

УДК 577

К. А. Вырасткова, И. Г. Широких

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ МИКРОМИЦЕТОВ НА ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Представлены результаты работы по изучению кинетических и целлюлозолитических свойств 21 природного изолята микромицетов. Выделение культур осуществляли общепринятыми методами из почвы, отобранной на территории Государственного природного заповедника «Нургуш». Первичный отбор перспективных культур осуществляли по их кинетическим характеристикам: высокая (≥ 16 мм/сут) или умеренная (≥ 6 мм/сут) удельная скорость роста на солодовом агаре. На следующем этапе были использованы два различных метода определения целлюлозолитической активности: визуальное определение роста грибов на фильтровальной бумаге с использованием балловой шкалы Билай и тест с Конго красным на агаре с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ). По совокупности полученных результатов были выявлены три штамма микромицетов, сочетающие высокую удельную скорость роста с активностью целлюлаз на уровне четырех баллов, и образовавшие зоны разрушения КМЦ в тесте с Конго красным, величиной 65-70 мм. Полученные культуры микромицетов-целлюлозолитиков представляют интерес для разработки технологий утилизации растительных отходов в процессе производства сельскохозяйственной продукции.

Ключевые слова: микромицеты, выделение, целлюлазная активность, скорость роста.

Деградация целлюлозы в почве, совершаемая грибами, занимает одно из важных звеньев в процессе круговорота веществ в природе и создании почвенного плодородия. Целлюлазные свойства установлены у многих сотен видов и тысяч природных изолятов грибов различного происхождения и систематической принадлежности, как при культивировании на целлюлозных субстратах, так и при их развитии в природе [1].

Обитающие в почве целлюлозоразрушающие грибы имеют большее, чем бактерии, значение в разложении растительных остатков и образовании гумуса [2]. Несмотря на то, что многие микромицеты способны синтезировать целлюлозолитические ферменты, имеющие разнообразное биотехнологическое применение, на практике используют небольшое количество грибных культур. При выборе продуцента целлюлаз для применения в тех или иных биотехнологических процессах необходимо учитывать такие показатели как безвредность; активность биосинтеза (скорость роста, скорость синтеза фермента); степень использования, доступность, стоимость сырья; чувствительность к условиям культивирования; стабильность. Только по совокупности свойств микроорганизма и производственных требований оценивают практическую пригодность и ценность продуцента [3].

Известно значительное число видов микроскопических грибов, разных систематических групп, поражающих целлюлозосодержащие субстраты. К их числу относятся: *Mucor sp.*, *Botrytis sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichothecium roseum*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Chaetomium sp.*, *Stachybotrys atra*, *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma koningii*, *Agrostalagmus cinnabarinus* и некоторые другие. При этом такие грибы, как *Cladosporium herbarum*, *Alternaria sp.*, *Chaetomium sp.*, *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp.* отмечены, в большинстве случаев, как почвенные целлюлозоразрушающие грибы [2]. В связи с этим целесообразно вести поиск перспективных штаммов для деструкции растительных остатков среди почвообитающих микромицетов.

Целью данного исследования является оценка целлюлозолитической активности микромицетов, выделенных из почв на территории Государственного природного заповедника «Нургуш».

Выделение культур микромицетов осуществляли общепринятыми методами посева из разведений суспензий на агаризованную среду Чапека без сахарозы. В качестве источника углерода на поверхности среды в чашках Петри

размещали стерильные диски из фильтровальной бумаги (целлюлозы). Для селективного ограничения роста бактерий в среду добавляли цефазолин (100 мкг/мл). Чашки с посевами инкубировали при 28 °С с последующим отсевом отдельных колоний и получением чистых культур на солодовом агаре.

Для отбора перспективных штаммов микромицетов изучали кинетику их роста на плотной среде. Для этого уколом производили посев спор десятисуточных культур микромицетов на поверхность солодового агара. Радиальную скорость роста определяли путем измерения прироста диаметра колоний за определенный промежуток времени. Для расчета использовали формулу:

$$K_r = \frac{d_2 - d_1}{t_2 - t_1},$$

где K_r – радиальная скорость роста, мм/сут;

d_1 и d_2 – диаметр колоний, мм;

t_1 и t_2 – начальный и конечный моменты времени измерения соответственно, сут.

Далее в работе были использованы два метода определения целлюлозолитической активности культур: качественный метод визуального определения роста грибов на фильтровальной бумаге [4] и тестирование с Конго красным на среде с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) [5].

В первом случае посев грибов проводили на полоски фильтровальной бумаги, погруженные одним концом с жидкую минеральную среду Чапека в пробирках. Инкубирование проводили в термостате. По истечении 10 суток визуально отмечали деградацию субстрата по пятибалльной шкале: 0 – полное отсутствие роста, 1 – 2 балла (+, ++) – слабый рост мицелия гриба, спорообразование отсутствует, отсутствие разрушенных участков целлюлозы, 3 – 4 балла (+++, +++) – наличие обильного и хорошо развитого мицелия, обволакивающего целлюлозный субстрат, **деградация субстрата** [4].

Биологические науки

Во втором тесте посев гриба производили единичным уколом в центр чашки Петри на плотную среду Гетчинсона с добавлением КМЦ в качестве единственного источника углерода. Инкубирование проводили также при 27 °С в течение 4 суток. Затем поверхность чашек с выросшими колониями микроорганизмов заливали 0,1 % водным раствором красителя Конго красный и инкубировали 15 минут при комнатной температуре, после чего краситель убрали и добавляли 1М раствор NaCl, инкубируя еще 10 минут. По величине зоны просветления около тестируемого микроорганизма судили о степени его целлюлозолитической активности, учитывая при этом, что продукты разрушения целлюлозы красителем не окрашиваются [5].

Всего в данном исследовании был выделен и изучен 21 почвенный изолят микромицетов (табл.).

Таблица 1

**Результаты изучения свойств микромицетов-целлюлозолитиков,
выделенных из почв заповедника «Нургуш»**

№	Штамм	*K _r , мм/сут	**Балл по методу Билай, 1983	***Зона разрушения КМЦ, мм
1	H – 1.2.1	4,25	+++	17
2	H – 1.2.3(1)	4,50	+++	18
3	H – 1.2.3(2)	9,00	+++	36
4	H – 1.2.5	5,75	–	23
5	H – 1'.1.1(1)	16,25	++++	65
6	H – 1'.1.1(2)	17,50	++++	70
7	H – 1'.2.1	2,46	++	32
8	H – 1'.2.2	17,50	++++	70
9	H – 2.2.1	5,00	++++	20
10	H – 2.2.2	4,50	+++	18
11	H – 2.3.1	5,75	++++	23
12	H – 2.3.2	3,50	++++	14
13	H – 2'.1.1	–	++++	0
14	H – 2'.1.2	6,54	+++	85

Биологические науки

15	Н – 2'.2.1(1)	2,75	++	11
16	Н – 2'.2.1(2)	–	++	–
17	Н – 2'.2.1(3)	4,08	+++	53
18	Н – 2'.3.1	11,25	++	45
19	Н – 2'.4.1(1)	3,75	++	15
20	Н – 2'.4.1(2)	–	+	–
21	Н – 2'.4.2	–	+++	–

Примечания:

* K_r – удельная скорость роста колоний на солодовом агаре;

** Визуальное определение роста грибов на фильтровальной бумаге по шкале Билай (1983);

*** Тест с Конго красным, не окрашивающим продукты разложения целлюлозы.

По совокупности полученных результатов были определены как наиболее перспективные три культуры микромицетов Н – 1'.1.1(1), Н – 1'.1.1(2) и Н – 1'.2.2, сочетающие высокую удельную скорость роста (16-17 мм/сут) с активностью целлюлаз по методу Билай на уровне четырех баллов, и образовавшие зоны разрушения КМЦ в тесте с Конго красным величиной 65-70 мм. Кроме них интерес для последующей проверки представляет штамм Н – 2'.1.2, выделившийся по способности разрушать КМЦ (зона разрушения 85 мм), но проявивший умеренные рост (6,54 мм/сут) и способность обрастать целлюлозу (три балла по шкале Билай). Способностью быстро колонизировать субстрат отличались еще два штамма грибов – Н – 1.2.3(2) (9 мм/сут) и Н – 2'.3.1 (11,25 мм/сут). Они же характеризовались умеренной активностью в отношении разрушения КМЦ (36 и 45 мм соответственно) и обрастания целлюлозы (2-3 балла по шкале Билай). Скорость удельного роста других исследованных штаммов значительно уступала выше отмеченным культурам грибов, варьируя в пределах от 2,5 до 5,7 мм/сут, а величина зон деструкции КМЦ у них колебалась от 17 до 23 мм. По степени обрастания целлюлозы (фильтровальной бумаги) лишь 5 культур из исследованных 21

характеризовались слабой активностью (табл.). А не проявил активности в разрушении КМЦ лишь один грибной изолят – Н – 2'.1.1.

Таким образом, выделение из почвы ГПЗ «Нургуш» 21 культуры микроскопических грибов и изучение их кинетических и целлюлозолитических свойств в лабораторных условиях позволило выявить штаммы, сочетающие способность к быстрой колонизации субстрата с активным синтезом ферментов класса целлюлаз. Выявленные штаммы микромицетов-целлюлозолитиков представляют интерес для разработки технологий утилизации растительных отходов в процессе производства сельскохозяйственной продукции.

Список литературы

1. *Киреева Н. А., Мифтахова А. М.* Микромицеты-целлюлозолитики нефтезагрязненных почв // Вестн. Башк. ун-та. – 2004. – № 4. – С. 51–56.
2. *Билай В. И.* Биологически активные вещества микроскопических грибов и их применение. – Киев : Изд-во «Наук. думка», 1965. – 267 с.
3. Эколого-биотехнологические аспекты конверсии растительных субстратов : учеб. пособие / сост. В. П. Саловарова, Ю. П. Козлов. – М. : Изд-во РУДН, 2001. – 331 с.
4. Методы экспериментальной микологии : сб. / под ред. В. И. Билай. – Киев : Наук. думка, 1973. – 243 с.
5. *Teather R. M., Wood P. J.* Use of congo-red polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria the bovine rumen // Appl. Environ Microbiol. – 1982. – V. 43. – P. 777–780.

ВЫРАСТКОВА Ксения Александровна – студентка кафедры Микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: ksyu.vyrastkova@mail.ru

ШИРОКИХ Ирина Геннадьевна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Института биологии и биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: irgenal@mail.ru