УДК 579.695;628.381.1 DOI 10.15372/SEJ20230403

Структура грибного сообщества при трансформации органических отходов червями Eisenia fetida

А. В. КУРАКОВ, Е. Н. БИЛАНЕНКО

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова 119991, Москва, Ленинские горы, 1 E-mail: kurakov57@mail.ru

Статья поступила 01.02.2023После доработки 20.02.2023Принята к печати 01.03.2023

АННОТАЦИЯ

Изменения таксономической структуры грибного сообщества при переработке коровьего навоза с соломой с помощью червей Eisenia fetida изучены с применением принципиально разных методов - культурального и метабаркодинга (путем амплификации и высокопроизводительного секвенирования ITS2 рДНК). С помощью метабаркодинга в субстратах и вермикомпосте идентифицировано значительно больше таксонов грибов, чем методом посева (66 и 33 вида соответственно). Единичные виды были установлены одновременно обоими методами. Методом метабаркодинга выявлены операционные таксономические единицы в Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Basidiobolomycota, Rozellomycota, Aphelidiomycota, культуральным методом – грибы из Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota. Видовое богатство сообщества снижалось в первые 10-20 сут переработки субстратов, затем росло и достигало максимальных значений в вермикомпосте (60 сут). Оба метода показали доминирование аскомицетов на всех этапах переработки субстрата E. fetida. Метабаркодинг показал доминирование сордариомицетов порядка Sordariales (48-53 %), преимущественно Zopfiella spp., и представленность на уровне нескольких процентов грибов порядков Pezizales, Microascales, Hypocreales, Pleosporales, Chaetothyriales, Onygenales, Eurotiales. При вермикомпостировании наблюдали увеличение доли в сообществе Chytridiomycota (с 1,1 до 3,2 %). Одновременно снижалась доля грибов отделов Mortierellomycota (с 5,7 до 1,5 %) рода Mortierella и Basidiomycota (с 8 и 21 до 3 %) при росте их разнообразия. Среди базидиомицетов преобладали Coprinellus marculentus, Coprinellus subdisseminatus, Coprinus annuloporus, Occultifur sp. Согласно посевам при переработке отходов и в вермикомпосте также преобладали аскомицеты, но других видов - Diplodascus geotrichum, родов Penicillium, Aspergillus, Talaromyces, Trichoderma, Fusarium, мукоромицеты рода Mucor и базидиомицеты Filobasidium wieringae. Выявлены грибы, способные к разложению различных полимерных соединений в отходах, активные деструкторы лигноцеллюлозы. Обнаружены копрофилы, кератинофилы, термофильные и термотолерантные виды, представители родов Trichoderma, Penicillium, способные обусловливать супрессивные свойства вермикомпоста к фитопатогенам и патогенам человека. Рассмотрены различия в микобиоте при компостировании и вермикомпостировании различных отходов.

Ключевые слова: грибные сообщества, таксономическая структура, видовое разнообразие, культуральные и молекулярно-генетические методы, посев и метабаркодинг, вермикомпостирование, отходы, навоз, солома.

ВВЕДЕНИЕ

Трансформация твердых органических отходов с применением эпигейных дождевых червей в высококачественное удобрение позволяет решать серьезные экологические проблемы. Перерабатываемые отходы (навоз, помет, осадки сточных вод, твердые бытовые отходы и др.) накапливаются на предприятиях и в городах в огромных количествах и представляют собой источники загрязнения окружающей среды (почвы, поверхностных водоемов и подземных вод, атмосферы) токсичными веществами, патогенными микроорганизмами, гельминтами, семенами сорных растений [Monroy et al., 2008; Neher et al., 2013; Dominguez et al., 2021]. При вермикомпостировании в ходе тесного взаимодействия дождевых червей, грибов и прокариот происходят окисление и гидролиз соединений отходов, образование и стабилизация гумусовых веществ, элиминация или существенное снижение плотности популяций вредных организмов и токсичных веществ в конечном продукте [Dominguez, 2004; Byzov et al., 2007; Neher et al., 2013; Dominguez et al., 2021]. Iloэтому актуальным является выяснение механизмов, роли организмов в этих процессах. Активно с применением культуральных и молекулярно-генетических подходов изучается состав, структура прокариот, активность гидролитических и окислительных ферментов при вермикомпостировании отходов. Показано, что при переработке дождевыми червями навоза и осадков сточных вод происходит устранение и снижение плотности популяций в биогумусе опасных в эпидемиологическом отношении бактерий, таких как Escherichia coli, Salmonella spp. и Enteroccocus spp., патогенов родов Dokdonella и Spirochaete [Dominguez, 2004; Neher et al., 2013; Dominguez et al., 2021]. Выявляемые при вермикомпостировании отходов представители родов Pseudomonas, Burkholderia, Bacillus, Streptomyces и другие ответственны не только за разложение полимерных соединений и синтез гуматов, но и способны к образованию метаболитов, подавляющих фитопатогенные грибы [Gudeta et al., 2022]. Установлено, что в зависимости от плотности популяций и видового разнообразия бактерий в исходном субстрате характер качественных и количественных изменений бактериального сообщества может принципиально различаться [Gomes-Brandon et al., 2012; Gopal et al., 2017; Dominguez et al., 2021].

В отличие от бактерий, данных о составе и роли биоты грибов при переработке отходов значительно меньше, а имеющаяся информация получена преимущественно на основе методов посева на питательные среды [Ryckeboer et al., 2003]. Вместе с тем знания о динамике состава грибной биоты при вермикультуре необходимы для понимания процессов деструкции органических веществ, образования гуминовых кислот, проявлений супрессивных свойств по отношению к патогенам и стимуляции роста растений. Можно полагать, что ведущее значение в этих процессах принадлежит грибным ферментам, меланопротеинам, антибиотикам и фитогормонам.

Целью работы была характеристика таксономической структуры грибной биоты при вермикомпостировании навоза с соломой с применением червей *E. fetida* методами посева и метабаркодинга.

материал и методы

Субстратами для получения вермикомпоста с применением Eisenia fetida были предварительно выдержанный коровий навоз и солома пшеницы. В контейнеры (5,5 л) из пластика размером $11 \times 30 \times 16$ см вносили и тщательно перемешивали 430 г навоза, 100 г воздушно-сухой соломы и 1000 мл дистиллированной воды. Солому пшеницы измельчали на установке КР-01 "Фермер-5" до размеров менее 0,3-0,5 см. Вермикомпостирование субстратов проводили при комнатной температуре (18-23 °C) и постоянной влажности 75-80 % от полной влагоемкости в течение 60 сут. В каждый контейнер вносили по 50 одновозрастных половозрелых особей $E.\ fetida\ {
m co}\ {
m средним\ весом}\ 0.51\pm0.04\ {
m r.\ Кон-}$ тейнер держали с открытой крышкой при постоянном освещении. Влажность субстратов поддерживали периодическим добавлением стерильной водопроводной воды. Субстраты в контейнере периодически (не реже 1 раза в 2 недели) осторожно перемешивали. Повторность в опытах трехкратная.

Химические свойства исходных компонентов и вермикомпоста определяли в МГУЛАБ по следующим методикам. Элементный состав в образцах определяли методом ИСП-ОЭС

на спектрометре 5110 ICP-OES Agilent. Предварительно пробы подвергали разложению в микроволновой печи Вольта МС-10. Предварительно высушенные при 105 °C навески (0,25 г) помещали в автоклав микроволновой печи, к ним приливали 8 мл концентрированной азотной кислоты и 2 мл перекиси водорода, после чего запускали стандартную программу для разложения органогенных образцов. После окончания программы и охлаждения пробы переносили в мерную колбу объемом 25 мл и доводили раствор до метки дистиллированной водой. Далее проба поступала на определение массовой доли элементов по методике М-МВИ-80-2008 [Методика..., 2008].

РН в образцах компоста и исходных субстратов определяли в водной вытяжке по ГОСТ 11623-89 на рН-метре рН-150-МИ производства "Измерительная техника". Электропроводность измеряли в той же вытяжке на кондуктометре НІ 2300, Hanna Instruments. Измерение органического вещества проводилось классическим гравиметрическим методом при 525 °C по ГОСТ 26213.

Полученный вермикомпост значительно отличается от исходных субстратов — навоза и соломы — по содержанию органического вещества, элементов минерального питания, значениям рН, показателям электропроводимости (табл. 1). По этим характеристикам он соответствует требованиям к вермикомпосту (биогумусу), предъявляемым ГОСТ 33830-2016.

Выделение, идентификация чистых культур грибов и расчет относительного обилия видов

Отбор и подготовку смешанных образцов из исходных субстратов — навоза и соломы (0 сут), и в ходе вермикомпостирования их смеси проводили на 10-е, 20-е, 40-е и 60-е

сутки. Повторность образцов измельченной соломы, коровьего навоза и вермикомпостов в посевах 3-кратная, чашек Петри из каждого образца 6-кратная. Навеску образцов массой 1 г переносили в пробирку с 10 мл стерильной воды, перемешивали на мешалке "Вортекс" в течение 5 мин. Проводили поверхностный посев из разведения 1:100 и 1:1000 на мальт-агар (МА). Для подавления роста бактерий в среду добавляли 4 мл/л молочной кислоты (рН 5,0) или антибиотик стрептомицин сульфат. Чашки Петри инкубировали при комнатной температуре 18-22 °C, периодически подсчитывали число колоний разных морфотипов и выделяли для идентификации в чистые культуры. Чистые культуры грибов хранили в пробирках со скошенным МА при 5 °С.

Рассчитывали общее число колониеобразующих единиц (КОЕ) грибов в 1 г воздушносухих образцов соломы, навоза и вермикомпоста и КОЕ часто выделяемых видов. Коэффициент вариации данных КОЕ грибов в среднем был около 10 %. Представленность видов в изучаемых местообитаниях оценивали по показателю относительного обилия, определяемого как отношение числа КОЕ данного вида к общему числу КОЕ, выраженное в процентах. Статистическая обработка данных проведена с применением программы Excel 6.0,

Идентификацию выделенных штаммов грибов осуществляли с использованием культурально-морфологических и молекулярногенетических подходов. Описание культур проводили на сусло-агаре и среде Чапека с использованием рекомендуемых для соответствующего таксона определителей [Raper, Fennell, 1965; Raper et al., 1968; Rifai, 1969; Ellis, 1971; Booth, 1977; Schipper, 1978; Arx, 1981; Klich, 2002; Crous et al., 2007; Domsch et al., 2007; Kirk et al., 2008; de Hoog et al., 2011; Samson, Hau-

Таблица 1 Химические свойства исходных субстратов и вермикомпоста

D	Органическое	TT	Проводимость,			МГ	/кг		
Вариант	вещество, %	рН	мкСм/см	Р	K	S	Ca	Mg	Na
Навоз	80	9,3	5050	65478	22254	2562	20023	7187	6563
Солома	90	7,0	952	1766	8199	587	3575	1417	788
Вермикомпост	75	7,4	2165	3539	11608	2872	16568	3550	2366

braken, 2011; Seifert et al., 2011] и по генетическим признакам с помощью ПЦР и дальнейшего секвенирования ITS-региона рДНК. Современное таксономическое положение видов дано по базе данных: Index Fungorum [http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp].

Высокопроизводительное NGSсеквенирование ITS2 рДНК грибов и биоинформатическая обработка данных

Геномную ДНК из образцов исходной смеси коровьего навоза и измельченной соломы (после 20 и 60 сут вермикомпостирования с E. fetida) выделяли с использованием набора DNeasy PowerSoil Kit в соответствии с рекомендациями производителя [https://www.bio. vu.nl/~microb/Protocols/Manuals/PowerSoil DNA.pdfl. Использовали свежие смешанные образцы (из девяти отдельно отобранных), анализы проведены в двухкратной повторности. Для амплификации гипервариабельного ITS2 участка гена 18Ѕ рРНК использовали следующие праймеры: прямой NR 5.8SR - TCGTCG GCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAT CTCGATGAAGAACGCAGCG, обратный NR ITS4R - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGT ATAAGAGACAGGCATCCTCCGCTTATTGA TATGC в концентрации 5 мкМ. Амплификацию проводили в объеме 25 мкл в смеси, содержащей 5 × KTN-mix (Evrogen) 5 мкл, смесь праймеров 2 мкл, 50 × SYBR(Evrogen) 0,5 мкл, в амплификаторе в реальном времени CFX96 Touch (Bio-Rad) при следующих условиях: первичная денатурация 3 мин при 95 °C; 35 циклов: денатурация 30 с при 95 °C, отжиг 30 с при 57 °C, элонгация 30 с при 72 °C; заключительная элонгация 5 мин при 72 °C.

Амплификацию ПЦР продукта, полученного на первом этапе, с целью баркодирования (индексирования) библиотек проводили в объеме 25 мкл в смеси, содержащей 5 × KTN-mix (Evrogen) 5 мкл, смесь праймеров 2 мкл, 50 × SYBR(Evrogen) 0,5 мкл, в амплификаторе в реальном времени CFX96 Touch (Bio-Rad) при следующих условиях: первичная денатурация 3 мин при 95 °C; 7 циклов: денатурация 30 с при 95 °C, отжиг 30 с при 55 °C, элонгация 30 с при 72 °C; заключительная элонгация 5 мин при 72 °C. Для амплификации использовали индексы, рекомен-

дованные производителем Nextera Index Kit (Illumina).

Ампликоны после второго этапа очищались с использованием магнитных частиц AMPure XP (KAPABiosystems) в соотношении 1:0,6, где вторая цифра – доля AMPure для очистки продуктов ПЦР амплификации гипервариабельного ITS2 участка гена 18S рРНК. Данные очищенные ампликоны являются готовыми библиотеками для мультиплексного секвенирования на платформе Illumina. Библиотеки смешивались между собой и доводились до общей концентрации 2 nM. К отобранным 5 мкл смеси добавляли 5 мкл 0,2 М NaOH и инкубировались в течение 5 мин. К денатурированной ДНК добавляли 990 мкл HTI и 1 мкл 12,5 мМ заранее денатурированного Phy X. Анализ библиотек проводился на секвенаторе нового поколения Illumina MiSeq методом парно-концевого чтения генерацией не менее 10000 парных прочтений на каждый образец с использованием следующих реактивов: MiSeq Reagent Kit v2 nano и MiSeq v2 Reagent Kit (500 Cycles PE).

Полученные данные секвенирования обрабатывались в программе, написанной с использованием алгоритма QIIME 1,9.1, включающего объединение прямых и обратных прочтений, удаление технических последовательностей, фильтрации последовательностей с низкими показателями достоверности прочтения отдельных нуклеотидов (качество менее Q30), фильтрации химерных последовательностей, выравнивание прочтений на референсную последовательность, распределение последовательностей по таксономическим единицам с использованием базы данных Silva версии 132 и Unite v8. Использован алгоритм классификации операционных таксономических единиц (ОТЕ) с открытым референсом (Open-reference OTU), порог классификации 97 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структура грибных сообществ при вермикомпостировании навоза с соломой по данным культурального метода

Общее число грибов в соломе пшеницы составляло 8800 КОЕ/г, в коровьем навозе

в несколько раз ниже $-2400~{\rm KOE/r}$. При вермикомпостировании численность грибов изменялась следующим образом: исходно в смеси навоза с соломой и червями была 8000 КОЕ/г, их число возрастало к 10 сут до 11800 КОЕ/г, к 20 сут снижалось, что, видимо, обусловлено потреблением E. fetida грибов и подавлением их активно размножающимися на легкодоступных субстратах бактериями. Численность грибов возрастала к 40-60 сут и стабилизировалось на уровне 6700-7100 КОЕ/г компоста. Для сравнения в контрольных вариантах - компостируемом навозе с соломой без червей, численность грибов также возрастала к 10 сут до 9800 КОЕ/г, затем существенно снижалась, а после 40 сут увеличивалась, но на более низком уровне (4500-4900 КОЕ/г), чем в вермикомпосте. Данные по численности грибов в вермикомпосте (10⁵ КОЕ в 1 г) и ее динамике в ходе вермикомпостирования сходны с сообщениями других исследователей [Anastasi et al., 2005].

Метод посева выявил в вермикомпостируемых образцах навоза с соломой мицелиальные микроскопические грибы отделов Ascomycota, Mucoromycota и дрожжи - Basidiomycota (табл. 2). Доминирующее положение по разнообразию и относительному обилию видов в грибном сообществе в течение всего периода вермикомпостирования занимали аскомицеты. Они представлены преимущественно грибами классов Eurotiomycetes порядка Eurotiales (Aspergillus spp., Penicillium spp., Talaromyces spp.), Sordariomycetes порядка Hypocreales (Fusarium spp., Trichoderma spp.). С меньшим относительным обилием выявляли виды класса Dothideomycetes порядков Pleosporales (Alternaria spp.) и Dothideales (Aureobasidium pullulans) и класса Saccharomycetes порядка Saccharomycetales (Dipodascus geotrichum). Среди мукоромицетов порядка Миcorales выявлены три вида рода Mucor, среди базидиомицетов – Filobasidium wieringae из порядка Filobasidiales класса Tremellomycetes.

На начальном этапе вермикомпостирование привело к существенному снижению видового разнообразия грибного сообщества, с 16 видов в исходной смеси навоза с соломой до 6 видов на 10-е сутки вермикультивирования. Только в период с 20 до 40 сут видовое богатство грибов в вермикомпостируемых субстратах стало возрастать, достигло 11, а на 60-е сутки, по

завершению процесса, в вермикомпосте 16 видов, всего выявлено 33 вида. При компостировании коровьего навоза с соломой наблюдали сходную закономерность, но менее резкое уменьшение разнообразия выявляемых грибов на 10–40-е сутки и меньшее разнообразие видов в компосте. В вермикомпостируемых субстратах и вермикомпосте преобладали виды родов Penicillium (P. aurantiogriseum, P. commune, P. cyclopium, P. glabrum, P. spinulosum), Aspergillus (A. fumigatus, A. flavus, A. niger), Talaromyces variabilis, Fusarium (F. oxysporium, F. solani), Dipodascus geotrichum, Trichoderma atroviride.

Итак, в сравнении с компостом на основе тех же субстратов в вермикомпосте выше видовое разнообразие и численность КОЕ грибов. При этом было ниже относительное обилие многих видов родов Aspergillus, Penicillium, Mucor, Fusarium, Trichoderma и Filobasidium wieringae, а значимо возросло оно у Dipodascus geotrichum, Talaromyces variabilis и некоторых других.

Структура грибных сообществ в вермикомпостируемых субстратах по данным метабаркодинга

Методом метабаркодинга в исходной смеси навоза с соломой для вермикомпостирования преобладали ОТЕ грибов отдела Ascomycota — 77,30 %, затем следовали представители отделов Basidiomycota — 7,80 %, Mortierellomycota — 5,71 %, Chytridiomycota — 1,43 %, Basidiobolomycota — 0,11 %, Aphelidiomycota — 1,32 %, Rozellomycota — 0,11 % (табл. 3).

Среди аскомицетов в исходной смеси субстратов доминировали ОТЕ видов класса Sordariomycetes (49,19%) порядка Sordariales (47,76%) – Zopfiella spp., Botryotrichum spirotrichum, Mycothermus thermophilus, Papulaspora equi, Cladorrhinum phialophoroides, Podospora sp. Большая доля (36,88%) грибов в этом порядке не была идентифицирована до более низкого таксономического уровня. Небольшое число ОТЕ принадлежало порядкам Нуросгеаles (1,10%) – Cylindrodendrum hubeiense и Microascales (0,33%) – Rhinocladium lesnei.

Класс Eurotiomycetes в исходных субстратах был представлен ОТЕ порядков Onygenales (1,32 %) – Chrysosporium spp., и Chae-

Таблица 2 Динамика структуры грибного сообщества при вермикомпостировании навоза с соломой (метод посева)

				Относите	ельное об	илие, %									
Вид	0 сут	10	сут	20	сут	40 сут		60 сут							
	HC*	HC	НСЧ	HC	НСЧ	HC	НСЧ	HC	НСЧ						
Alternaria alternata	6,2							1,6							
Alternaria sp.	0,9				13,7										
Aspergillus flavus	4,8	3,6		10,0		6,3	4,9	6,3	3,1						
Aspergillus fumigatus	29,8	47,2	23,3	13,0	1,0	9,6	2,4	10,6	5,3						
Aspergillus niger	1,3								3,1						
Aspergillus terreus					10,7										
Aureobasidium pullulans	5,8			8,0		6,3									
Diplodascus geotrichum**	3,3		0,8			52,4	12,4	3,2	6,2						
Filobasidium wieringae**	0,9			2,0	2,0	3,2									
Fusarium chlamydosporum		1,8	1,7												
Fusarium oxysporum	0,5			10,0		6,3	1,2	14,1	10,3						
Fusarium solani								6,3	4,1						
Fusarium sp.		1,8													
Fusarium sporotrichioides		7,2		15,0											
Mucor hiemalis		1,8				14,3	3,6	3,1							
Mucor plumbeus							3,6								
Mucor racemosus				15,0			*								
Penicillium aurantiogriseum				,			4,9								
Penicillium canescens		30,3		6,0	3,0		,								
Penicillium commune		,		,	,	1,6	50,0	29,7	11,6						
Penicillium cyclopium						,	2,4	3,1	,						
Penicillium glabrum	3,2						6,1	,	12,4						
Penicillium lividum	,		52,6	3,0	3,0		,		,						
Penicillium simplicissimum	1,3		,	,	,										
Penicillium tardum	,							6,3	1,0						
Penicillium spinulosum	9,2	2,7						,	10,0						
Rhizopus stolonifer	,	,		3,0					3,0						
Talaromyces funiculosus	4,0		15,6	,-					1,0						
Talaromyces variabilis	17,2		,						17,6						
Talaromyces verruculosus	,-								1,0						
Trichoderma asperellum	0,9								1,0						
Trichoderma koningii	- 7						8,5		,-						
Trichoderma atroviride	10,3	3,6	4,0	13,0	33,6		,	15,7	9,3						
Число видов	16	9	6	11	7	8	11	11	16						

^{*} Контроль (HC — коровий навоз с соломой), вермикомпостирование (HCЧ — коровий навоз с соломой и червями $E.\ fetida$).

tothyriales (1,21 %) — Phialophora cyclaminis. В классе Dothideomycetes (5,82 % доля ОТЕ) все идентифицированные виды относились к порядку Pleosporales — Didymella aurea, Bipolaris eleusines, Alternaria metachromatica.

Наименьшее число ОТЕ аскомицетов в исходных субстратах принадлежало классу Leotiomycetes, порядку Thelebolales (0,88%) — Thelebolus spongiae, Pseudogymnoascus roseus и классу Saccharomycetes, по-

рядку Saccharomycetales (0,11 %) – Nadsonia starkeyi-henricii.

Среди базидиомицетов в исходной смеси навоза и соломы преобладали ОТЕ видов класса Agaricomycetes (3,74%), порядков Agaricales (1,32%) – Pluteus longistriatus, Conocybe papillata, Polyporales (1,10%) – Ceraceomyces microsporus, Sebacinales (1,32%). Доля ОТЕ грибов Tremellomycetes в микобиоте составляла 1,32%, из них 0,77% принадлежали

^{**} Идентификация до вида подтверждена секвенированием ITS рДНК.

Таблица 3 Структура грибного сообщества исходной смеси навоза с соломой для вермикомпостирования (метод высокопроизводительного секвенирования ITS2 рДНК)

ОТЕ, число	OTE, %	Отдел	Класс	Порядок	Семейство	Род, вид*
336	36,88	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	uni	uni
109	11,96	Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Ascobolaceae	Ascobolus sp.
57	6,26	uni	uni	uni	uni	uni
53	5,82	Ascomycota	uni	uni	uni	uni
46	5,05	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Didymella aurea
46	5,05	Mortierellomycota	Mortierellomycetes	Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella polygonia
36	3,95	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Zopfiella sp.
25	2,74	Basidiomycota	Microbotryomycetes	Leucosporidiales	Leucosporidiaceae	Leucosporidium escuderoi
15	1,65	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Zopfiella tardifaciens
14	1,54	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Botryotrichum spirotrichum
12	1,32	Basidiomycota	Agaricomycetes	Sebacinales	uni	uni
12	1,32	Aphelidiomycota	Aphelidiomycetes	GS16	uni	uni
11	1,21	Ascomycota	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	Phialophora cyclaminis
10	1,10	Chytridiomycota	Chytridiomycetes	Chytridiales	Chytridiaceae	uni
10	1,10	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Meruliaceae	Ceraceomyces microsporus
9	0,99	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Mycothermus thermophilus
8	0,88	Ascomycota	Eurotiomycetes	Onygenales	Incertae sedis	Chrysosporium sp.
8	0,88	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	uni	uni
8	0,88	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Zopfiella longicaudata
8	0,88	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Incertae sedis	Papulaspora equi
7	0,77	Ascomycota	Leotiomycetes	Thelebolales	Thelebolaceae	Thelebolus spongiae
5	0,55	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Cylindroden- drum hubeiense
5	0,55	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	uni	uni

^{*} Не приведены виды с числом OTE = 1: Schizangiella serpentis, Caudospora sp., Mortierella indohii, Conocybe papillata, Bulleromyces albus, Alternaria metachromatica, Nadsonia starkeyi-henricii, Pseudogymnoascus roseus, Rhinocladium lesnei, Apiotrichum porosum; OTE = 2: Podospora sp., Chrysosporium pseudomerdarium, Chrysosporium merdarium, Mortierella alpine, Bipolaris eleusines, Trichosporon sp.; OTE = 3: Pluteus longistriatus, Mortierella sp.; OTE = 4: Cladorrhinum phialophoroides, Ascobolus furfuraceus, Apiotrichum scarabaeorum, Vishniacozyma carnescens.

порядку Trichosporonales (Apiotrichum scarabaeorum, Trichosporon sp., Apiotrichum porosum), 0,55 % – Tremellales (Vishniacozyma carnescens, Bulleromyces albus).

Отдел Mortierellomycota (5,71 %) в изучаемых образцах представлен порядком Mortierellales с четырьмя видами: Mortierella sp., M. polygonia, M. alpina, M. indohii. Единичные

^{**} uni – не удалось идентифицировать.

обнаружены Schizangiella serpentis (0,11 %) семейства Basidiobolaceae, отдела Basidiobolomycota, и Caudospora sp. (0,11 %) семейства Caudosporidae отдела Rozellomycota.

В отделе Chytridiomycota (1,42% доля ОТЕ) грибы до уровня рода не были идентифицированы, а Aphelidiomycota (1,32%) – до уровня ниже класса Aphelidiomycetes.

В грибном сообществе после 20 суток вермикомпостирования навоза с соломой доля

представителей отдела Ascomycota составила 66,99 %, Basidiomycota – 20,84 %, Mortierellomycota – 1,01 %, Chytridiomycota – 1,46 %, Glomeromycota – 1,13 %, Basidiobolomycota – 0,11 %, Aphelidiomycota – 0,34 %, Rozellomycota – 0,11 % (табл. 4).

В отделе Ascomycota доминировали ОТЕ (53,02%) класса Sodariomycetes, большинство из которых относилось к порядку Sordariales (50,43%). 42,45% ОТЕ из них не уда-

Таблица 4 Структура грибного сообщества навоза с соломой через 20 сут вермикомпостирования с *E. fetida* (метод высокопроизводительного секвенирования ITS2 рДНК)

ОТЕ, число	OTE, %	Отдел	Класс	Порядок	Семейство	Род, вид*
377	42,45	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	uni**	uni
140	15,77	Basidiomycota	Tremellomycetes	Trichosporonales	Trichosporonaceae	Trichosporon sp.
38	4,28	uni	uni	uni	uni	uni
33	3,72	Ascomycota	uni	uni	uni	uni
26	2,93	Basidiomycota	Tremellomycetes	Trichosporonales	Trichosporonaceae	Apiotrichum scarabaeorum
25	2,82	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Didymella aurea
21	2,36	Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Pyronemataceae	uni
20	2,25	Ascomycota	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Herpotrichiel- laceae	Phialophora cyclaminis
17	1,91	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	uni	uni
16	1,80	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Mycothermus thermophilus
15	1,69	Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Ascobolaceae	Ascobolus sp.
14	1,58	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Zopfiella sp.
13	1,46	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Zopfiella longicaudata
11	1,24	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Sporormiaceae	Preussia flanaganii
11	1,24	Chytridiomycota	uni	uni	uni	uni
10	1,13	Glomeromycota	uni	uni	uni	uni
10	1,13	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Bipolaris eleusines
9	1,01	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Incertae sedis	Papulaspora equi
8	0,90	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	uni	uni
8	0,90	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Zopfiella tardifaciens
7	0,79	Ascomycota	Eurotiomycetes	Onygenales	Incertae sedis	Chrysosporium pseudomerdarium
6	0,68	Ascomycota	Leotiomycetes	Thelebolales	Pseudeurotiaceae	Pseudogymnoas- cus roseus
5	0,56	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Lasiosphaeriaceae	Cladorrhinum phialophoroides
5	0,56	Mortierellomy- cota	Mortierellomy- cetes	Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella poly- gonia

^{*} Не приведены виды с числом ОТЕ = 1: Mortierella gamsii, Rhizophydium globosum, Sagenomella oligospora, Ascobolus furfuraceus, Zopfiella marina, Remersonia thermophile, Alternaria metachromatica, Fusarium concentricum, Colletotrichum gloeosporioides; ОТЕ = 2: Mortierella indohii, Conocybe papillata, Rhinocladium lesnei, Cladorrhinum sp.; ОТЕ = 3: Phyllosticta paracapitalensis, Scutellinia vitreola; ОТЕ = 4: Pseudallescheria boydii.

^{**}uni – не удалось идентифицировать.

лось идентифицировать ниже уровня порядка. Среди идентифицированных таксонов этого порядка были Mycothermus thermophilus, Zopfiella spp., Papulaspora equi, Cladorrhinum spp., Remersonia thermophila. В порядке Hypocreales установленные ОТЕ (1,35 %) принадлежали Fusarium concentricum, в порядке Microascales (1,13 % доля ОТЕ) — Pseudallescheria boydii, Rhinocladium lesnei, в порядке Glomerellales (0,11 %) — Colletotrichum gloeosporioides.

В классе Pezizomycetes (4,50 % OTE) порядка Pezizales выявлены Ascobolus spp., $Scutellinia\ vitreola.$

Основная доля ОТЕ, принадлежащая к классу Eurotiomycetes (3,15 %), относилась к порядку Chaetothyriales (2,25 %) — Phialophora cyclaminis, а также к Onygenales (0,79 %) — Chrysosporium pseudomerdarium, и к Eurotiales (0,11 %) — Sagenomella oligospora.

В классе Leotiomycetes (0,68 %) порядка Thelebolales идентифицирован *Pseudogymnoascus roseus*.

Среди базидиомицетов на 20-е сутки вермикомпостирования субстратов в грибном сообществе преобладали виды класса Tremellomycetes (18,70 %) исключительно порядка Trichosporonales — Trichosporon sp., Apiotrichum scarabaeorum. К классу Agaricomycetes принадлежали ОТЕ порядка Agaricales — Conocybe papillata (2,14 %), и 1,91 % ОТЕ не было идентифицировано ниже уровня порядка.

Грибы отдела Mortierellomycota принадлежали исключительно классу Mortierellomycetes (1,01 % OTE), порядка Mortierellales – Mortierella polygonia, M. indohii, M. gamsii.

Небольшая доля ОТЕ была из отдела Chytridiomycota (0,11 %) классов Chytridiomycetes порядка Chytridiales (роды не были идентифицированы) и Rhizophydiomycetes порядка Rhizophydiales — $Rhizophydium\ globosum$.

В грибном сообществе вермикомпоста, полученного на 60-е сутки переработки навоза с соломой червями E. fetida, пребладали виды отдела Ascomycota (доля их ОТЕ -68,45%). Значительно меньше было представителей отделов Basidiomycota -3,13%, Mortierellomycota -1,48%, Chytridiomycota -20,74%, Glomeromycota -0,73%, Aphelidiomycota -3,14%, Rozellomycota -0,05% (табл. 5).

В таксономической структуре микобиоты вермикомпоста доминировали аскомицеты (53,74 % OTE) класса Sodariomycetes порядка Sordariales (53,18 %) - Zopfiella spp., Papulaspora equi, Mycothermus thermophilus, Cladorrhinum phialophoroides, Remersonia thermophila, Podospora sp., Botryotrichum spp., Chaetomium globosum. Небольшие доли в сообществе имели представители порядка Microascales (0,32 %) - Rhinocladium lesnei, Custingophora blanchettei, Pseudallescheria boydii, Wardomyces inflatus, а также Hypocreales (0,10 %) - Paracremonium binnewijzendii, Fusarium concentricum, Coniochaetales (0,09 % ОТЕ не идентифицировано) и Pleurotheciales (0,05 %) – Sterigmatobotrys uniseptata.

Доля OTE аскомицетов класса Pezizomycetеѕ в вермикомпосте составляла 3,75 %. Среди них идентифицировали до вида только Ascobolus spp. и Scutellinia vitreola из порядка Pezizales. OTE Eurotiomycetes составили 1,12 % и распределялись между Chaetothyriales (0.57 % OTE - Phialophora cyclaminis), Onygenales (0,32 % OTE - Chrysosporium pseudomerdarium) и Eurotiales (0,23 % OTE -Sagenomella oligospora, Penicillium spp., Byssochlamys zollerniae, Aspergillus wentii). Dothideomycetes, доля которых составляет 1,97 % ОТЕ, представлены порядками Pleosporales (1,86 % OTE - Preussia flanaganii, Didymella aurea, Bipolaris eleusines, Aliridiaustralis), ternaria Botryosphaeriales (0,09 % OTE - Phyllosticta paracapitalensis), Capnodiales (0,02 % OTE, не идентифицированы). ОТЕ класса Leotiomycetes составили 0,25 % и принадлежали порядкам Thelebolales (0,23 % - Pseudogymnoascus spp., Pseudeurotium bakeri) и Helotiales (0,02 %), ОТЕ до рода не идентифицированы. Грибы из Saccharomycetes порядка Saccharomycetales (0,02 % OTE) в вермикомпосте представлены Candida vartiovaarae.

Среди базидиомицетов в вермикомпосте преобладали виды класса Tremellomycetes (2,10~%) порядка Trichosporonales (2,03~%) – Trichosporon spp., Apiotrichum spp., обнаружены виды порядков Tremellales (0,05~% ОТЕ) – Saitozyma podzolica, и Filobasidiales (0,02~% ОТЕ) – Solicoccozyma terricola. Доля ОТЕ видов Coprinellus spp., Coprinus annuloporus класса Agaricomycetes порядка Ag-

 $T \ a \ 5 \ \pi \ \text{и ц a} \quad 5$ Структура грибного сообщества вермикомпоста (метод высокопроизводительного секвенирования ITS2 рДНК)

ОТЕ, число	OTE, %	Отдел	Класс	Порядок	Семейство	Род, вид*
1607	36,78	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Zopfiella longicaudata
765	17,51	Chytridiomycota	GS13	uni	uni	uni
332	7,60	Ascomycota	uni	uni	uni	uni
308	7,05	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Incertae sedis	Papulaspora equi
215	4,92	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	uni	uni
134	3,07	Chytridiomycota	Rhizophydiomycetes	Rhizophydiales	Rhizophydiaceae	Rhizophydium globosum
133	3,04	Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Ascobolaceae	Ascobolus sp.
111	2,54	Aphelidiomycota	uni	uni	uni	uni
106	2,43	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Zopfiella sp.
97	2,22	uni	uni	uni	uni	uni
87	1,99	Basidiomycota	Tremellomycetes	Trichosporonales	Trichosporonaceae	Trichosporon sp.
52	1,19	Mortierellomycota	Mortierellomycetes	Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella polygonia
38	0,87	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Mycothermus thermophilus
32	0,73	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	uni
29	0,66	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Sporormiaceae	Preussia flanaganii
26	0,60	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Didymella aurea
26	0,60	Aphelidiomycota	Aphelidiomycetes	GS16	uni	uni
25	0,57	Ascomycota	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Herpotrichiel- laceae	Phialophora cyclaminis
19	0,43	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Bi polaris eleusines
19	0,43	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus marculentus
17	0,39	Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Pyronemataceae	uni
14	0,32	Ascomycota	Eurotiomycetes	Onygenales	Incertae sedis	Chrysosporium pseudomerdarium
12	0,27	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Lasiosphaeriaceae	Cladorrhinum phialophoroides
11	0,25	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Zopfiella tardifaciens
11	0,25	Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Pyronemataceae	uni
8	0,18	Mortierellomycota	Mortierellomycetes	Mortierellales	uni	uni
8	0,18	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus subdisseminatus
8	0,18	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	uni
7	0,16	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria iridiaustralis
7	0,16	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Incertae sedis	Remersonia thermophila
6	0,14	Ascomycota	Leotiomycetes	Thelebolales	Pseudeurotiaceae	Pseudogymnoascus roseus
6	0,14	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Lasiosphaeriaceae	uni
5	0,11	Basidiomycota	Cystobasidiomycetes	Cystobasidiales	Cystobasidiaceae	Occultifur sp.
5	0,11	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	Rhinocladium lesnei

^{*} Не приведены виды с числом ОТЕ = 1: Schizangiella serpentis, Mortierella horticola, Sakaguchia dacryoidea, Botryotrichum spirotrichum, Malassezia restricta, Byssochlamys zollerniae, Operculomyces laminatus, Candida vartiovaarae, Mortierella indohii, Scutellinia vitreola, Pseudogymnoascus sp., Malassezia globosa, Wardomyces inflatus, Apiotrichum scarabaeorum, Solicoccozyma terricola, Botryotrichum atrogriseum, Aspergillus wentii, Penicillium thomii, Chaetomium globosum, Apiotrichum porosum, Pseudeurotium bakeri; ОТЕ = 2: Sterigmatobotrys uniseptata, Custingophora blanchettei, Sagenomella oligospora, Mortierella gamsii, Paracremonium binnewijzendii, Saitozyma podzolica, Ascobolus furfuraceus, Pseudogymnoascus appendiculatus, Penicillium spinulosum, Fusarium concentricum; ОТЕ = 3: Podospora sp., Pseudallescheria boydii, Penicillium aethiopicum, Coprinus annuloporus; ОТЕ = 4: Phyllosticta paracapitalensis.

^{**}uni – не удалось идентифицировать.

агісаles составила $0.75\,\%$. Минорным компонентом в микобиоте были виды Occultifur sp. (класс Cystobasidiomycetes $(0.13\,\%)$ порядок Cystobasidiales $(0.11\,\%)$ и Sakaguchia dacryoidea (порядок Erythrobasidiales, $0.02\,\%$). В классе Microbotryomycetes $(0.07\,\%)$ порядке Sporidiobolales OTE до уровня рода были не определены, а в классе Malassezia spp.

Грибы отдела Mortierellomycota класса Mortierellomycetes порядка Mortierellales представлены в вермикомпосте видами Mortierella polygonia, M. indohii, M. gamsii. В Glomeromycetes 0,73 % ОТЕ не были идентифицированы ниже уровня порядка Glomerales. В Basidiobolomycetes 0,02 % ОТЕ из Basidiobolales — Schizangiella serpentis.

Из хитридиомицетов в вермикомпосте идентифицированы предстравители класса Rhizophydiomycetes порядка Rhizophydiales – Rhizophydium globosum, Operculomyces laminatus, а грибы класса Chytridiomycetes порядка Chytridiales до уровня рода не были определены.

Таким образом, согласно данным метабаркодинга, таксономическая структура грибного сообщества в ходе вермикомпостирования изменилась следующим образом (табл. 6). Немного снизилась доля грибов отдела Ascomycota (с 77,30 % до 66,99–68,45 %), но они сохраняли свое доминирующее положение в течение всего процесса и в конечном продукте. В течение первых 20 сут представленность базидиомицетов увеличилась с 7,80 до 20,84 %, но в вермикомпосте их обилие было уже небольшим (3,13 %). В вермикомпосте также была меньше (1,48 %), чем в исходных субстратах (5,71 %), доля последовательностей ОТЕ отдела Mortierellomycota. Значительно возросла доля грибов отдела Chytrydiomycota в образцах свежего биогумуса (20,74 %) по сравнению с исходными субстратами (1,43 %), а также увеличилось число нуклеотидных последовательностей отдела Aphelidiomycota (с 1,32 до 3,14 %). В ходе вермикомпостирования и в конечном продукте в небольших количествах (доли процентов ОТЕ от общего числа) обнаруживали также нуклеотидные последовательности грибов отделов Glomeromycota, Rozellomycota, Basidiobolomycota.

Наиболее значимые изменения на уровне таксонов более низкого уровня произошли при вермикомпостировании с грибами следующих порядков (табл. 7). Доля ОТЕ грибов порядков Pleosporales, Onygenales, Chaetothyriales, Thelebolales, Pezizales, Saccharomycetales, Leucosporidiales и классов Mortierellomycetes, Agaricomycetes, Chytridiomycetes уменьшилась в грибном сообществе вермикомпоста не менее чем в 2-3 раза. Одновременно в нем возросла представленность ОТЕ грибов порядков Sordariales, Eurotiales, Rhizophydiales, Tremellomycetes, Cystobasidiomycetes, Glomerales. Определенные изменения происходили и на начальном этапе вермикомпостирования (на 20-е сутки), в этот период наблюдали максимум представленности в сообществе ОТЕ грибов порядков Microascales, Chaetothyriales, Agaricales, Trichosporonales.

В составе вермикомпоста преобладали ОТЕ из отдела Ascomycota – Zopfiella longicaudata, Zopfiella sp., Papulaspora equi, Ascobolus sp., Mycothermus thermophilus, Preussia flanaganii, Didymella aurea, Phialophora cyclaminis,

T а б л и ц а 6 Изменение структуры грибного сообщества на уровне отделов при вермикомпостировании навоза с соломой (метод высокопроизводительного секвенирования ITS2 рДНК)

		Доля ОТЕ, %	
Отдел	0	20 сут	60 сут
Ascomycota	77,30	66,99	68,45
Basidiomycota	7,80	20,84	3,13
Mortierellomycota	5,71	1,01	1,48
Chytridiomycota	1,43	1,46	20,74
Glomeromycota	0,00	1,13	0,73
Basidiobolomycota	0,11	0,11	0,00
Rozellomycota	0,11	0,11	0,05
Aphelidiomycota	1,32	0,34	3,14

 $T\ a\ f\ \pi\ u\ \mu\ a\ 7$ Изменения в структуре грибного сообщества на уровне классов и порядков при вермикомпостировании (метод высокопроизводительного секвенирования ITS2 рДНК)

	Таксон		Доля ОТЕ, %	
	таксон	0	20 сут	60 сут
Ascomycota	Sodariomycetes	49,19	53,02	53,74
	Sordariales	47,76	50,43	53,18
	Microascales	0,33	1,13	0,32
	Hypocreales	1,10	1,35	0,10
	Glomerellales	1,10	0,11	0,10
	Coniochaetales		0,11	0.00
				0,09
	Pleurotheciales			0,05
	Eurotiomycetes	2,53	3,15	1,12
	Chaetothyriales	1,21	2,25	0,57
	Onygenales	1,32	0,79	0,32
	Eurotiales	,	0,11	0,23
	Pezizomycetes	12,95	4,50	3,75
	Pezizales	12,95	4,50	3,75
	rezizaies	12,95	4,50	5,75
	Dothideomycetes	5,82	5,64	1,97
	Pleosporales	5,82	5,30	1,86
	Capnodiales	7	0,34	0,02
	Botryosphaeriales		0,01	0,02
				0,00
	Leotiomycetes	0,88	0,68	0,25
	Thelebolales	0,88	0,68	$0,\!23$
	Helotiales			0,02
	Saccharomycetes	0,11		0,02
	Saccharomycetales	0,11		0,02
		2.74	0.14	0.55
Basidiomycota	Agaricomycetes	3,74	2,14	0,77
	Agaricales	1,32	2,14	0,75
	Polyporales	1,10		
	Sebacinales	1,32		
	Tremellomycetes	1,32	18,70	2,10
	Trichosporonales	0,77	18,70	2,03
	Filobasidiales	0,55	,. 0	0,02
	Tremellales	0,00		0,02
		2.74		
	Microbotryomycetes	2,74		0,07
	Sporidiobolales Leucosporidiales	2,74		0,07
	Cystobasidiomycetes			0,13
	Cystobasidiales			0,13
	Erythrobasidiales			0,11
	·			,
	Malasseziomycetes			0,04
	Malasseziales			0,04
Mortierellomycota	Mortierellomycetes	5,71	1,01	1,48
- -	Mortierellales	5,71	1,01	1,48
Chytridiomycota	Chytridiomycetes	1,1	0,11	0,07
ony a fulomy cota	Chytridiales	1,1 1,1	0,11	0,07
	·	1,1	0,11	0,01
	Rhizophydiomycetes		0,11	3,09
	Rhizophydiales		0,11	3,09
Glomeromycota	Glomeromycetes			0,73
c.1021101 omj cota	Glomerales			0,73
				0.00
Basidiobolomycota	Basidiobolomycetes			0,02
	Basidiobolales			0,02

Chrysosporium pseudomerdarium, Alternaria iridiaustralis, Remersonia thermophila, Pseudogymnoascus roseus, Rhinocladium lesnei; Basidiomycota — Trichosporon sp., Coprinellus marculentus, Occultifur sp.; Chytridiomycota — Rhizophydium globosum.

В целом, видовое богатство сообщества снижалось на начальном этапе вермикомпостирования (с 37 до 32 видов), а затем росло, достигнув в вермикомпосте 58 видов. Всего в вермикомпостируемых субстратах и биогумусе установлено 66 ОТЕ, идентифицированных до вида.

обсуждение

При вермикомпостировании трансформация органических отходов проходит несколько стадий. После предподготовки субстратов в течение первой стадии дождевые черви их измельчают и перемешивают, тем самым меняют состав и активность микробиоты. В фазу созревания вермикомпоста дождевые черви интенсивно перемещаются к более свежим локусам непереваренного субстрата, а грибы и прокариоты завершают разложение и гумификацию переработанных беспозвоночными органических веществ [Aira et al., 2007; Gomez-Brandon et al., 2011]. Продолжительность периода созревания не является фиксированной, она зависит от того, как протекает активная фаза вермикомпостирования, которая определяется в значительной степени составом исходных субстратов, их доступностью для биоты [Dominguez et al., 2010].

В нашем случае переход от активной стадии к фазе созревания вермикомпоста происходил согласно динамике численности грибов и их состава в период от 20-х к 40-м суткам (табл. 2, 8). Эти сроки характерны для вермикомпостирования коровьего навоза [Gomez-Brandon et al., 2012; Neher et al., 2013]. При переработке труднодоступных растительных остатков, например листьев кокосовых пальм, вермикомпостирование имеет более продолжительный период (около 100 сут) [Gopal et al., 2017].

Сравнение двух подходов для изучения микобиоты показало, что метабаркодинг выявил в несколько раз большее разнообразие грибов, чем метод посева (58 и 16 видов в вермикомпосте соответственно). Причем культуральный метод обнаружил только представителей Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota, а метод высокопроизводительного секвенирования ITS2 рДНК грибов выявил ОТЕ из Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Basidiobolomycota, Rozellomycota, Aphelidiomycota (cm. табл. 2, 7, 8). Как молекулярным, так и культуральным методом на уровне вида установлены единичные виды, в частности Penicillium spinulosum. Вместе с тем почти все порядки, представители которых были выявлены культуральным методом (Hypocreales, Eurotiales, Saccharomycetales B Ascomycota, Filobasidiales в Basidiomycota), обнаружены и с помощью метабаркодинга (см. табл. 8). Исключение составили грибы из Dothideales, выявленные только культуральным методом. Удивительно, что виды рода Trichoderma spp., часто массово развивающиеся в посевах и подавляющие развитие других грибов, не были выявлены с помощью метабаркодинга. Значительно реже этот метод обнаруживает также виды родов Aspergillus, Penicillium, Talaromyces, Fusarium, Мисог. Связано это с тем, что метод посева выявляет активно спороносящие грибы, в то время как споры трудно поддаются разрушению при подготовке ДНК для генетического анализа. Эти данные подтверждают важность совместного применения обоих подходов для более полной характеристики состава грибов в изучаемом экотопе.

Изменения структуры грибного сообщества при вермикомпостировании навоза с соломой в целом сходны с данными других авторов, но есть и отличия, которые, видимо, чаще всего связаны со спецификой микобиоты в исходных субстратах. При вермикомпостировании навоза с соломой наблюдали снижение доли базидиальных грибов и преобладание аскомицетов из Sordariomycetes, Sordariales с доминированием Zopfiella spp. (более 30 % OTE), Papulaspora equi, Cladorrhinum phialophoroides, Rhinocladium lesnei, и других таксонов - Ascobolus sp., Mortierella spp., Trichosporon sp., Preussia flanaganii, Didymella aurea, Phialophora cyclaminis, Bipolaris eleusines, Chrysosporium pseudomerdarium, Pseudogymnoascus roseus, Podospora sp., Botryotrichum spp., Chaetomium globosum (cm. табл. 5). Молекулярным методом в вермикомпосте обнаружены также базидиомицеты -

		Этап вермикомпостирования, сут							
Т	аксон	()	2	20	60			
		Π*	B**	П	Б	П	Б		
Ascomycota	Sodariomycetes Sordariales	++	+++	+++	+++	++	+++		
	Microascales Hypocreales Glomerellales	++	++	+++	+ + +	++	+		
	Coniochaetales Pleurotheciales						++		
	Eurotiomycetes	+++	+	++	+	+++	+		
	Chaetothyriales		+		+		+		
	Onygenales Eurotiales	+++	+	++	++	+++	++		
	Pezizomycetes		++		·		·		
	Pezizales		++						
	Dothideomycetes	+	+	++	+		+		
	Pleosporales		+	++	+		+		
	Dothideales Capnodiales	+					+		
	Botryosphaeriales				+		+		
	Leotiomycetes		+		+		+		
	Thelebolales		+		+		+		
	Helotiales						+		
	Saccharomycetes Saccharomycetales	+	+			++	+		
Basidiomycota	Agaricomycetes		+		+		+		
	Agaricales		+		+		+		
	Polyporales Sebacinales		++						
	Tremellomycetes	+	+		++		+		
	Trichosporonales	+	+		++		+		
	Filobasidiales						+		
	Tremellales		+				+		
	Microbotryomycetes Sporidiobolales		+				+		
	Leucosporidiales Malasseziomycetes		'				+		
	Malasseziales						+		
	Cystobasidiomycetes Cystobasidiales Erythrobasidiales						+ + +		
Mortierellomycota	Mortierellomycetes Mortierellales		+ +		+ +		++		
Chytridiomycota	Chytridiomycetes Chytridiales		++		++		++		
Aphelidiomycota	Aphelidiomycetes		+		+		+		
Rozellomycota	Microsporidea		+		+		+		

^{*} П – показатель относительного обилия по доли КОЕ таксона от общего числа КОЕ: +++->30 %; ++-10-30 %; +-<10 %.

^{**} Б – показатель относительного обилия по доли ОТЕ таксона от общего числа ОТЕ: +++->30 %; ++-10-30 %; +-<10 %.

Coprinellus marculentus, Coprinellus subdisseminatus, Coprinus annuloporus, Occultifur sp., термофильные виды аскомицетов — Byssochlamys zollerniae, Mycothermus thermophilus, Remersonia thermophile. Согласно данным культурального метода в нем преобладают Diplodascus geotrichum, виды рода Penicillium, Aspergillus, Talaromyces, Trichoderma, Fusarium.

Анастаси с соавторами использовал комплекс методов посева для изучения микобиоты вермикомпоста, полученного из отходов животного и растительного происхождения, и выявил многие виды, которые характерны и для нашего биогумуса. Среди доминирующих грибов были также виды родов Репicillium, Aspergillus, Preussia, Phialophora, Talaromyces, Scopulariopsis, Pseudoallescheria, Acremonium, Chrysosporium, Cladosporium [Anastasi et al., 2005]. В вермикомпосте, полученном из осадков сточных вод с применением Eisenia andrei, также установлено преобладание грибов отдела Ascomycota и снижение Basidiomycota [Dominguez et al., 2021]. Изменения касались в большинстве своем других видов этих отделов - увеличение численности представителей родов Debaryomyces, Mortierella, Cephaliophora, Scedosporium и Trichosporon, и снижение – Scutellinia, Apiotrichum, Paracremonium и Boubovia. При вермикомпостировании этих отходов увеличилось относительное количество грибов Blastocladiomycota и Mortierellomycota, а при переработке коровьего навоза с соломой мы наблюдали уменьшение представителей Mortierellomycota, но также рост числа близких к Blastocladiomycota грибов из Chytridiomycota. В случае с органическими отходами, предварительно переработанных в компостном биореакторе, их вермикомпостирование с E. fetida также вело к преобладанию в биоудобрении аскомицетов над базидиомицетами. Это установлено в работе Нехера с коллегами [Neher et al., 2013], которые, применив метод высокопроизводительного секвенирования, установили, что в вермикомпосте число ITS последовательностей Ascomycota 75.0 ± 15.3 , Basidiomycota – 14.9 ± 16.0 , Zygo $mycota - 9,0 \pm 3,7$. Состав грибов на уровне порядков (Pezizales, Hypocreales, Sordariales, Microascales, Agaricales, Mortierellales, Orbiliales) в этом вермикомпосте был сходен с таковым в нашей работе. Но нами выявлено значительно больше изменений в микобиоте при вермикомпостировании как на уровне порядков, так и видов.

При компостировании навоза с соломой без существенного повышения температуры, в отличие от вермикомпостирования, напротив, наблюдается увеличение в несколько раз доли нуклеотидных последовательностей грибов отдела Basidiomycota (до 68,8 %) и их значительное преобладание над Ascomycota (30,6 %). Американские ученые отмечали сходные таксономические изменения в микобиоте при компостировании навоза с добавками лигноцеллюлозных субстратов (щепы, бумаги, сена, соломы) [Neher et al., 2013]. Кроме того, нами отмечено, что в вермикомпосте разнообразие термофильных и термотолерантных видов грибов ниже, чем в компосте.

Основные деструкторы лигноцеллюлозы при вермикомпостировании установлены преимущественно методом высокопроизводительного секвенирования. Это были копрофильные грибы родов Coprinellus, Coprinus, Conocybe, Ascobolus, Zopfiella, Podospora, Chaetomium, Dipodascus, а также типичные для верхних горизонтов почв, подстилки и растительного опада виды родов Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Altrernaria, Fusarium, Mortierella, которые являются активными продуцентами различных карбогидраз, а некоторые - и лигниназ [Sivori et al., 1996; Tuomela et al., 2000; Richardson, 2001]. За разложение остатков шерсти животных, которые неизбежно имеются в навозе, ответственны известные кератинофильные виды родов Chrysosporium, Trichosporon [Colombo et al., 2011].

Повышение плотности популяций некоторых видов непосредственно связано с их развитием в пищеварительном тракте дождевых червей. Это, в первую очередь, дрожжи Dipodascus geotrichum, выявляемые на протяжении всего периода вермикомпостирования методом посева и обнаруженные нами в кишечнике и копролитах E. fetida [Кураков и др., 2019]. Они встречаются на многих субстратах и известны как активные продуценты протеиназ, целлюлаз, пектиназ [Gente et al., 2006].

В вермикомпосте по сравнению с исходными субстратами снизилась численность грибов рода Aspergillus, виды которого (A. fumiga-

tus, A. flavus) представляют потенциальную опасность для здоровья человека [Кононенко, 2021].

Позитивный эффект вермикультуры связан и с элиминацией или значимым уменьшением представленности бактериальных патогенов. Это может быть обусловлено тем, что в вермикомпосте выявлены Trichoderma asperellum, T. atroviride, Penicillium glabrum, P. aurantiogriseum с известной ингибирующей активностью к E. coli и ряду других патогенов человека [Stracquadanio et al., 2020; Cadelis et al., 2022].

Известно, что популяции Trichoderma viride, T. asperellum в вермикомпостируемых субстратах могут стимулировать рост и развитие дождевых червей и повышать эффективность биогумуса в сдерживании корневых поражений растений грибами Fusarium, Alternaria, Sclerotium rolfsii [Gudeta et al., 2022; Caдыкова, Кураков, 2013]. Наличие в грибном сообществе вермикомпоста популяции видов рода Trichoderma (T. asperellum, T. atroviride) может придавать ему супрессивные свойства. что подтверждают проведенные эксперименты (данные не опубликованы). При его внесении в дерново-подзолистую почву в вегетационных опытах с инфекционным фоном Fusarium oxysporum BKM F-140 (5×10^6 KOE/r) послевсходовая гибель огурцов снижается в среднем на 13 %, а кресс-салата – на 33 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, установлено, что вермикультура приводит к значимым изменениям микобиоты исходных субстратов. Выявлены виды грибного сообщества, которые при вермикомпостировании с E. fetida коровьего навоза с соломой ответственны за трансформацию органических соединений, способны обусловливать супрессивные свойства к фитопатогенам и патогенам человека. С применением метода посева и метабаркодинга дана характеристика таксономической структуры грибного сообщества на уровне разных таксонов при вермикомпостировании и в конечном продукте - вермикомпосте. Показано, что видовое богатство грибов снижается на начальном этапе вермикомпостирования и затем растет, в биогумусе значимо превышая таковое по сравнению с исходными субстратами. Выявлены

виды, преобладающие в вермикомпосте. Обсуждены различия в изменении грибного сообщества при компостировании и вермикомпостировании отходов. Наиболее контрастно это выражено в соотношении представителей отделов Ascomycota и Basidiomycota в грибном сообществе. Если в первом случае наблюдается рост доли базидиомицетов и падает доля аскомицетов, то в вермикомпосте, напротив, ниже представленность базидиомицетов, а доминируют аскомицеты. Рассмотрены возможности культурального метода и метабаркодинга на основе высокопроизводительного секвенирования ITS2 ДНК в изучении грибного сообщества вермикомпоста.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1396), гранта РФФИ 18-29-25073мк и госбюджетной темы № госрегистрации АААА-А16-116021660088-9.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

Кононенко Г. П. Токсигенные микромицеты-космополиты рода Aspergillus: новые факты последних десятилетий // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2021. № 4. С. 77–82.

Кураков А. В., Фуцян С., Харин С. А. Грибное сообщество компоста и его изменения при прохождении через пищеварительный тракт дождевого червя $Eisenia\ fetida\ //\$ Микология и фитопатология. 2019. Т. 53, N_2 5. С. 284–292.

М-МВИ-80-2008. Методика выполнения измерений массовой доли элементов в пробах почв, грунтов и донных отложений методами атомно-эмиссионной и атомно-абсорбционной спектрометрии. 000 Мониторинг. СПб., 2008. С. 27.

Садыкова В. С., Кураков А. В. Перспективы использования штаммов рода *Trichoderma* для получения вермикомпостов с фунгицидными и рост стимулирующими свойствами // Докл. РАЕН. 2013. № 2. С. 37–40.

Aira M., Monroy F., Dominguez J. Eisenia fetida (Oligochaeta: Lumbricidae) modifies the structure and physiological capabilities of microbial communities improving carbon mineralization during vermicomposting of pig manure // Microbial Ecol. 2007. Vol. 54, N 4. P. 662–671. doi: 10.1007/s00248-007-9223-4

Anastasi A., Varese G. C., Filipello Marchisio V. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost // Mycologia. 2005. Vol. 97, N 1. P. 33–44. https://doi.org/10,1080/15572536.2006.11832836

Arx von J. A. The Genera of fungi sporulating in pure culture. 3rd edn. J. Cramer. Vaduz, 1981. 424 p.

Booth C. Fusarium. Laboratory guide to the identification of the major species. C. M. I., 1977. 57 p.

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 Biol. 2007. Vol. 43 (Suppl. 1). P. S149—S156.
- Cadelis M. M., Nipper N. S. L., Grey A., Geese S., van de Pas S. J., Weir B. S., Copp B. R., Wiles S. Antimicrobial Polyketide Metabolites from *Penicillium bissettii* and *P. glabrum* // Molecules. 2022. Vol. 27, N 1. P. 240. https://doi.org/10.3390/molecules27010240
- Colombo A. L., Padovan A. C. B., Chaves G. M. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis // Clin. Microbiol. Rev. 2011. Vol. 24, N 4. P. 682–700. doi: 10.1128/CMR.00003-11
- Crous P. W., Braun U., Schubert K., Groenewald J. Z. The genus Cladosporium and similar dematiaceous hyphomycetes // Stud. Mycol. 2007. Vol. 58. P. 1–253.
- de Hoog G. S., Guarro J., Gené J., Figueras M. J. Atlas of Clinical Fungi. 3rd ed. Utrecht. CBS-KNAW. Fungal Biodiversity Centre, 2011. 1126 p.
- Dominguez J. State-of-the art and new perspectives on vermicomposting research // Earthworm Ecology / Ed. C. A. Edwards. 2nd Edition. CRC Press, 2004. P. 401–424. http://dx.doi.org/10.1201/9781420039719.ch20
- Dominguez J., Aira M., Crandall K. F., Perez-Losada M. Earthworms drastically change fungal and bacterial communities during vermicomposting of sewage sludge // Sci. Rep. 2021. Vol. 11, N 1. P. 15556. doi. org/10.1038/s41598-021-95099-z
- Dominguez J., Aira M., Gomez-Brandon M. Vermicomposting: earthworms enhance the work of microbes // Microbes at work: from wastes to resources / Eds. H. Insam, I. Franke-Whittle, M. Goberna. Berlin; Heidelberg: Springer, 2010. P. 93-114.
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of Soil Fungi. Second ed. Revised by W. Gams. IHW-Verlag et Verlagsbuchhandlung, Eching, 2007. 672 p.
- Ellis M. B. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 390 Surrey. England, 1971. 608 p.
- Gente S., Sohier D., Coton E., Duhamel C., Gueguen M. Identification of Geotrichum candidum at the species and strain level: proposal for a standardized protocol// J. Industr. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 33. Issue 12. P. 1019–1031. https://doi.org/10.1007/s10295-006-0130-3
- Gomez-Brandon M., Aira M., Lores M., Dominguez J. Changes in microbial community structure and function during vermicomposting of pig slurry // Bioresour. Technol. 2011. Vol. 102, N 5. P. 4171-4178. doi: 10.1016/j. biortech.2010.12.057
- Gomez-Brandon M., Lores M., Dominguez J. Species-Specific Effects of Epigeic Earthworms on Microbial Community Structure during First Stages of Decomposition of Organic Matter // PLoS One. 2012. Vol. 7, N 2. P. e31895. doi: 10.1371/journal.pone.0031895
- Gopal M., Bhute S. S., Gupta A., Prabhu S. R., Thomas G. V., Whitman W. B., Jangid K. Changes in structure and function of bacterial communities during coconut leaf vermicomposting // Antonie van Leeuwenhoek. 2017. Vol. 110, N 10. P. 1339–1355. doi: 10.1007/s10482-017-0894-7

- Gudeta K., Bhagat A., Julka J. M., Sinha R., Verma R., Kumar A., Kumari S., Ameen F., Bhat S. A., Amarowicz R., Sharma M. Vermicompost and Its Derivatives against Phytopathogenic Fungi in the Soil: A Review // Horticulturae. 2022. Vol. 8, N 4. P. 311. https://doi.org/10.3390/horticulturae8040311
- Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A. Dictionary of the Fungi (10th edition). Wallingford. UK: CAB International, 2008. 2600 p.
- Klich M. A. Identification of Common Aspergillus Species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 528 p.
- Monroy F., Aira M., Dominguez J. Changes in density of nematodes, protozoa and total coliforms after transit through the gut of four epigeic earthworms (Oligochaeta) // Appl. Soil Ecol. 2008. Vol. 39, N 2. P. 127–132. doi: 10.1016/j.apsoil.2007.11.011
- Neher D. A., Weicht T. R., Bates S. T., Leff J. W., Fierer N. Changes in Bacterial and Fungal Communities across Compost Recipes, Preparation Methods, and Composting Times // PLoS One. 2013. Vol. 8, N 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079512
- Raper K. B., Fennell D. I. The Genus Aspergillus. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1965. 686 p.
- Raper K. B., Thom C., Fennell D. I. A Manual of the Penicillia. New York; London: Hafner Publishing Company, 1968. 875 p.
- Richardson M. J. Diversity and occurrence of coprophilous fungi // Mycol. Res. 2001. Vol. 105, N 4. P. 387-402.
- Rifai M. A. A revision on the genus Trichoderma // Mycol. Pap. 1969. Vol. 116. P. 1–56.
- Ryckeboer J., Mergaert J., Vaes K., Klammer S., de Clerco D., Coosemans J., Insam H., Swings J. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes // Ann. Microbiol. 2003. Vol. 53, N 4. P. 349-410.
- Samson R. A., Houbraken J. Phylogenetic and taxonomic studies on the genera Penicillium and Talaromyces // Stud. Mycol. 2011. Vol. 70. P. 1–183.
- Schipper M. A. On certain species of Mucor with a key to all accepted species: 2. On the genera Rhizomucor and Parasitella // Stud. Mycol. 1978. Vol. 17. P. 1–71.
- Seifert K., Morgan-Jones G., Gams W., Kendrick B. The Genera of Hyphomycetes. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011. 997 p.
- Sivori A. S., Mercuri O. A., Forchiassin F. Kinetics of xylanase and cellulase production by Ascobolus gamundii (Fungi, Ascomycotina) // Rev. Argent. Microbiol. 1996. Vol. 28, N 1. P. 9-15.
- Stracquadanio C., Quiles J. M., Meca G., Cacciola S. O. Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by Trichoderma asperellum and Trichoderma atroviride in Liquid Medium // J. Fungi. 2020. Vol. 6, N 4. P. 263. doi: 10.3390/jof6040263
- Tuomela M., Vikman M., Hatakka A., Itavaara M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review // Biores. Technol. 2000. Vol. 72, N 2. P. 169–183.

The structure of the fungal community during the transformation of organic waste by Eisenia fetida worms

A. V. KURAKOV, E. N. BILANENKO

Lomonosov Moscow State University 119991, Moscow, Leninskie Gory, 1 E-mail: kurakov57@mail.ru

Changes in the taxonomic structure of the fungal community during the processing of cow manure with straw using Eisenia fetida worms were studied using fundamentally different methods - cultural and metabarkoding (by amplification and high-performance sequencing of ITS2 rDNA). Significantly more fungal taxa have been identified in substrates and vermicompost by application of metabarkoding than by plating method (66 and 33 species, respectively). Single species were identified simultaneously by both methods. The method of metabarcoding revealed OTE of Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Basidiobolomycota, Rozellomycota, Aphelidiomycota, fungi from Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota were isolated by culture method. The species richness of the community decreased during the first 10-20 days of substrate processing, then grew and reached maximum values in the vermicompost (60 days). Both methods showed the dominance of ascomycetes at all stages of transformation of sunstrates by E. fetida. Metabarcoding showed the dominance of sordariomycetes of the order Sordariales (48-53 %), mainly Zopfiella spp., fungi of the orders Pezizales, Microascales, Hypocreales, Pleosporales, Chaetothyriales, Onygenales, Eurotiales had the representation at the level of several percents. The increase of the portion of Chytridiomycota in the community (from 1,1 to 3.2 %) was observed during vermicomposting. At the same time, the representation of fungi of Mortierellomycota (5.7 to 1,5 %) of genus Mortierella and Basidiomycota (from 8 and 21 to 3 %) decreased with an increase in their diversity. Among the basidiomycetes, Coprinellus marculentus, Coprinellus subdisseminatus, Coprinus annuloporus, Occultifur sp prevailed. According to the plating method, ascomycetes also prevailed during waste processing and in the vermicompost, but it were other species - Diplodascus geotrichum, genera Penicillium, Aspergillus, Talaromyces, Trichoderma, Fusarium, mucoromycetes of the genus Mucor and basidiomycetes - Filobasidium wieringae. Fungi capable of decomposition of various polymer compounds in waste, active destructors of lignocellulose have been identified. Coprophiles, keratinophiles, thermophilic and thermotolerant species, representatives of the genera Trichoderma, Penicillium, capable of determining the suppressive properties of vermicompost to phytopathogens and human pathogens were found. The differences in mycobiota during composting and vermicomposting of various wastes are considered.

Key words: fungal communities, taxonomic structure, species diversity, cultural and molecular genetic methods, seeding and metabarkoding, vermicomposting, waste, manure, straw.