

В. Н. Шевкопляс¹, М. И. Бойко²

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ УГОЛЬНОГО ШЛАМА ОБОГАТИТЕЛЬНОЙ ФАБРИКИ, КАК ВОЗМОЖНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕРОДНОГО МАТЕРИАЛА

¹Институт физико-органической химии и углехимии им. Л. М. Литвиненко НАН Украины
83114, г. Донецк, ул. Р. Люксембург, 70

²Донецкий национальный университет; 83050, г. Донецк, ул. Щорса, 46

Шевкопляс В. Н., Бойко М. И. Идентификация и изучение некоторых физиологических показателей микромицетов, выделенных из угольного шлама обогатительной фабрики, как возможных деструкторов углеродного материала. – Выделено из угольного шлама ЦОФ "Трудовская" г. Донецка чистые культуры 22 микромицетов, относящиеся к двум семействам: Moniliaceae (21 культура), порядок Moniliales и Mortierella (1 культура), порядок Mucorales. Культуры микромицетов на питательных средах с разными источниками углеродного питания выявляли неодинаковую физиологическую активность. Они способны в определенной мере утилизировать гумат калия, содержащийся в питательной среде в высоких концентрациях.

Ключевые слова: микромицеты, угольный шлам, физиологическая активность, источники углерода.

Введение

Для биоконверсии природных органических углеродных материалов используют бактерии и грибы различной видовой принадлежности. Авторами [1] проведены исследования по выделению микрофлоры в горных выработках угольных шахт Западного Донбасса. В результате работы получены микромицеты родов *Penicillium* и *Aspergillus* и бактерии рода *Pseudomonas*, способных окислять метан угольных пластов. Для снижения количества метана в шахтных выработках используются метанотрофные бактерии *Methylomonas metanica* [2], *Metylicystis capsulatus* и *Metylicystis parvus* [3]. При проведении биогазификации углей можно применять метанообразующие анаэробные бактерии с целью получения из них водорода и метана в смеси с другими углеводородами [4]. При удалении из углей пиритной и органической серы применяют бактерии, способные использовать для своей жизнедеятельности энергию, высвобождающуюся при окислении железа и серы [5]. Биотрансформация, которая предполагает первоначальное культивирование микроорганизмов на жидких питательных средах с различными источниками легкоусвояемого углерода и последующая биодеструкция углеродных материалов в культуральной жидкости микромицетов, обогащенной внеклеточными белками и ферментами [6-8].

Цель работы – выделение и определение родовой принадлежности микромицетов угольного шлама обогатительной фабрики и изучение их некоторых физиологических показателей, как возможных деструкторов углеродного материала.

Материалы и методы исследований

В качестве объекта поиска микромицетов был взят угольный шлам из илонакопителя ЦОФ "Трудовская" г. Донецка. Для выделения чистой культуры использовали метод, описанный в работе [9]. Чашки Петри с посевным материалом помещали в термостат на 1-3 суток при температуре 30⁰С для более интенсивного прорастания культуры. Затем проводили осмотр чашек Петри и изолированные друг от друга колонии с помощью микробиологического крючка переносили на стерильную агаризованную картофельно-сахарозную среду в пробирках. Данный метод позволил выделить из угольного шлама чистые культуры 22 микромицетов. Идентификацию культур осуществляли по общепринятым методам [10-12].

Микромицеты культивировали на питательной среде следующего состава, (г/л): KH_2PO_4 – 0,5; Na_3PO_4 – 0,5; NH_4NO_3 – 0,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KCl – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, глюкоза – 20, вода до 1 л. Также использовали картофельную среду с сахарозой в количестве 20 г/л (КСС) [13].

Чтобы оценить способность микромицетов разрушать высокомолекулярные органические соединения, в качестве дополнительного источника углерода и энергии к питательным средам добавляли водорастворимые фракции бурых углей – гуматы калия (ГК), полученные по стандартной методике [14], в количестве 0,05, 0,25 и 1 г ГК/100 мл

Приготовленные питательные среды автоклавировали в автоклаве АГ-1 при давлении 1,5 атм. в течение 45 мин. После автоклавирования и охлаждения питательные среды инокулировали выделенными микромицетами. Культивирование микромицетов осуществляли в течение 15, 30 суток при температуре 20-22⁰С. Содержание белка в культуральной жидкости грибов определяли по Бредфорду [15], накопление биомассы – весовым методом, после ее высушивания в сушильном шкафу при температуре 105⁰С, изменение рН среды в процессе роста микромицетов регистрировали на рН-метре 340.

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью дисперсионного анализа, а сравнение средних арифметических величин с использованием критерия Стьюдента [16].

Результаты и их обсуждение

Идентификация выделенных микромицетов

Микроскопические исследования, выделенных из угольного шлама грибов, проведены с помощью микроскопа МБЛ-1 при увеличении x300-600. Для определения видовой принадлежности грибов использовали методики [11, 12]. При этом основным критерием идентификации изучаемых микромицетов является внешний вид мицелия, его окраска и наличие спорангиев или конидиеносцев. Установлено, что выделенные культуры относятся к двум семействам: Moniliacea (21 культура), порядок Moniliales и Mortierella (1 культура), порядок Mucorales.

Микроскопирование представителей семейства Moniliacea показало, что они относятся к роду *Penicillium* для которого характерно наличие хорошо разветвленного многоклеточного мицелия. Конидиеносцы неокрашенные с поперечными перегородками, прямые и лежачие, отходят от субстратного или поверхностного мицелия. На верхушке имеют кистеобразное разветвление. Иногда конидиеносцы объединяются в пучки (коремии). По характеру разветвления кисти микромицетов рода *Penicillium* делятся на четыре секции (Monoverticillata, Assimetrica, Biverticillata и Poliverticillata). По типу конидий исследуемые микромицеты были отнесены к двум секциям: Monoverticillata и Biverticillata. Как представители секции Monoverticillata определены два вида микромицетов и обозначены *Penicillium sp.* 3-98 и *Penicillium sp.* 8-98. Представители секции Biverticillata (19 видов) обозначены как *Penicillium sp.* 15 – *Penicillium sp.* 33, соответственно. Для всех представителей рода *Penicillium* характерно наличие конидий, окрашенных в зеленый цвет.

Установлено, что представитель семейства Mortierella относится к роду *Mortierella*, секция Stylospora и обозначен как *Mortierella sp.* 5A. Данная секция характеризуется наличием у гриба белого бархатистого неокрашенного мицелия. Стилоспорангий шиловидный, имеет у основания неправильно-мутовчатые и частично моноподиальные разветвления, отходящие от гиф субстратного и воздушного мицелия. Веточки спорангиеносцев короткие, собранные по 2-6 на верхушке спорангиеносцев и расположены по 1-2 ближе к основанию. Стилоспоры шаровидные, частично и неправильно шаровидные с мелко ямочной оболочкой, обычно с каплей жира, неокрашенные.

Данные, характеризующие некоторые физиологические показатели изученных микромицетов, произрастающих на питательной среде с глюкозой, представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что при одинаковых условиях культивирования грибы проявляли разную физиологическую активность, которая выражается в количестве накопления ими биомассы, белка в культуральной жидкости (КЖ) и изменении рН среды в процессе роста микромицетов. Так, например, наибольшее количество биомассы накапливала культура *Penicillium sp.* 17 и *Penicillium sp.* 32 (6,7 г/л), а минимальное – *Penicillium sp.* 24 (3,2 г/л).

**Характер накопления биомассы, белка и изменения рН среды культурами
микровицетов, произраставшими на питательной среде с глюкозой**

Микровицет	Биомасса, г/л	Количество белка в КЖ, мкг/мл	рН среды	
	М ± м	М ± м	до опыта	после опыта
<i>Mortierella sp. 5A</i>	5,6 ± 0,2	22,2 ± 2,1	5,8	6,3
<i>Penicillium sp. 15</i>	4,1 ± 0,6	25,0 ± 3,9	5,8	5,1
<i>Penicillium sp. 16</i>	4,7 ± 0,9	15,3 ± 3,4	5,8	3,2
<i>Penicillium sp. 17</i>	6,7 ± 0,5	22,2 ± 3,8	5,8	3,3
<i>Penicillium sp. 18</i>	4,8 ± 0,4	21,7 ± 6,5	5,8	3,6
<i>Penicillium sp. 19</i>	3,2 ± 0,6	36,2 ± 6,0	5,8	3,2
<i>Penicillium sp. 20</i>	4,6 ± 1,3	18,1 ± 2,9	5,8	3,2
<i>Penicillium sp. 21</i>	3,0 ± 0,3	31,2 ± 4,4	5,8	3,1
<i>Penicillium sp. 22</i>	5,1 ± 0,8	23,3 ± 6,9	5,8	4,6
<i>Penicillium sp. 23</i>	4,2 ± 0,3	25,7 ± 4,0	5,8	3,9
<i>Penicillium sp. 24</i>	3,2 ± 0,5	60,5 ± 5,4	5,8	3,5
<i>Penicillium sp. 25</i>	3,4 ± 0,6	30,0 ± 4,5	5,8	4,2
<i>Penicillium sp. 26</i>	3,9 ± 0,4	23,8 ± 6,7	5,8	3,1
<i>Penicillium sp. 27</i>	3,2 ± 0,3	57,9 ± 7,7	5,8	5,2
<i>Penicillium sp. 28</i>	3,4 ± 0,4	63,1 ± 7,5	5,8	3,0
<i>Penicillium sp. 29</i>	4,2 ± 0,2	27,2 ± 1,6	5,8	4,1
<i>Penicillium sp. 30</i>	5,0 ± 1,2	22,9 ± 2,1	5,8	3,2
<i>Penicillium sp. 31</i>	5,0 ± 1,0	32,4 ± 3,2	5,8	3,6
<i>Penicillium sp. 32</i>	6,7 ± 0,9	18,3 ± 4,7	5,8	4,4
<i>Penicillium sp. 33</i>	4,1 ± 0,6	44,1 ± 7,5	5,8	3,5
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	4,6 ± 1,2	33,3 ± 2,5	5,8	3,8
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	3,5 ± 0,7	57,4 ± 7,2	5,8	4,1

Если исследуемую группу микровицетов разбить на 4 класса с интервалом в одну единицу, то в классах от 3 до 4 и от 4 до 5 г биомассы на литр находится по 8, в классе от 5 до 6 г/л – 4 и в классе от 6 до 7 г/л – 2 культуры грибов.

Данные табл. 1 также свидетельствуют о том, что грибы обладают разной способностью продуцировать белок в культуральную жидкость. Причем культуры *Penicillium sp. 17* и *sp. 32* образующие наибольшее количество сухой биомассы, по количеству выделенного белка в питательную среду занимают последнее место (22,2 и 18,3 мкг/мл соответственно). В свою очередь культуры *Penicillium sp. 24* и *sp. 28*, накопившие наименьшее количество биомассы, образуют белка больше остальных (60,5 и 63,1 мкг/мл соответственно). Остальные культуры по продуцированию белка в среду занимают промежуточное место.

В процессе роста грибов наблюдалось изменение рН питательной среды по сравнению с исходным ее значением. Так, все культуры *Penicillium* подкисляют питательную среду на разное число единиц рН. Культуры *Penicillium sp. 15*, *sp. 27* подкисляют среду на 0,7 и 0,6 ед. рН соответственно, культуры *Penicillium sp. 22*, *sp. 25*, *sp. 29*, *sp. 32* и *sp. 8-98* – больше единицы рН, а культуры *Penicillium sp. 16*, *sp. 17*, *sp. 18*, *sp. 19*, *sp. 20*, *sp. 21*, *sp. 23*, *sp. 24*, *sp. 26*, *sp. 28*, *sp. 30*, *sp. 31*, *sp. 33* и *sp. 3-98* – на две и больше единиц рН. В свою очередь культура *Mortierella sp. 5A* в процессе развития осуществляла подщелачивание среды. Это свидетельствует о том, что культуры *Penicillium* в процессе роста выделяют в питательную среду метаболиты кислой природы, а культура *Mortierella sp. 5A* – метаболиты щелочной

природы. Не исключено, что среди этих метаболитов присутствуют ферменты, способные расщеплять определенные субстраты, находящиеся в питательной среде.

В табл. 2 представлены результаты исследований по влиянию различных источников углерода в питательной среде на физиологическую активность микромицетов. Для эксперимента взяты 2 культуры *Penicillium sp. 3-98* и *Penicillium sp. 8-98* и культура *Mortierella sp. 5A*.

Таблица 2

**Влияние источников углерода на физиологическую активность микромицетов
(время культивирования 30 сут.)**

Микромицет	Источник углерода	Биомасса, г/л М ± м	Количество белка в КЖ, мкг/мл М	рН среды	
				до опыта	после опыта
<i>Mortierella sp. 5A</i>	КСС	8,0 ± 0,6	1,6	6,3	7,1 ± 0,2
<i>Mortierella sp. 5A</i>	глюкоза	5,4 ± 0,7	3,0	6,7	6,4 ± 0,2
<i>Mortierella sp. 5A</i>	глицерин	11,4 ± 0,2	3,0	6,6	5,1 ± 0,1
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	КСС	5,8 ± 0,2	4,5	6,3	6,3 ± 0,6
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	глюкоза	3,0 ± 0,2	0,7	6,7	3,7 ± 0,1
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	глицерин	5,0 ± 0,3	0,7	6,6	3,4 ± 0,3
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	КСС	5,8 ± 0,1	20,7	6,3	7,4 ± 0,2
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	глюкоза	4,2 ± 0,1	3,4	6,7	6,7 ± 0,4
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	глицерин	3,4 ± 0,3	16,6	6,6	7,0 ± 0,1

Из табл. 2 видно, что лучшим источником углерода для накопления биомассы и белка в КЖ *Mortierella sp. 5A* является трехуглеродное соединение – глицерин. Наименьшее количество биомассы накапливалось этим грибом на среде с глюкозой (5,4 г/л). Рост *Mortierella sp. 5A* на картофельно-сахарозной среде осуществлялся достоверно лучше, чем на среде с глюкозой, но достоверно хуже, чем на среде с глицерином. В свою очередь на среде с глюкозой наблюдалось, примерно, в два раза больше образования белков, чем на среде КСС.

Для грибов рода *Penicillium* (см. табл. 2) лучшей средой для накопления сухого вещества и белка являлась картофельно-сахарозная среда. На среде с глицерином ростовые процессы *Penicillium sp. 3-98* осуществлялись лучше, чем на среде с глюкозой, а для культуры *Penicillium sp. 8-98* – наоборот. Изменение рН среды в результате жизнедеятельности грибов осуществлялось в меньшей мере, чем в предыдущем опыте. Это свидетельствует о том, что выбранное исходное значение рН сред находилось вблизи оптимального для роста грибов значения рН.

Следующим этапом исследований было установление способности микромицетов использовать для своего роста и развития высокомолекулярные органические соединения, содержащиеся в питательной среде. Эти эксперименты проведены на минеральной среде Чапека, которая в качестве единственного источника углерода содержала гумат калия в концентрации 0,1%.

Установлено, что физиологические показатели микромицетов, произрастающих на среде Чапека с гуматом калия снижаются по сравнению с питательной средой, которая ранее использовалась (см. табл. 1). Можно отметить, что микромицеты способны расти и накапливать белок на среде с гуматом калия, но в меньшей мере.

Поэтому в дальнейших экспериментах по биоконверсии ГК использовали питательные среды, содержащие как ГК, так и легкоусвояемый источник углерода, в качестве которого использовали глюкозу (табл. 3). Культивирование грибов осуществляли в течение 15 суток при температуре 25°C.

Влияние различных концентраций ГК на физиологические процессы микромицетов, произраставших на питательной среде с глюкозой (20 г/л)

Микромицет	Концентрации ГК, %	Биомасса, г/л	рН среды	
			до опыта	после опыта
<i>Mortierella sp. 5A</i>	Контроль	6,8	6,6	5,5
<i>Mortierella sp. 5A</i>	1	6,0	6,6	6,6
<i>Mortierella sp. 5A</i>	5	5,4	6,6	7,0
<i>Mortierella sp. 5A</i>	10	4,4	6,6	7,1
<i>Mortierella sp. 5A</i>	20	3,6	6,6	7,2
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	Контроль	13,0	6,6	3,5
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	1	11,2	6,6	8,0
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	5	6,8	6,6	5,3
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	10	5,8	6,6	6,3
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	20	3,0	6,6	6,5
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	Контроль	4,0	6,6	5,1
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	1	3,6	6,6	6,0
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	5	2,4	6,6	6,5
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	10	1,8	6,6	7,1
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	20	1,6	6,6	7,3

Из табл. 3 видно, что наибольшее количество грибной биомассы образовывалось на контрольных средах. На этих средах осуществлялось значительное подкисление питательных сред. Концентрации 1, 5, 10 и 20% гумата калия, находящегося в среде, вызывали ингибирование ростовых процессов исследованных микромицетов, что отразилось на накоплении сухих веществ грибов. Присутствие в среде ГК у всех грибов вызывало подщелачивание культуральной жидкости.

Это говорит о том, что под влиянием высоких концентраций ГК происходило нарушение определенных звеньев метаболизма, что отразилось на образовании биомассы микромицетами. Однако присутствие в питательной среде глюкозы благоприятствовало биоконверсии гумата калия грибами.

Выводы

Из угольного шлама ЦОФ "Трудовская" г. Донецка выделено 22 чистые культуры микромицетов, которые относятся к семейству Moniliaceae, род *Penicillium*, секция Monoverticillata и обозначены как *Penicillium sp. 3-98* и *Penicillium sp. 8-98*. Остальные представители рода *Penicillium* (19 культур) отнесены к секции Biverticillata и обозначены как *Penicillium sp. 15* – *Penicillium sp. 33*, соответственно. Один выделенный микромицет отнесен к семейству Mortierella, секция Stylospora и обозначен как *Mortierella sp. 5A*.

На питательных средах с разными источниками углеродного питания микромицеты проявляют неодинаковую физиологическую активность. Оптимальной средой для роста и развития гриба *Mortierella sp. 5A* является питательная среда с глицерином, а для грибов *Penicillium sp. 3-98* и *Penicillium sp. 8-98* – картофельно-сахарозная среда.

Концентрации 1, 5, 10 и 20% гумата калия, находящегося в питательной среде, вызывают ингибирование ростовых процессов исследованных микромицетов. Исследованные микромицеты способны в определенной мере утилизировать гумат калия, находящийся в высоких концентрациях в питательной среде. Не исключено, что низкие концентрации гумата калия будут вызывать стимулирование ростовых процессов данных микромицетов. Это предположение требует экспериментальной проверки.

Список литературы

1. Курдиш И. К., Рой А. А., Коваль Э. З., Антонюк Т. С. Микрофлора горных выработок угольных шахт Западного Донбасса // Микробиологічний журнал. – 1998. – Т. 60, № 1. – С. 3-10.
2. Apel W. F., Dugan P. R. Influence kaolin on methane oxidation by *Methylomonas methanica* in gas phase bioreactors // Fuel. – 1992. – V. 71, N 7. – P. 805-808.
3. Курдиш И. К. К вопросу об эффективности применения отдельных видов метанотрофов для снижения метановыделения в угольных шахтах // Микробиологічний журнал. – 1977. – № 59. – С. 86-92.
4. Shumkov S., Terehova S. Coal biogasification on combined aerobic-anaerobic bioreactor // 9th Intern. Conf. on Coal Sciene (Essen, Germany). – 1997. – V. 3. – P. 1757-1760.
5. Martinier O., Aller A., Alonso T., Gomez E., Moran A. Biodesulfurization of coal from the north of Lion (Spain) // 8th Intern. Conf. on Coal Science (Oviedo, Spain). – 1995. – V. 2. – P. 1749-1752.
6. Laborda F., Redondo M., Luna N., Monistrol I. Characterization of liquefaction / solubolization mechanisms of Spanish coals by newly isolated microorganisms // 8th Intern. Conf. on Coal Science (Oviedo, Spain). – 1995. – V. 2. – P. 1387-1390.
7. Gasco L. Radiation pretreatment of low rank coals for further bioconversion // 9th Intern. Conf. on Coal Science (Essen, Germany). – 1997. – V. 3. – P. 1587-1590.
8. Schmiers H., Kopsel R., Weber A., Winkelhofer M., Grosse S. Change in brown coal structure caused by coal-solubilization microorganisms // 9th Inter. Conf. on Coal Science (Essen, Germany). – 1997. – V. 3. – P. 1685-1688.
9. Основы медицинской микробиологии / Под ред. С. В. Коршунова. – М.-Л.: Госиздат, 1930. – Т. 1. – 689 с.
10. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В. И. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
11. Пидопличко Н. М., Милько А. А. Атлас мукоральных грибов. – К.: Наук. думка, 1971. – 115 с.
12. Визначник грибів України / Відп. ред. Д. К. Зерова. – К.: Наук. думка, 1971. – 696 с.
13. Семенов С. М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: Справочник. – М.: Агропромиздат, 1990. – 291 с.
14. Тайц Е. М., Андреева И. А. Методы анализа и испытание углей. – М.: Недра, 1983. – 301 с.
15. Дебре А. Практическая химия белка. – М.: Мир, 1980. – 623 с.
16. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 291 с.

Шевкоплас В. М., Бойко М. І. Ідентифікація та вивчення деяких фізіологічних показників мікроміцетів, виділених із вугільного шламу збагачувальної фабрики, як можливих деструкторів вуглецевого матеріалу. – Виділено із вугільного шламу ЦЗФ "Трудовська" м. Донецька чисті культури 22 мікроміцетів, які відносяться до двох родин: Moniliaceae (21 культура), порядок Moniliales та Mortierella (1 культура), порядок Mucorales. Досліджені культури на живильних середовищах з різними джерелами вуглецевого живлення виявляють неоднакову фізіологічну активність. Вони здатні відповідно утилізувати гумат калію, що знаходився у високих концентраціях у живильних середовищах.

Ключові слова: мікроміцети, вугільний шлам, фізіологічна активність, джерела вуглецю.

Shevkoptyas V. N., Boyko M. I. Identification and study of some physiological parameters of micromycetes discharged from coal slime of enriching factory as possible distructors of carbonic stuff. – Pure cultures of 22th mycomycetes was discharged from coal slime of CEF "Trudovskaya" in Donetsk. Micromycetes are Family Moniliaceae Order Moniliales (21 cultures) and Family Mortierella Order Mucorales (1 culture). Research cultures show different physiological activities on the nutrient medium with different sources of carbonic nutrition. In adequate measure they can utilize potassium humate in high concentrations in the nutrient medium.

Key words: micromycetes, coal slime, physiological activity, carbon sources.