

УДК 582.28 + 595.142.34
ББК 40.402

Д.И. Стом
В.А. Быбин
А.А. Приставка
В.П. Саловарова
Б.Н. Огарков

ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДОЖДЕВЫМИ ЧЕРВЯМИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ TRICHODERMA VIRIDE*

Рассмотрена 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
V.A. Byibin
A.A. Pristavka
V.P. Salovarova
B.N. Ogarkov

DIGESTION OF CELLULOSE BY EARTHWORMS UNDER TRICHODERMA VIRIDE

The article analyses the opportunity of enrichment of earthworms' intestines by cellulose-degrading fungi strain *Trichoderma viride* and interdependence of the organisms.

Keywords: earthworms, cellulose, microorganisms, fungi.

Введение. Сегодня в Байкальском регионе остро стоит проблема переработки твердых отходов. Особенно велика доля отходов, содержащих целлюлозу. Ранее была 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 доктора биологических наук Б.Н. Огаркова. Он обладает высокой целлюлолитической активнос-

* 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).

тью [1]. Для изучения сохранения *T. viride* в кишечниках дождевых червей суспензию гриба микроинъектировали животным через ротовое отверстие с помощью инсулинового шприца со спиленным острием иглы. На 1-е, 4-е, 8-е сутки дождевых червей вскрывали в асептических условиях с вы세вом 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 °C 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 [там же]. 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 (табл. 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*

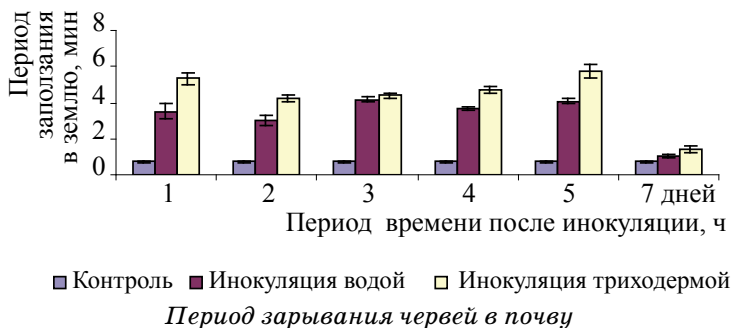
Время экспозиции, сутки	Титр, КОЕ/г			
	T ₀ , КОЕ/мл	Отделы кишечника		
		Передний	Средний	Задний
1	1,6 Ч 10 ⁸	0,12 ± 0,01 Ч 10 ⁸	0,4 ± 0,03 Ч 10 ⁶	0
4		0,13 ± 0,01 Ч 10 ⁷	0,1 ± 0,01 Ч 10 ⁶	0,7 ± 0,1 Ч 10 ⁶
8		0,1 ± 0,02 Ч 10 ⁶	0,05 ± 0,01 Ч 10 ⁶	0,7 ± 0,05 Ч 10 ⁶
12		0,5 ± 0,02 Ч 10 ⁶	0,2 ± 0,03 Ч 10 ⁶	0,6 ± 0,03 Ч 10 ⁷
40		0,8 ± 0,02 Ч 10 ⁷	0,7 ± 0,03 Ч 10 ⁷	0,3 ± 0,06 Ч 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 возрас-

та 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 заполнения 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 (рис.).



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 (табл. 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	$0,005 \pm 0,0008$
Скармливание <i>T. viride</i> , $T = 2,5$ Ч 10^3 КОЕ/г почвы	$0,07 \pm 0,01$
Скармливание фунгицида «Флуканозола», $C = 2,0$ Ч 10^{-4} г/г почвы	$0,004 \pm 0,0007$

Инокуляция *per os* 3-суточной культуры гриба (10^6 КОЕ/мл) дождевым 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-е 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.

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

Список использованной литературы

1. Огарков Б.Н. Биотехнология на основе грибов / Б.Н. Огарков, Г.Р. Огаркова, Л.В. Самусенок. — Иркутск: Иркут. ун-т, 2005. — 234 с.
2. Полянская Л.М. Судьба актиномицетов в кишечном тракте почвенных беспозвоночных животных, поедающих споры стрептомицетов / Л.М. Полянская, Н.И. Бабкина, Г.М. Зенова, Д.Г. Звягинцев // 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. Способ определения влияния водных эмульсий нефтепродуктов при вермикюльтивировании / В.И. Черных, Д.С. Потапов, Д.И. Стом. — Патент № 2290801 от 10 янв. 2004 г.
5. Sun Zhenjun. Vermiculture and vermiprotein / Zhenjun Sun. China Agricultural University Press, 2003. — 367 p.
6. Stom D.I. Transformation of Oil in Soil by a Microbial Preparation and Earthworms / D.I. Stom, D.S. Potapov, A.E. Balayan, O.N. Matveeva // Eurasian Soil Science. — 2003. — Vol. 36, No. 3. — P. 329–331.

Bibliography (transliterated)

1. Ogarkov B.N. Biotehnologiya na osnove gribov / B.N. Ogarkov, G.R. Ogarkova, L.V. Samusenok. — Irkutsk: Irkut. un-t, 2005. — 234 s.
2. Polyanskaya L.M. Sud'ba aktinomitsetov v kishechnom trakte pochvennykh bespozvonochnykh zhivotnykh, poedayushchikh spory streptomitsetov / L.M. Polyanskaya, N.I. Babkina, G.M. Zenova, D.G. Zvyagintsev // Mikrobiologiya. — 1996. — T. 65, № 4. — S. 560–565.
3. Tereshchenko N.N. Ekologo-mikrobiologicheskie aspekty vermikul'tivirovaniya / N.N. Tereshchenko. — Novosibirsk: Nauka, 2003. — 113 s.
4. Chernykh V.I. Sposob opredeleniya vliyaniya vodnykh emul'sii nefteproduktov pri vermikul'tivirovanii / V.I. Chernykh, D.S. Potapov, D.I. Stom. — Patent № 2290801 ot 10 Jan. 2004 g.
5. Sun Zhenjun. Vermiculture and vermiprotein / Zhenjun Sun. China Agricultural University Press, 2003. — 367 p.
6. Stom D.I. Transformation of Oil in Soil by a Microbial Preparation and Earthworms / D.I. Stom, D.S. Potapov, A.E. Balayan, O.N. Matveeva // Eurasian Soil Science. — 2003. — Vol. 36, No. 3. — P. 329–331.

Информация об авторах

Стом Дэвард Иосифович — доктор биологических наук, профессор Иркутского государственного университета, г. Иркутск, e-mail: stomd@mail.ru.

Быбин Виктор Александрович — младший научный сотрудник НИИ биологии при Иркутском государственном университете, г. Иркутск.

Приставка Алексей Александрович — кандидат биологических наук, доцент Иркутского государственного университета, г. Иркутск.

Саловарова Валентина Петровна — доктор биологических наук, профессор Иркутского государственного университета, г. Иркутск.

Огарков Борис Никитич — доктор биологических наук, профессор Иркутского государственного университета, г. Иркутск, e-mail: Nadin_buk@mail.ru.

Authors

Stom Daevard Iosifovich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Irkutsk State University, Irkutsk, e-mail: stomd@mail.ru.

Byibin Victor Aleksandrovich — Junior Research Scientist, Scientific Research Institute of Biology, Irkutsk State University, Irkutsk.

Pristavka Aleksey Aleksandrovich — PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Irkutsk State University, Irkutsk.

Salovarova Valentina Petrovna — Doctor of Biological Sciences, Professor, Irkutsk State University, Irkutsk.

Ogarkov Boris Nikitich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Irkutsk State University, Irkutsk, e-mail: Nadin_buk@mail.ru.