

УДК 629.782.519.711

МИКРОМИЦЕТЫ ЛИГНИНОВЫХ ШЛАМОТВАЛОВ

© 2013 К.Н. Синцов, Е.В. Старкова, Е.А. Мартинсон, С.Г. Литвинец

Вятский государственный университет, г. Киров

Поступила в редакцию 29.09.2013

Исследована микробная сукцессия, принимающая участие в разложении гидролизного лигнина в естественных условиях промышленного шламотвала, проведен скрининг дереворазрушающих микроорганизмов и выделены новые культуры, обладающие целлюлазной и лигнинолитической активностью.

Ключевые слова: *гидролизный лигнин, микромицеты, скрининг, ферментативная активность*

Одним из наиболее распространенных промышленных древесных отходов является гидролизный лигнин – отход гидролизно-спиртового производства. На полигонах гидролизных заводов, занимающих тысячи гектаров земельных угодий, миллионы тонн лигнина складывается десятилетиями, создавая серьезную экологическую угрозу обширного загрязнения прилегающих к предприятиям территорий. В литературе имеется значительное количество работ, посвященных биоконверсии лигноцеллюлозных отходов, однако экологические аспекты проблемы лигниновых шламотвалов как антропогенных экосистем остаются малоизученными.

Цель работы: изучение микробиокомплекса промышленного лигнинового шламотвала, оценка зависимости численности и разнообразия микромицетов от физико-химических свойств субстрата, а также скрининг новых природных штаммов микромицетов, обладающих целлюлазной и/или лигнинолитической активностью.

Пробы гидролизного лигнина (ГЛ) отбирали из промышленных шламотвалов на территории ООО «Кировский БиоХимЗавод». Пробоотбор проводили в сухую погоду с соблюдением необходимых требований стерильности [1]. Для данных исследований были выбраны старые, поросшие травянистой и кустарниковой растительностью отвалы лигнина 5-7 летней давности. Пробоотбор осуществляли методом квартования в четырех различных точках с глубины 50 см и с поверхности шламотвала. Всего было отобрано и исследовано 8 проб ГЛ. Для выделения, идентификации микроорганизмов и их культивирования применяли общепринятые микробиологические методы исследования [2, 3]. Навески проб ГЛ массой 10 г суспендировали в 100 мл стерильной воды на

качалке при 200 об/мин в течение 10 мин. Из суспензий готовили ряд стандартных разведений и высевали на картофельно-глюкозный агар (КГА). Инкубировали 4-7 суток при температуре $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Для каждой пробы определяли общее содержание всех микроорганизмов (ОМЧ) [4]. Выделение чистых культур микромицетов осуществляли путём последовательных пересевов отдельных колоний всех видов микроорганизмов выросших на КГА. Идентификацию микромицетов проводили на основании культуральных и морфологических признаков при их росте на КГА (характер роста колоний, цвет колоний, строение мицелия, характер спороношения, строение репродуктивных органов и т.д.) с использованием методов световой и сканирующей электронной (JEOL JSM-6510, Япония) микроскопии [5]. Для выявления целлюлозо- и лигнинолитической активности у выделенных микромицетов использовали диффузионные методы определения специфической ферментативной активности по образованию окрашенных продуктов (для скрининга продуцентов), а также методы поверхностного твердофазного и глубинного культивирования с использованием селективных питательных сред. Для выявления штаммов-продуцентов целлюлазы использовали метод выращивания культур на агаризованной синтетической питательной среде с добавлением 0,1% карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) с последующим окрашиванием 0,1% раствором конго красного [6]. О степени целлюлазной активности выделенных штаммов судили по величине индекса (отношения) $(D_2)/(D_1)$, где D_1 – диаметр выросшей колонии, а D_2 – диаметр зоны просветления агара вокруг растущей колонии. Пробы инкубировали 3 суток при 28°C . Для определения способности выделенных культур микромицетов к синтезу экстрацеллюлярных фенолоксидаз использовали посев на сусло-агар, содержащий 0,12% танина в качестве субстрата фермента (метод Бавендамма) и агаризованную глюкозо-аммонийную среду с 0,12% пирокатехина (модифицированный метод Бавендамма) [7]. Наличие специфической ферментативной активности грибов оценивали по величине зоны изменения окраски среды вокруг растущей колонии. Пробы инкубировали при 28°C в течение 4 суток. Измерения проводили по окончании срока инкубации.

Синцов Константин Николаевич, лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории «Биологически активные вещества и биополимеры»

Старкова Екатерина Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Биологически активные вещества и биополимеры»

Мартинсон Екатерина Александровна, кандидат технических наук, заведующий кафедрой биотехнологии. E-mail: biotech.vgu@gmail.com

Литвинец Сергей Геннадьевич, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры биотехнологии

Твердофазное культивирование проводили на сыпучих средах на основе сосновых опилок с добавлением жидкой модифицированной питательной среды Кирка до конечной влажности субстрата 62-65%. На 3, 7 и 10 сутки культивирования анализировали содержание в субстрате легко-, трудно- и не гидролизующихся полисахаридов. Определение легко- и трудногидролизующихся полисахаридов в древесных опилках осуществляли методом проведения кислотного гидролиза с последующим анализом общего количества образовавшихся моносахаридов по редуцирующей способности [8]. Для глубинного культивирования использовали жидкую модифицированную питательную среду Кирка с добавлением гидролизного лигнина (1%). Культивировали на качалке при 28°C и 130 об/мин. Определение оксидазной активности ферментов культуральной жидкости осуществляли методом спектрофотометрии через 1, 3, 7 и 10 суток культивирования [7]. Для этого 10 мл 0,02 М раствора пирокатехина в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере (рН 4,5) выдерживали при 30°C в течение 10 мин. Затем к раствору приливали 1 мл фильтрата культуральной жидкости грибных культур, выдерживали раствор при 30°C в течение

10 мин и измеряли его оптическую плотность на спектрофотометре Shimadzu UV-mini 1240 (Япония) при 410 нм.

Формирование микоченоза и проявление физиологической активности древоразрушающих грибов в природных условиях сопряжено с целым комплексом внешних биотических и абиотических параметров: влиянием гидрологических, эдафических, климатических факторов, взаимодействием с видами-конкурентами и другими, в том числе с растительными организмами и т.д. Очевидно существенное влияние на развитие грибов со стороны их природного субстрата. По мнению многих авторов, лигнин как компонент этого субстрата способен оказывать влияние на процессы развития, физиологические особенности и морфогенез культуры *in situ* [9]. При исследовании физико-химических свойств проб лигнина были получены следующие результаты: влажность поверхностных проб варьировала в пределах 45,8-49,96%, в глубинных пробах этот показатель составил 59,94-61,45%. Среднее значение показателя кислотности глубинных проб составило 3,65 (3,08-4,21), суспензии поверхностных проб – 4,05 (3,42-5,01) (табл. 1).

Таблица 1. Физико-химические свойства проб гидролизного лигнина

№ пробы	Глубина отбора пробы	Влажность пробы, %	рН пробы	ОМЧ, КОЕ/мл
1	поверхностная	45,8±0,07	3,67±0,02	1,15 × 10 ⁷
	50 см	59,97±0,8	3,56±0,01	1,22 × 10 ⁵
2	поверхностная	45,99±0,45	4,09±0,01	8,5 × 10 ⁹
	50 см	59,94±0,54	3,73±0,005	6,24 × 10 ⁵
3	поверхностная	45,99±0,26	5,01±0,02	7,5 × 10 ⁹
	50 см	61,45±0,99	4,21±0,02	4,25 × 10 ⁵
4	поверхностная	49,96±0,47	3,42±0,02	4,35 × 10 ⁵
	50 см	60,11±1,13	3,08±0,01	3,44 × 10 ⁵

Систематическую принадлежность микромицетов определяли по совокупности характерных морфологических, культуральных и физиологических признаков, учитывая особенности их жизненного цикла. В результате микробиологических исследований получены следующие результаты: всего в ходе работы из восьми проб гидролизного лигнина было выделено 105 чистых культур микроорганизмов. Среди них бактерий, принадлежащих к родам *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Flavobacter* – 30 культур; актиномицетов рода *Streptomyces*, *Nocardia* – 12 культур; микромицетов – 63 культуры. В микромицетном комплексе шламootвалов гидролизного лигнина выявлены представители 15 родов принадлежащих к трем классам – Ascomycetes (*Arachnoteca*, *Fusarium*, *Microascus*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Cephalosporium*, *Phaescopulariopsis*), Deuteromycetes (*Penicillium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Phialophora*, *Cladosporium*) и Zygomycetes (*Absidia*, *Mucor*, *Syncephalastrum*). Большинство выделенных культур (42 культуры) является представителями класса Deuteromycetes, среди которых доминировал род *Penicillium* (9 видов, 19 изолятов), *Trichoderma* (3 вида, 14 изолятов) и *Gliocladium* (3 вида, 6 изолятов). С

меньшим видовым разнообразием, но достаточно часто обнаруживались представители класса Ascomycetes и Zygomycetes.

Во всех точках пробоотбора общее микробное число в поверхностных пробах было выше, чем в глубинных (табл. 1). Родовое и видовое разнообразие представителей микофлоры также больше в поверхностных слоях шламootвала. Самое большое видовое разнообразие микромицетов (14 видов) выявлено в одной из поверхностных проб. Вероятно, агрессивная среда, обусловленная низким значением рН «свежего» ГЛ, имеет первостепенное лимитирующее значение на начальных этапах формирования сукцессии шламootвала. Однако со временем, по мере вымывания кислоты атмосферными осадками, формирование специфической микобиоты начинают в большей степени определять такие факторы, как аэрация, температура и структура субстрата, а также наличие легкоусвояемых питательных веществ. Этим, вероятно, и обусловлена большая численность и видовое разнообразие микроорганизмов в поверхностных слоях шламootвала.

Для оценки биотехнологического потенциала выделенных штаммов микромицетов в качестве

потенциальных продуцентов целлюлаз и фенолоксидаз использовали комплекс методов позволяющих последовательно выделить из всех культур грибы-продуценты и оценить их физиологическую (ферментативную) активность. На способность к синтезу целлюлаз были протестированы 70 культур микроорганизмов. Большинство выделенных культур проявило в различной степени способность синтезировать целлюлозолитические ферменты. У 32 штаммов размер зоны просветления был больше размера колонии ($D_2/D_1 > 1$), у остальных 20 культур диаметр зоны просветления не превышал диаметра колонии ($D_2/D_1 \leq 1$). Наибольшую активность целлюлаз проявили микромицеты рода *Penicillium*. Показано существенное различие по целлюлозолитической активности различных штаммов грибов этого рода. Из всех протестированных культур микромицетов 18 изолятов не показали целлюлазной активности.

В ходе работы по скринингу лигнинолитической активности было протестировано 49 культур микромицетов. Способность выделенных штаммов к образованию экстрацеллюлярных фенолоксидаз оценивали по соотношению диаметра выросшей колонии и диаметра зоны темно-коричневого окрашивания (оригинальный метод Бавендамма) и зоны просветления (модифицированный метод Бавендамма) агаризованной среды вблизи растущего мицелия [7]. Модифицированный метод Бавендамма на глюкозо-аммонийной среде с 0,12% пирокатехина был использован с целью сравнения результатов отбора с разными субстратами гриба и разными субстратами фермента. На агаризованном сусле с танином большинство микромицетов (40 культур) дали отрицательную реакцию Бавендамма

на экстрацеллюлярные фенолоксидазы. Остальные культуры проявили два типа цветных реакций – у 8 наблюдалось просветление агара вокруг колонии и только 1 штамм *Arachnoteca glomerata* (15 ГЛ) дал положительную реакцию с появлением темно-коричневого окрашивания субстрата в зоне роста колонии. При росте на агаризованной глюкозо-аммонийной среде с пирокатехином (модифицированный метод Бавендамма), напротив, практически все протестированные штаммы дали однотипную (в виде просветления агара) положительную реакцию на фенолоксидазную активность. Максимальную активность в данном тесте проявили 6 культур представителей рода *Penicillium*. Важно отметить, что при этом 4 из них дали отрицательную реакцию на наличие оксидаз на агаризованном сусле с танином и только у одной культуры высокая фенолоксидазная активность была зафиксирована в обоих тестах. Полученные данные свидетельствуют о несовпадении результатов скрининга микромицетов на фенолоксидазную активность, полученных при использовании двух модификаций метода Бавендамма. Это может быть связано с тем, что деструкция лигнина предполагает наличие у грибов мультиэнзиматических комплексов, что подразумевает определенную multifunctionality ферментативной системы и, как следствие, различие субстратной специфичности ферментов и разнообразие продуктов метаболизма. Поэтому использование данных методов для первичного скрининга необходимо дополнять исследованиями методами поверхностного или глубинного культивирования с последующим спектрофотометрическим определением ферментной активности в культуральной среде.

Таблица 2. Содержание легкогидролизуемых (ЛГ ПС), трудногидролизуемых (ТГ ПС) и негидролизуемых (НГ остаток) полисахаридов в составе среды при поверхностном культивировании микромицетов на сосновых опилках

Культи- вирова- ние (сутки)	Показатель	Лабораторный номер исследуемой культуры					
		конт- роль	15 ГЛ	22 ГЛ	63 ГЛ	67 ГЛ	74 ГЛ
0	ЛГ ПС	17,73	-	-	-	-	-
	ТГ ПС	42,38	-	-	-	-	-
	НГ остаток	26,44	-	-	-	-	-
3	ЛГ ПС	-	16,85	17,67	16,97	17,72	16,47
	ТГ ПС	-	28,09	37,42	37,06	35,56	29,44
	НГ остаток	-	30,35	31,65	31,05	26,67	29,94
7	ЛГ ПС	-	16,19	17,29	17,43	16,44	16,46
	ТГ ПС	-	27,08	36,65	34,18	28,54	26,15
	НГ остаток	-	29,18	31,47	27,55	27,45	29,65
10	ЛГ ПС	-	16,48	17,26	18,26	17,68	17,31
	ТГ ПС	-	26,85	36,71	33,34	27,57	33,31
	НГ остаток	-	28,76	29,45	28,11	28,42	29,91

Для исследований методами твердофазного и глубинного культивирования были выбраны несколько культур микромицетов с лучшими показателями роста и ферментативной активности в скрининговых тестах: *Arachnoteca glomerata* (15

ГЛ); *Penicillium cyaneum* (22 ГЛ); *Trichoderma viride* (63 ГЛ); *Gliocladium virens* (67 ГЛ); *Penicillium crustosum* (74 ГЛ). Поскольку полисахариды древесины в связи с особенностями их надмолекулярной структуры разделяют на легкогидролизуемые

(гемицеллюлозы), трудногидролизуемые (целлюлоза) и негидролизуемый остаток (лигнин) – способность выбранных культур микромицетов осуществлять биодеструкцию лигнина и целлюлозу оценивали по изменению содержания этих компонентов в процессе культивирования на сосновых опилках. Эффективность потребления субстрата оценивали на 3, 7 и 10 сутки культивирования (табл. 2). Результаты поверхностного культивирования свидетельствуют о способности всех выбранных культур микромицетов к расщеплению целлюлозы и, следовательно, к синтезу комплекса внеклеточных целлюлаз. Три из пяти культур – *Arachnotheca glomerata* (15 ГЛ), *Penicillium cyanum* (22 ГЛ) и *Trichoderma viride* (63 ГЛ) начиная с 3-х суток культивирования в незначительной степени способны расщеплять лигнин, а *Gliocladium virens* (67 ГЛ) и *Penicillium crustosum* (74 ГЛ) – гемицеллюлозу.

Оценку фенолоксидазной активности выделенных культур проводили при глубинном культивировании на среде Кирка с добавлением 1% ГЛ и 1% глюкозы. Максимальное значение активности экстрацеллюлярных фенолоксидаз в культуральной жидкости было выявлено на 7 сутки культивирования *Arachnotheca glomerata* (15 ГЛ). Известно, что биотрансформация ГЛ в естественных условиях процесс крайне медленный. Он сопровождается поэтапным появлением микроорганизмов различных физиологических групп и определяется экологической и биохимической природой сукцессионных преобразований субстрата. Для изучения этого процесса *in vitro* обычно используется один штамм микроорганизма-деструктора, хотя в природе этот процесс осуществляется их консорциумом.

Выводы: все вышесказанное свидетельствует о целесообразности создания располагающих достаточным объемом экспериментального

материала коллекций чистых культур различных микроорганизмов, участвующих в деструкции лигнина, для изучения возможных аддитивных эффектов при их совместном культивировании. Проведение синэкологических работ по изучению комплекса микромицетов лигниновых шламоотвалов имеет значение как для понимания структуры и закономерностей формирования специфических антропогенных экосистем, так и в связи с возрастающим интересом к микромицетам как продуцентам биологически активных веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. ГОСТ 17.4.4.02-84.
2. Егорова, Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Изд-во Московского университета, 1995. 224 с.
3. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Под ред. В.И. Билай / И.А. Дудка и др. – Киев.: Наукова думка, 1982. 551 с.
4. Методы микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации. № ФЦ/4022. – 2004.
5. Самтон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Самтон, А. Фотергилл, М. Ринальди. – М.: Мир, 2001. 470 с.
6. Соловьева, И.В. Получение и свойства мутантов *Penicillium verruculosum* – суперпродуцентов целлюлаз и ксилоназ / И.В. Соловьева, О.Н. Окунев, В.В. Вельков и др. // Микробиология. 2005. Т. 74. №2. С. 172-178.
7. Русинова, Т.В. Разработка технологии биосинтеза фермента лакказы базидиальными грибами рода *Trametes*: дисс. ... канд. техн. наук. – М., 2007. 191 с.
8. Базарнова, Н.Г. Химия древесины и ее основных компонентов. Методическое пособие. – Барнаул: «Азбука», 2002. 49 с.
9. Фенгел, Д. Древесина: химия, ультраструктура, реакции / Д. Фенгел, Г. Вегенер. – М.: Лесная промышленность, 1988. 512 с.

MICROMYCETES FROM THE LIGNIN SLUDGE STORES

© 2013 K.H. Sintsov, E.V. Starkova, E.A. Martinson, S.G. Litvinets

Vyatka State University, Kirov

The microbic succession which is taking part in decomposition of hydrolytic lignin under natural conditions of industrial sludge store is investigated, screening of wood destroying microorganisms is carried out and new cultures possessing cellulose and ligninolytic activity are allocated.

Key words: hydrolytic lignin, micromycetes, screening, fermentative activity

Konstantin Sintsov, Laboratorian-Researcher at the Scientific Research Laboratory "Biologically Active Substances and Biopolymers"

Ekaterina Starkova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Scientific Research Laboratory "Biologically Active Substances and Biopolymers"

Ekaterina Martinson, Candidate of Technical Sciences, Head of the Biotechnology Department. E-mail: biotech.vgu@gmail.com

Sergey Litvinets, Candidate of Agriculture, Associate Professor at the Biotechnology Department