

УДК 579.222.2:631.86

**ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ  
ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НА ИХ ОСНОВЕ БИОПРЕПАРАТА  
ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ДРЕВЕСНЫХ ОТХОДОВ В УДОБРЕНИЕ**

© 2010 г.

*Н.С. Мокрушина, Т.С. Тарасова, И.В. Дармов*

Вятский госуниверситет, Киров

biologia@vgu.ru

*Поступила в редакцию 07.04.2009*

Из природных источников выделено 112 культур микроорганизмов – вероятных биодеструкторов древесины. Отработаны методики для проведения скрининга целлюлозо- и лигнолитических штаммов микроорганизмов. Среди 112 исследуемых культур выбрали два штамма микромицета – *Fusarium sp.* и *Aspergillus fumigatus var. griseobrunus*. Определена убыль лигнина опилок при твердофазном культивировании на них исследуемых штаммов.

*Ключевые слова:* микромицеты, биоконверсия, лигнин, целлюлоза.

В Кировской области и других регионах России в последнее десятилетие остро стоит проблема, связанная с утилизацией отходов лесозаготовительных и деревообрабатывающих предприятий. Отходами данных предприятий являются не только опилки и стружка, но и щепа, кора, ветви, листва, хвоя, маломерная древесина и обломки стволов. Их ежегодный объем по России достигает нескольких сотен миллионов тонн. По данным Управления охраны окружающей среды и природопользования Кировской области, в 2005 г. в области образовалось 490 тыс. тонн древесных отходов [1].

Древесные отходы частично перерабатывают с производством древесноволокнистых, древесностружечных плит, пеллет. Также значительную долю древесных остатков используют для отопления производственных и жилых помещений. В Кировской области в 2006 г. было использовано в качестве вторичных ресурсов 80% отходов. Это очень высокий показатель, но оставшаяся доля отходов (около 100 тыс. тонн) так и остается переработанной и загрязняет места вырубki и территории лесообрабатывающих предприятий.

На наш взгляд, наиболее рациональной является переработка древесных отходов в органическое удобрение методом компостирования. Данный способ относительно прост и дешев. Также следует отметить, что при компостировании древесно-растительных материалов происходит образование и накопление гумусовых веществ, которые, как известно, определяют плодородие почвы. Таким образом, полученный в результате компостирования древесных отхо-

дов продукт будет являться ценным органическим удобрением.

В природе процесс компостирования, т.е. переработки биополимеров древесины в органическое удобрение, происходит при участии микроорганизмов разнообразных трофических групп. Ведущая роль принадлежит макро- и микроорганизмам-деструкторам лигнина и целлюлозы, поскольку данные биополимеры являются наиболее устойчивыми к разложению [2].

Для ускорения разложения древесных биополимеров нами предлагается внесение в компостную смесь заквасок микроорганизмов. Вносимые микроорганизмы должны быть способны к деструкции целлюлозы и лигнина и направленной трансформации продуктов их разложения в гумусовые вещества.

Цель данного исследования – выделение и скрининг штаммов микроорганизмов, обеспечивающих ускоренное разложение биополимеров древесины и перспективных для разработки на их основе биотехнологии утилизации древесных отходов.

Выделение штаммов микроорганизмов, перспективных для использования в качестве ускорителей переработки древесных отходов, проводили из вероятных источников биодеструкторов древесины: гнилой древесины, лесной почвы, фрагментов плодовых тел трутовиков, свежего навоза, компоста различного состава.

Всего в работе было выделено и исследовано 112 штаммов микроорганизмов, среди которых 70 – микромицеты и 42 – бактериальные культуры. Изолированные микроорганизмы были

обозначены условными номерами и первоначально неидентифицированы. Культуры микромицетов хранились на скошенном в пробирках агаре Чапека, бактериальные культуры – мясопептонном агаре.

В качестве накопительных сред для выделения микроорганизмов были использованы: агаризованная минеральная среда с фильтровальной бумагой, жидкая питательная среда Имшенецкого с фильтровальной бумагой, опилки, пропитанные раствором солей, и другие.

В работе также исследованы 8 культур микроорганизмов, выделенных из биопрепарата на различных питательных средах.

Были опробованы различные варианты методики скрининга микроорганизмов целлюлозо- и лигнодеструкторов.

В качестве отрицательного контроля использовали культуры *E. coli* M17 и *Saccharomyces cerevisiae*. Положительным контролем служила культура штамма *Penicillium restrictum* P25, выделенного ранее на кафедре микробиологии Вятского государственного университета.

Оценку способности исследуемых штаммов к разложению целлюлозы проводили с использованием различных вариантов источника целлюлозы (фильтровальной бумаги, нитроцеллюлозных мембранных фильтров, карбоксиметилцеллюлозы) и различных подложек (агаризованной минеральной среды, агаризованной минеральной среды на основе отмытого агара, силикагелевых пластинок, ваты, поролон, фильтровального картона и без подложки).

Проведя ряд экспериментов, мы пришли к выводу, что ни одна из возможных модификаций не может быть использована в качестве эффективной и экспрессной методики отбора целлюлозолитических штаммов микроорганизмов.

Свой выбор остановили на выращивании культур на агаризованной минеральной среде с добавлением 0.1%-ным карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в течение 3 суток при температуре 30°C и последующим окрашиванием 0.1% раствором конго красного. Данный краситель необратимо связывается с целлюлозой и окрашивает ее в красный цвет. Целлюлозолитические микроорганизмы, выращенные на таком агаре, образуют зоны просветления, отчетливо заметные на красном фоне [3, 4].

Для выявления у исследуемых микроорганизмов лигнолитической способности является недостаточным засев данных штаммов в питательную среду, содержащую препарат лигнина, как в случае с целлюлозой. По мнению большинства ученых, лигнин может потребляться

только в присутствии косубстрата – целлюлозы или другого легкоусвояемого источника углерода.

В связи с этим, нами были рассмотрены следующие варианты отбора лигнолитических штаммов: использование субстрата, содержащего лигнин в большом количестве (гидролизного лигнина), и ароматических соединений – производных лигнина (ванилина, танина).

При выращивании исследуемых культур на среде с добавлением 0.5% танина температуре 30°C по истечению 3–5 суток было обнаружено появление коричневой окраски субстрата вблизи растущего края колоний. Данная цветная реакция имеет название реакции Бавендамма и обнаруживает ферменты фенолоксидазы, выделяемые деструкторами лигнина и окисляющие танин [5, 6].

Нами отмечено три типа цветных реакций: просветление агара, коричневая окраска агара вокруг колонии и грязно-зеленая окраска агара (последнее зафиксировано только для штаммов микромицетов).

С помощью разработанных методик выделенные культуры микроорганизмов были исследованы на наличие целлюлозолитической и лигнолитической способности. Опыты проводили два раза в двух параллелях. Результаты приведены в табл. 1.

Для большинства исследованных культур бактерий был характерен слабый рост на указанных выше средах и отсутствие зон просветления вокруг колонии. Максимальная сумма составляла 8 баллов.

Наивысшими показателями обладали культуры микромицетов, выделенные из лесной почвы и гнилой древесины. Два штамма микромицета, имеющих максимальную сумму баллов (17), оставлены для последующих исследований. Эти штаммы характеризуются наибольшими диаметрами зон просветления и хорошими ростовыми характеристиками на диагностических питательных средах. Шестнадцать культур микромицетов, имеющих сумму 16 баллов, оставлены как резервные.

Была проведена идентификация микромицетов, обладающих наибольшей активностью (сумма баллов 17). По результатам изучения культурально-морфологических признаков и микроскопического строения они были отнесены к родам *Fusarium sp.* и *Aspergillus fumigatus var. griseobrunus*. Вид штамма не определен *Fusarium sp.*, но установлено, что данный микромицет относится к секции *Sporotrichiella* [7–9].

Поскольку отдельные представители рода *Fusarium* могут быть патогенными для человека

**Результаты скрининга штаммов микроорганизмов на наличие целлюлозо- и лигнолитической способностей (в баллах)**

Число штаммов, обладающих данными свойствами	Характер роста исследуемого штамма на среде...				Результаты скрининга (сумма в баллах)
	с КМЦ		с танином		
	Интенсивность роста	Отношение диаметра зоны просветления к диаметру колонии	Интенсивность роста	Отношение диаметра зоны просветления к диаметру колонии	
2	0	0	1	0	1
15	1	0	0	0	1
5	1	0	1	0	2
5	1	4	1	0	6
15	2	0	1	0	3
2	2	0	2	0	4
1	2	0	2	5	9
1	2	5	0	0	7
1	2	5	1	0	8
4	2	5	2	4	13
2	3	0	1	0	4
1	3	0	2	0	5
2	3	0	2	5	10
2	3	0	3	4	10
6	3	0	3	5	11
2	3	0	3	6	12
4	3	4	1	0	8
2	3	4	2	4	13
6	3	4	3	4	14
3	3	5	2	0	10
2	3	5	2	4	14
1	3	5	2	6	16
9	3	5	3	4	15
12	3	5	3	5	16
1	3	5	3	6	17
3	3	6	3	4	16
1	3	6	3	5	17

**Примечания:**

1. В колонках «интенсивность роста»: 0 баллов – отсутствие признаков роста, 1 – слабый рост, 2 – умеренный рост, 3 – значительный рост.

2. В колонках «отношение диаметра зоны просветления к диаметру колонии»: 0 баллов – отсутствие зоны просветления, 4 – диаметр зоны просветления меньше диаметра колонии (уже зоны растущего края мицелия), 5 – диаметр зоны просветления равен диаметру колонии (граница зоны просветления совпадает с растущим краем мицелия), 6 – диаметр зоны просветления больше диаметра колонии (шире зоны растущего края мицелия).

и теплокровных животных, что обусловлено продукцией микотоксинов, был проведен анализ культуральной жидкости данного микроорганизма на наличие токсинов. Иммуноферментный анализ на T2-токсин дал отрицательные результаты, внутрибрюшинное введение культуральной жидкости 10-ти мышам в дозе 0.1 мл не привело к их гибели в течение 2-х недель, что свидетельствовало об отсутствии продукции микотоксинов данным штаммом.

Для сравнения результатов скрининга природных штаммов микроорганизмов была исследована микрофлора биопрепарата, предназначенного для компостирования хозяйственно-бытовых отходов и растительных остатков. Оценку лигно- и целлюлозолитических способностей проводили как для отдельных культур, выделенных из биопрепарата, так и для цельного препарата, неразведенного и разведенного согласно рекомендациям по применению.

Определение лигно- и целлюлолитической активности этих культур дало отрицательный результат. Ни одна из монокультур, выделенных из биопрепарата, а также комплексный препарат не дали роста и окрашивания на агаризованных средах с карбоксиметилцеллюлозой и танином.

Проведено определение убыли лигнина опилок при твердофазном культивировании на них отобранных штаммов микроорганизмов. Определение содержания лигнина в опилках проводили в соответствии с методом Класона в модификации Комарова [10].

Таблица 2

## Убыль лигнина опилок после твердофазного культивирования на них микромицетов – биодеструкторов древесины

Исследуемый штамм		Содержание лигнина в опыте №..., мг			Убыль лигнина ( $\bar{X} \pm I_{95}$ ), %
		1	2	3	
<i>Fusarium sp.</i>	Проба 1	76.5	77.7	77.1	10.2±0.7
	Проба 2	76.5	76.8	76.5	
	Проба 3	77.7	76.9	77.7	
<i>Aspergillus sp.</i>	Проба 1	78.0	77.1	77.7	9.4±0.9
	Проба 2	77.4	78.3	78.3	
	Проба 3	77.4	78.6	77.1	
Контроль	Проба 1	85.9	85.9	85.9	0.0±0.4
	Проба 2	85.8	85.7	86.1	
	Проба 3	86.1	85.6	85.8	

Навеску измельченных опилок массой 300 мг помещали в стеклянный бикс объемом 20 мл и стерилизовали. Посевную культуру выращивали в 10 мл жидкой среды Чапека с сахарозой в конических колбах объемом 100 мл в течение суток при температуре 30°C и шуттелировании. Посев исследуемых культур проводили из расчета 1.5 мл посевной культуры на 100 мг опилок. Первые сутки посева шуттелировали при температуре 30°C, затем инкубировали в статических условиях при температуре 30°C. Оценку убыли лигнина проводили на 8-е сутки культивирования при температуре 30°C.

Контролем служили опилки, инокулированные стерильной дистиллированной водой и выдержанные в тех же условиях, что и опытные.

Для удаления белковой массы перед определением содержания лигнина была проведена предварительная обработка твердофазной микцелиальной культуры пепсином. Обработка проводилась в течение 18 часов раствором пепсина в 1%-ной соляной кислоте [11].

Результаты определения убыли лигнина представлены в табл. 2.

По сравнению с убылью лигнина при культивировании на опилках штаммов базидиомицетов (до 50% за 10 суток [12]), полученный в наших опытах показатель относительно невысок. Однако применение базидиомицетов в промышленном масштабе невыгодно в связи со сложностью их культивирования, поддержания в активном состоянии и требовательностью к составу питательных сред. Микромицеты, в частности исследуемые нами, в этом плане выгодно отличаются от базидиомицетов.

Полученные результаты являются основанием для дальнейшей разработки на основе отобранных штаммов микроорганизмов биопрепарата, предназначенного для ускоренной перера-

ботки древесных отходов в органическое удобрение методом компостирования.

В настоящее время продолжается работа по отбору перспективных штаммов, изучению ферментных систем микроорганизмов, ответственных за деградацию биополимеров древесины.

## Список литературы

1. О состоянии окружающей природной среды Кировской области в 2005 году (Региональный доклад) / Под общей редакцией В.П. Пересторонина. Киров: ООО «Триада плюс», 2006. 148 с.
2. Свиридова О.В., Воробьев Н.И., Петров В.Б. // Материалы научн. конф. «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии», Казань, 2004. С. 116.
3. Teather R.M., Wood P.J. // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 43. P. 777–780.
4. Соловьева И.В., Окунев О.Н., Вельков В.В. и др. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 172–178.
5. Методы экспериментальной микологии. Справочник / Под ред. В.И. Билай. Киев: Наукова думка, 1982. 550 с.
6. Рипачек В. Биология дереворазрушающих грибов / Пер. с чеш. М.: Лесная промышленность, 1967. 392 с.
7. Саттон Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Пер. с англ. М.: Мир, 2001. 468 с.
8. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. М.: Наука, 1969. 132 с.
9. Билай В.И. Аспергиллы. Киев: Наукова думка, 1988. 550 с.
10. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. Учебн. пособие для ВУЗов. М.: Экология, 1991. 320 с.
11. Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М.: Мир, 1977. 236 с.
12. Рабинович М.А., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. 1: Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.

**ISOLATION OF MICROMYCETES WHICH ARE PROMISING IN DEVELOPING  
A BIOPREPARATION FOR SPEEDING UP THE COMPOSTING  
OF WOOD WASTES INTO FERTILIZERS**

*N.S. Mokrushina, T.S. Tarasova, I.V. Darmov*

In this work, 112 microorganic cultures (70 micromycetes and 42 bacteria), probable biodestructors of cellulose-lignin, have been isolated from natural sources. A number of procedures for screening cellulose and lignolytic strains of microorganisms have been chosen and tested. As a result, two micromycete strains have been chosen. They have been identified as *Fusarium sp.* and *Aspergillus fumigatus var. griseobruneus*. The loss of lignin quantity in sawdust solid-phase cultivated by chosen strains has been determined.

*Keywords:* micromycetes, bioconversion, lignin, cellulose.