность кишечного сока дождевых червей до и после интродукции триходермой измеряли по способу Мендельс-Вебера (Mandels and Weber, 1969). Физиологическую активность червей оценивали по времени их зарывания червей в почву [4]. Выводы сделаны при вероятности безошибочного прогноза $P \geq 0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ. После микроинъекции культура *T. viride* сохранялась в кишечниках дождевых червей *E. fetida* более 40 суток, с тенденцией накопления в заднем отделе кишечника (таблица 1). Данная картина говорит о возможности сохранения и даже размножения взятого штамма грибов в кишечном тракте олигохет.

Таблица 1. – Динамика титра *T. viride* при пассаже через кишечник *E. fetida*

Время экспозиции, сутки	Титр, КОЕ/г			
	T ₀ , КОЕ/мл	Отделы кишечника		
		Передний	Средний	Задний
1	1,6 Ч 10 ⁸	0,12 ± 0,01 Ч 10 ⁸	0,4 ± 0,03 Ч 10 ⁶	0
4		0,13 ± 0,01 Ч 10 ⁷	0,1 ± 0,01 Ч 10 ⁶	0,7 ± 0,1 Ч 10 ⁶
8		0,1 ± 0,02 Ч 10 ⁶	0,05 ± 0,01 Ч 10 ⁶	0,7 ± 0,05 Ч 10 ⁶

12		$0,5 \pm 0,02 \cdot 10^6$	$0,2 \pm 0,03 \cdot 10^6$	$0,6 \pm 0,03 \cdot 10^7$
40		$0,8 \pm 0,02 \cdot 10^7$	$0,7 \pm 0,03 \cdot 10^7$	$0,3 \pm 0,06 \cdot 10^8$

Споры *T. viride* не прорастали в вермипрепарате (10 мг/мл), приготовленном по традиционным прописям.

Инокуляция дождевых червей *T. viride* активировала антибиотический иммунитет животных. В частности целомическая жидкость дождевых червей, инокулированных грибом, сильнее угнетал рост газона культуры дрожжей, чем в контроле.

Следует отметить, что при некоторых условиях *T. viride* подавлял жизнедеятельность дождевых червей или даже приводил к их гибели. Это, прежде всего, зависело от титра используемой суспензии и возраста культуры. При инокуляции *per os* 0,05 мл суспензий 2-х недельной культуры с титрами порядка $10^4 - 10^5$, КОЕ/мл черви погибали в течение 2-3 суток. Более разбавленная культура с титром 10^3 КОЕ/мл приводила лишь к снижению их физиологической активности. Так в частности в 5 раз увеличивался период заползания дождевых червей в субстрат. Через неделю у инокулированных триходермой червей продолжали наблюдать отклонения от нормы, но уже противоположного характера: черви в два раза быстрее, чем в контроле убегали от света (рисунок 3).

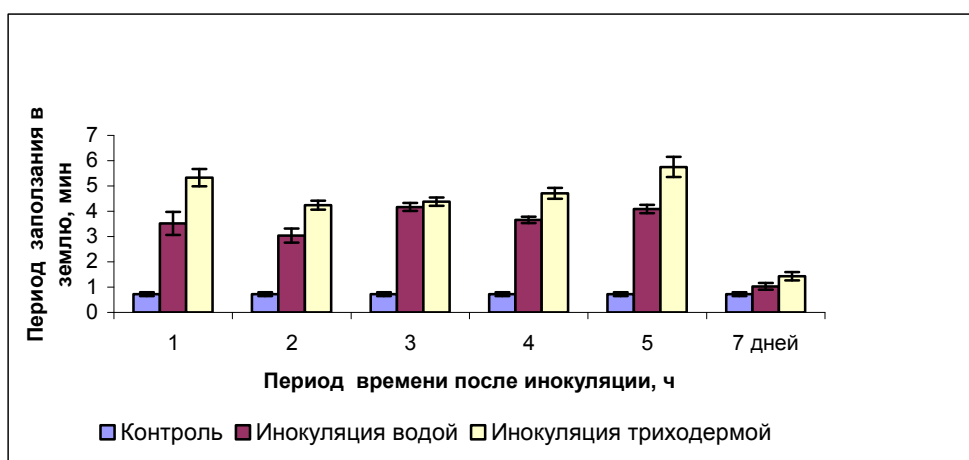


Рисунок 3. Период зарывания червей в почву

Трехсуточная культура микромицета (10^5 КОЕ/мл) не оказывала видимого влияния на червей, но скорость зарывания олигохет в почву возрастала на 25 %. При свободном скармливании гриба наблюдали увеличение удельной целлюлазной активности в кишечнике дождевых червей в 14 раз (таблица 2). Скармливание фунгицида флуканозола снижало целлюлазную активность в среднем на 20 %. Возможной причиной такого снижения активности целлюлозоразрушающих ферментов могло быть угнетение целлюлозоразрушающей аутомикрофлоры червей.

Таблица 2 – Целлюлазная активность кишечного сока дождевых червей

Кишечный сок червей	Удельная активность, МЕ/мл
Контроль	0,005 ± 0,0008
Скармливание <i>T. viride</i> , T = 2,5 Ч 10 ³ КОЕ/г почвы	0,07 ± 0,01
Скармливание фунгицида “Флуканозола”, C = 2,0 Ч 10 ⁻⁴ г/г почвы	0,004 ± 0,0007

Инокуляция *per os* 3-суточной культуры гриба (10⁶ КОЕ/мл) дождевыми червям с помощью микроинъектора интенсифицировало переваривание целлюлозы. Бумажный диск, на котором червей содержали без корма, съедали в 1,5 раза быстрее, чем в контроле (40 дней). В этом случае копролиты были более крупными, плотными, имели характерную веретеновидную форму, начинали темнеть через 2 – 3-ое суток, а спустя 15 дней чернели. В контроле копролиты имели округлую форму, что говорит о слабой их спрессованности, более белый цвет. Инокуляция червей 0,001% раствором антибиотика приводила к снижению агрегированности копролитаов, повышению рыхлости их структуры, уменьшению степени разрушения целлюлозных нитей, появлению нетипичных осколкообразных обрывков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности использования активных зоомикробных комплексов, состоящих из двух и более биодеструкторов для более эффективной утилизации конкретных отходов.

Работа выполнена частично при поддержке грантов: Роснауки ФЦП (ГК №02.740.11.0018 от 15.06.2009 г. и ГК №02.740.11.0335 от 07.07.2009 г.), а также РФФИ (08-04-98057-Сибирь_а).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Огарков Б.Н. Биотехнология на основе грибов/ Б.Н. Огарков, Г.Р. Огаркова, Л.В. Самусенок// моногр. – Иркутск: Иркут. ун-т, 2005. – 234 с.
2. Полянская Л.М., Бабкина Н.И., Зенова Г.М., Звягинцев Д.Г. Судьба актиномицетов в кишечном тракте почвенных беспозвоночных животных, поедающих споры стрептомицетов // Микробиология. - 1996. - Т.65. №4. - С. 560-565.
3. Терещенко Н.Н. Эколого-микробиологические аспекты вермикюльтивирования/ Н.Н. Терещенко. – Новосибирск: Наука, 2003. – 113 с.
4. Черных В.И., Потапов Д.С., Стом Д.И. Способ определения влияния водных эмульсий нефтепродуктов при вермикюльтивировании. – Патент N 2290801 от 2004.10.01.

5. Sun Zhenjun. Vermiculture and vermiprotein. China Agricultural University Press 2003. 367 P.

6. Stom D.I. Potapov D. S, Balayan A. E., Matveeva O. N. Transformation of Oil in Soil by a Microbial Preparation and Earthworms // Eurasian Soil Science .- Vol. 36, No. 3, 2003. - p. 329-331.