

УДК 577.15.086.83

НЕВМЕРЖИЦЬКА О.М., кандидат с.-г. наук,
Житомирського національний агроекологічний університет,
НУРМУХАММЕДОВ А. К., доктор с.-г. наук, с.н.с.,
ВАСІЛЬЄВА Н.О., завідувача лабораторією
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України,
e-mail: n_vasilyeva@ukr.net

ПОШУК МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ БІОДЕГРАДАЦІЇ ЦЕЛЮЛОЗОВМІСНОЇ СИРОВИНИ З ВТОРИННИХ РЕСУРСІВ І ВІДХОДІВ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА

З лісової підстилки мішаних лісів віком 35–55 років виділено 213 ізолятів грибів-деструктантів, які належали до 7 родів - *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Verticillium* і *Aureobasidium**Penicillium*. Серед них переважали гриби роду *Fusarium* - 4 види, 3 види роду *Aspergillus* і по-одному виду - *Verticillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aureobasidium*. Найбільшу активність в деструкції целюлози і геміцелюлози виявили гриби *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* і *Aureobasidium pululans*.

Ключові слова: мікроорганізми, гриби, целюлоза, деструкція, біодеградація, ферменти

Вступ. Відомо, що целюлоза є одним із найпоширеніших в природі рослинних полімерів. Щорічний приріст рослинних органічних сполук (рослинної біомаси) в процесі біосинтезу складає близько 2-х трильйонів тонн, приблизно 1/3 цього припадає на целюлозу [5]. Однак, природна целюлоза має кристалічну структуру і її біодеградація ускладнена. Крім того, лігнін, який знаходиться у складі лігноцелюлози, ускладнює її доступність для молекул ферментів. Тому для підвищення ефективності біодеструкції целюлозовмісної сировини (ЦВС) необхідна попередня її обробка целюлітичними і лігнолітичними ферментами [1, 4]. Процес передобробки лігноцелюлози за допомогою біологічних агентів є найбільш перспективним, оскільки при застосуванні фізичних, механічних та хімічних методів передобробки ЦВС витрати енергії складають більше 20% [2, 3].

Мета. Проведення скринінгу видів грибів-деструктантів, виділених із природних ценозів для виявлення видів, перспективних для попередньої обробки та подальшої деструкції соломи.

Матеріали та методика досліджень. Виділення грибів-деструктантів целюлози проводилось протягом 2009–2011 рр. із природних ценозів. Ізоляція чистих культур грибів, відібраних із лісової підстилки, проводилось на середовищах Ван-Ітерсона та Чапека. Для усунення сторонніх мікроорганізмів зразок стерилізували обпалюванням в полум'ї спиртівки і поміщали на живильне середовище. Тривалість інкубації складала 30–60 діб за температури +25°C. Мікроорганізми, які окислюють целюлозу, виявляли за методикою В.Л. Омелянського. Для визначення целюлолітичної активності досліджуваний штам культивували протягом 30 діб на рідкому живильному середовищі наступного складу (в грамах на 100 мл дистильованої води): KNO_3 - 1,25; K_2HPO_4 - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,005; NaCl - 0,25; $\text{Mn}_2(\text{SO}_4)_3$ - 0,005; КМЦ (карбоксиметилцелюлоза) – 5,0. Для вивчення морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей культур використовували стандартні мікробіологічні середовища і методи.

Кількісне визначення глюкози, утвореної при гідролізі після росту грибів визначали за методикою Хагердона-Ієнсена. Дослідження проводили в лабораторії кафедри технології зберігання і переробки сільськогосподарської продукції Житомирського національного агроекологічного університету.

Результати досліджень. Для виділення грибів-деструктантів в Житомирській та суміжних областях протягом червня-серпня відбирали проби з лісової підстилки лісів віком 35–55 років, де сформовані стабільні мікробіоценози. Із трав'яних екосистем проби відбирались також із підстилки у травні-серпні, коли спостерігалася найбільша активність грибів. За роки досліджень відібрано всього 210 проб, з яких в чисту культуру виділено 213 ізолятів целюлозоруйнуючих грибів (табл. 1).

Для ідентифікації грибів-деструктантів досліджено їх основні біологічні і морфологічні особливості. Зокрема, основними систематичними ознаками, за якими визначали види грибів, є морфологічні особливості макроконідій (будова, розміри і форма, кількість перетинок, форма та розміри верхньої клітини, наявність ніжки, ввігнутість), а також мікроконідій і хламідоспор.

Таблиця 1

Роди грибів, виділені із лісової підстилки в культуру Ван-Ітерсона (за ростом на фільтрувальному папері), 2009-2011 рр.

Роди грибів	Кількість ізолятів, шт.	Роди грибів	Кількість ізолятів, шт.
<i>Fusarium</i>	131	<i>Aspergillus</i>	47
<i>Penicillium</i>	9	<i>Aureobasidium</i>	2
<i>Trichoderma</i>	17	<i>Cladosporium</i>	4
<i>Verticillium</i>	3		

Найбільша кількість ізолятів належать до роду *Fusarium* – 61,5%, до *Aspergillus* – 22,1%, до *Trichoderma* – 8,0%, гриби родів *Verticillium* і *Cladosporium* знаходились в межах 1,4–1,9%. Найменша кількість ізолятів -0,9% - належала до роду *Aureobasidium*.

Визначення видової приналежності виділених культур грибів-деструктантів показало, що серед них переважали гриби роду *Fusarium* - 4 види, 3 види роду *Aspergillus* і по-одному виду - *Verticillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aureobasidium* (рис. 1).

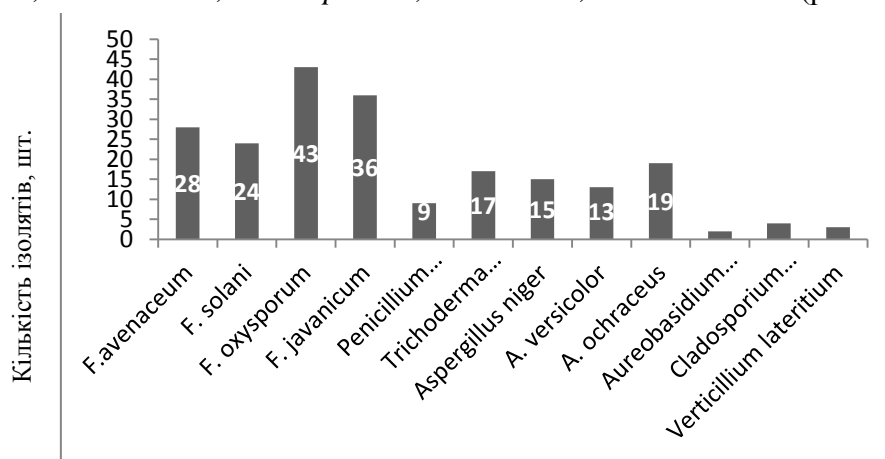


Рис. 1. Первинні культури грибів-деструктантів виділені з лісової підстилки, 2009-2011рр.

Практичний інтерес представляють гриби роду *Trichoderma*, зокрема штам *T. hamatum* ЗН-6, який виявив високу антагоністичну активність щодо збудників фузаріозної гнилі (*Fusarium oxysporum*) і бурої гнилі (*Rhizoctonia solani*) коренеплодів цукрових буряків, що нами було опубліковано раніше. Штам *T. hamatum* ЗН-6 характеризувалися безбарвними, гладенькими розгалуженими гіфами, білувато-зеленою конідієносною зоною. Конідієносці утворюють маленькі подушечки в нижній частині. Конідії білувато-зелені, циліндричні, видовжені і біля верхівки звужені. На стандартному середовищі Чапека колонії штаму, *T. hamatum* ЗН-6 при температурі 22°C, досягають країв чашки Петрі за 4-6 днів. Міцелій безбарвний, павутинний. Спорношення з'являється на 5-12 день росту, розміщення рівномірне або концентричними зонами, часто тільки скраю колонії. Забарвлення сіро-зелене, синьо-сіре, іноді брудно-зелене або темно-зелене. Зворотня сторона колонії безбарвна. Пігмент в середовище не виділяється. Запах даного ізоляту нагадує грибний. Гіфи безбарвні, гладенькі. Конідієносці незабарвлені, гладенькі, прямі, розгалужені через рівні проміжки, гілочки короткі і товсті, розміщені по дві-чотири, іноді по-одній, розходяться під прямим кутом до конідієносця. Конідії сіро-зелені, еліптичні, гладенькі.

Було встановлено, що найбільша кількість глюкози утворювалася у грибів *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* і *Aureobasidium pululans*, і складала 0,82, 1,43 і 0,68 мг/мл, відповідно. Штам *Trichoderma hamatum* ЗН-6 утворював відносно невисоку кількість глюкози в середовищі – 0,28 мг/мл (табл. 3).

Таблиця 3.

Целюлолітична активність грибів по Хагердону-Іенсену

Вид	Кількість глюкози, мг/мл
<i>Aspergillus niger</i>	0,82
<i>Aspergillus versicolor</i>	1,43
<i>Aureobasidium pululans</i>	0,68
<i>Penicillium fulnicrelosum</i>	0,48
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,32
<i>Trichoderma hamatum</i> ЗН-6	0,28

Наразі продовжуються дослідження з поглибленого вивчення активності целюлітичних і лігнолітичних ферментів мікроорганізмів, оптимізації умов їх культивування та пошуку шляхів підвищення ефективності біодеструкції соломи.

Висновки. 1. З лісової підстилки мішаних лісів віком 35–55 років Житомирської і суміжних областей, у яких сформовані стабільні мікробні співтовариства, було виділено 213 ізолятів грибів-деструктантів, які належали до 7 родів - *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Verticillium* та *Aureobasidium*. Серед виділених культур грибів переважали гриби роду *Fusarium* - 4 види, 3 види роду *Aspergillus* і по-одному виду - *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Verticillium* та *Aureobasidium*.

2. Оцінка активності деструкції целюлози і геміцелюлози за кількістю утворення глюкози показала, що найбільш активними виявилися гриби *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* і *Aureobasidium pululans*. Представляє практичний інтерес також штам *Trichoderma hamatum* ЗН-6 (номер у Національній колекції штамів мікроорганізмів – ІМВ F – 100060), якій показав антагоністичні властивості по відношенню до збудників фузаріозної і бурої гнилей коренеплодів цукрових буряків.

Список використаних літературних джерел

1. Богдановская Ж.Н. Микробиологическая трансформация целлюлозо-содержащих материалов. Изд-во «Наука и техника», Минск, 1986, 55 с.
2. Калунянц К.А., Голгер Л.И. Микробные ферментные препараты, М. 1979, 118с.
3. Михайлова Р.В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии, РУП «Издательский дом «Белорусская наука», 2007, 407 с.
4. Роговин З.А. Химия целлюлозы, М., 1972, 519 с.
5. Сеницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Учеб.пособие, М: Изд-во МГУ, 1995, 224 с.

Аннотация

Невмержицкая О.М., Нурмухаммедов А.К., Васильева Н.А.

Поиск микроорганизмов для биодegradации целлюлозосодержащего сырья из вторичных ресурсов и отходов сельского хозяйства

Из лесной подстилки смешанных лесов возраста 35-55 лет выделено 213 изолятов грибов – деструктантов целлюлозы, принадлежащих к 7 родам - Fusarium, Aspergillus, Trichoderma, Penicillium, Cladosporium, Verticillium и Aureobasidium. Среди них преобладали грибы рода Fusarium - 4 вида, 3 вида рода Aspergillus и по одному виду Trichoderma, Penicillium, Cladosporium, Verticillium и Aureobasidium.

Наибольшую активность в деструкции целлюлозы проявили грибы Aspergillus niger, Aspergillus versicolor и Aureobasidium pululans.

Ключевые слова: микроорганизмы, грибы, целлюлоза, деструкция, биодegradация, ферменты

Annotation

Nevmerzytska M., Nurmukhammedov A., Vasilyeva N.

Searching microorganisms for biodegradation cellulose-containing raw materials from recycled resources and agricultural waste

From the mixed forest floor, 35-55 years old, 213 isolates of fungi were secured. They are decomposers of cellulose belonging to 7 genera – Fusarium, Aspergillus, Trichoderma, Penicillium, Cladosporium, Verticillium and Aureobasidium. Among them some fungi prevailed over others notably fungi of genus Fusarium – 4 species, fungi of genus Aspergillus- 4 species and one species of Trichoderma, Penicillium, Cladosporium, Verticillium and Aureobasidium.

Fungi Aspergillus niger, Aspergillus versicolor and Aureobasidium pululans showed the greatest activity in the degradation of cellulose.

Keywords: microorganisms, fungi, cellulose, degradation, biodegradation, enzymes

Отримано редакцією 07.10.13