

УДК 547:502.52

СКРИНИНГ ШТАММОВ РОДА TRICHODERMA – БИОДЕСТРУКТОРОВ ФЕНОЛА

Бондарь П.Н., Любяшкин А.В.

*ФГБОУ ВО «Сибирский государственный технологический университет»,
Красноярск, e-mail: polina8484@mail.ru*

В данной работе предложен метод микробиологической утилизации фенола штаммами рода *Trichoderma*, которые являются продуцентами ферментов, способных расщеплять фенольные соединения. Показано, что все исследуемые штаммы, за исключением изолята *Trichoderma viride*, проявляют внеклеточную фенолоксидазную активность и обладают различной чувствительностью к изменению концентрации фенола в среде. Установлено, что штаммы рода *Trichoderma* способны расти как на твердой, так и в жидкой солевой среде с добавлением фенола в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрациях 20, 50 и 70 мг/л. На основании результатов отобраны перспективные штаммы для биодеструкции фенола при поверхностном и глубинном методах культивирования, а также в целях создания биопрепарата на основе триходермы в иммерсионной биотехнологической системе.

Ключевые слова: фенол, *Trichoderma*, биодеструкция, фенолоксидазная активность, поверхностное и глубинное культивирование

SCREENING STRAINS OF FUNGI TRICHODERMA – BIODESTRUCTORS PHENOL

Bondar P.N., Lyubyashkin A.V.

*FGBOU VO «Sibirskij Gosudarstvennyj Tehnologicheskij Universitet»,
Krasnoyarsk, e-mail: polina8484@mail.ru*

In this work proposed the microbiological utilization of phenol strains of the genus *Trichoderma*, which are producers of enzymes capable of degrading phenolic compounds. It was shown that all tested strains except for species *Trichoderma viride*, exhibit extracellular phenoloxidase activity and have different sensitivity to a change in the phenol concentration in the environment. It has been established that the strains of the genus *Trichoderma* can grow on both solid and liquid salt medium with the addition of a phenol as the sole carbon and energy source at concentrations of 20, 50 and 70 mg / l. Based on the results of selected strains promising for biological degradation of phenol in surface and deep cultivation methods and to create a product based on *Trichoderma* in immersion biotech system.

Keywords: phenol, *Trichoderma*, biodegradation, phenoloxidase activity, surface and deep cultivation

Производные фенолов – наиболее распространенные загрязнения, поступающие в поверхностные воды со стоками предприятий нефтеперерабатывающей, сланцеперерабатывающей, лесохимической, коксохимической, целлюлозно-бумажной промышленности и др. Фенол и его гомологи являются трудно разрушающимися соединениями, ингибирующими биосинтез микроорганизмов, что значительно затрудняет самоочистку водных объектов. Так, минимальные токсические дозы, уменьшающие на 50% количество микроорганизмов, обеспечивающих обезвреживание опасных соединений в воде, для фенола, гидрохинона и катехина составляют всего лишь 22,1; 0,08; 31,8 мг/л соответственно. Таким образом, попадание в водоем даже незначительного количества фенольных соединений приводит к уменьшению способности водного объекта к саморегенерации с помощью имеющегося геобиоценоза и невозможности в дальнейшем дезактива-

ции других загрязнений. Кроме того, фенол и его производные обладают высокой токсичностью для человека и относятся к высоко опасным веществам 2-го класса опасности. Предельно допустимая концентрация фенола в воде хозяйственно-питьевых и рыбохозяйственных объектов лимитирована до 0,001 мг/л [3].

Преимущество использования биологических методов деструкции объясняется тем, что микроорганизмы обезвреживают фенольные вещества, не оказывая отрицательного влияния на экосистему, и не вызывают появления новых загрязняющих агентов в окружающей среде. Деструктивные методы пригодны для вод с концентрацией фенолов до 1 г/л.

Способность видов рода *Trichoderma* утилизировать широкий набор углеродных субстратов, технологичность, сравнительно высокая скорость роста и низкая токсичность в отношении растений и животных предполагают возможность их использования, наряду

с традиционными для этого рода отраслями биотехнологии, для биодеструкции фенольных соединений. Во многих работах было показано, что грибы рода *Trichoderma* могут быть весьма устойчивы к промышленным загрязнениям окружающей среды.

Целью работы был подбор активных штаммов рода *Trichoderma* для биологической деструкции фенола при поверхностном и глубинном культивировании.

Материалы и методы исследования

Для проведения исследований были отобраны 6 моноспоровых штаммов различных видов грибов рода *Trichoderma*, выделенных из почв различных лесорастительных зон Средней Сибири и Республики Тыва и обладающих стабильными культурально-морфологическими признаками: *Trichoderma asperellum* «Mg-6», *Trichoderma asperellum* «ТН-11», *Trichoderma harzianum* «M99/5», *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06», *Trichoderma koningii* «ТСГ», *Trichoderma viride* «Lg-1».

Фенолоксидазная активность штаммов рода *Trichoderma* определялась реакцией Бавендамма, широко используемой для быстрого отбора грибов с высокой активностью внеклеточной фенолоксидазы. Метод Бавендамма разработан для выявления оксидазной активности у дереворазрушающих базидиомицетов, однако используется и для дейтеромицетов, в том числе *Trichoderma*. Цветной реакцией Бавендамма обнаруживают не менее трех ферментов: п-дифенолоксидазу (лактазу), пероксидазу и 0-дифенолоксидазу (тирозидазу). В качестве субстрата был использован таннин, так как для дейтеромицетов из всех субстратов он признан универсальным [5]. Таннин добавлялся к агаризованной среде Чапека в количестве 0,2%.

Для анализа изучаемые штаммы высевали на питательную среду Чапека следующего состава, г: глюкоза – 30,0; NaNO_3 – 2,0; MgSO_4 – 0,5; KCl – 0,5; K_2HPO_4 – 1,0; FeSO_4 – 0,01; агар – 20,0, вода дистиллированная – 1000 мл с добавлением таннинов (0,1 г/л) вместо азотсодержащего соединения. Среда автоклавировали при 0,5 атм. в течение 30 минут, разливали в чашки Петри и засеивали исследуемыми штаммами методом укола. Культивирование осуществляли в термостате при 25–27°C в течение 9 суток. О выделении фенолоксидаз судили на основании появления пигмента в среде в процессе роста гриба. Тест считали положительным, если появилась окрашенная зона агара под старым, молодым мицелием или за пределами роста колонии.

Для оценки способности роста штаммов *Trichoderma* в присутствии различных концентраций фенола, как единственного источника углеродного питания, использовали поверхностное и глубинное культивирование.

При поверхностном методе культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды в виде мицелиальной пленки, которая субстратным мицелием всасывает ингредиенты питательной среды, а воздушным мицелием формирует репродуктивные органы. Этот способ культивирования обеспечивает полный цикл развития гриба, но является более медленным процессом из-за интрагифального транспорта питательных веществ от субстратного мицелия к растущим терминальным клеткам воздушного мицелия [6]. Фенол добавляли в среду Чапека вме-

сто глюкозы в концентрациях 20; 50; 70 мг/л. Споры гриба наносили уколом в среду петлей в центр чашки Петри. Результаты снимали на 7 сутки.

Глубинный метод культивирования заключается в выращивании микроорганизмов в жидкой питательной среде при периодическом перемешивании. Этот способ обеспечивает возможность интенсивного роста мицелия, накопление продуктов обмена и высокий уровень механизации процесса, но не обеспечивает полного цикла развития мицелиального гриба, и стадия спороношения в этих условиях у фенотипа слабо выражена или совсем не осуществляется [7]. Для этого использовали питательную среду Чапека, без добавления агара, содержащую в качестве источника углерода фенол в концентрациях 20; 50; 70 мг/л. Результаты исследований снимали на 14 сутки.

Определение концентрации фенола после культивирования проводили фотометрическим методом [2]. Метод основан на образовании оранжево-желтого комплекса фенола с пара-нитроанилином в щелочной среде.

Аликвотную часть анализируемой сточной воды объемом, не превышающим 5 мл, перенесли в колбу вместимостью 25 мл, добавляли 1 мл диазотированного раствора пара-нитроанилина и доводили до метки поглотительным раствором (натрий углекислый, раствор 8 г/л). Диазотированный пара-нитроанилин готовился следующим образом: навеску 0,01 г пара-нитроанилина растворяют в смеси 10 мл дистиллированной воды и 2,5 мл соляной кислоты. К образовавшемуся раствору прибавляют 2,5 мл раствора натрия азотистокислого и через несколько минут раствор разбавляют водой до 50 мл. Раствор готовят в день проведения анализа. Оптическую плотность определяли при длине волны $\lambda = 440$ нм в кювете с рабочей длиной $\lambda = 20$ мм, относительно холостой пробы.

Все исследования проводили в трех повторностях.

Результаты исследования и их обсуждение

Для разработки основ использования штаммов грибов рода *Trichoderma* в целях биодеструкции фенолов необходимо было провести оценку их фенолоксидазной активности. Существуют работы, доказывающие, что ряд штаммов грибов рода *Trichoderma* способен окислять фенольные соединения [1, 4, 5]. Фенолоксидазную активность грибов обнаруживали в появлении пигмента. В данной работе на основании теста Бавендамма на агаризованной среде с таннином установлено, что все исследуемые штаммы растут на питательной среде с таннином, но наибольшую фенолоксидазную активность проявили 3 штамма: *Trichoderma asperellum* «ТН-11», *Trichoderma koningii* «ТСГ» и *Trichoderma asperellum* «Mg-6», диаметр пигментированных пятен составлял $48 \pm 0,5$, $42 \pm 0,5$ и $40 \pm 0,3$ мм соответственно. Изolat *Trichoderma viride* «Lg-1» не проявил оксидазную активность и в дальнейших исследованиях не использовался.

Проведенные исследования по влиянию фенола на рост штаммов *Trichoderma* в условиях поверхностного культивирования показали, что они обладают

различной чувствительностью к изменению концентрации фенола в среде. Так, при концентрации фенола в среде 20 мг/л наибольшая продуктивность была отмечена у штаммов *Trichoderma asperellum* «ТН-11», *Trichoderma koningii* «ТСГ» и *Trichoderma harzianum* «М99/5». При концентрации 50 мг/л – у штаммов *Trichoderma asperellum* «ТН-11» и *Trichoderma koningii* «ТСГ», а при концентрации фенола в среде 70 мг/л – у штамма *Trichoderma koningii* «ТСГ». При этом высокие концентрации фенола (50 и 70 мг/л) ингибировали рост штамма *Trichoderma harzianum* «М99/5». Отрицательное действие фенола на продуктивность штаммов *Trichoderma asperellum* «Мg-6» и *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» проявилось при всех концентрациях (рис. 1).

Оценку степени биодеструкции фенола исследуемыми штаммами проводили в условиях глубинного культивирования, в качестве источника углерода использовали фенол с концентрациями 20, 50 и 70 мг/л. Концентрацию фенола в среде до и после культивирования определяли фотоколориметрическим методом.

Анализ результатов экспериментальных испытаний показал, что во всех случаях штаммы рода *Trichoderma* способны подвергать деструкции фенол, содержащийся в среде. Добавление фенола в среду в концентрации 20 мг/л показало, что наибольшую степень деградации проявил штамм *Trichoderma harzianum* «М99/5» – концентрация снизилась на 30%. Штаммы *Trichoderma asperellum* «Мg-6»

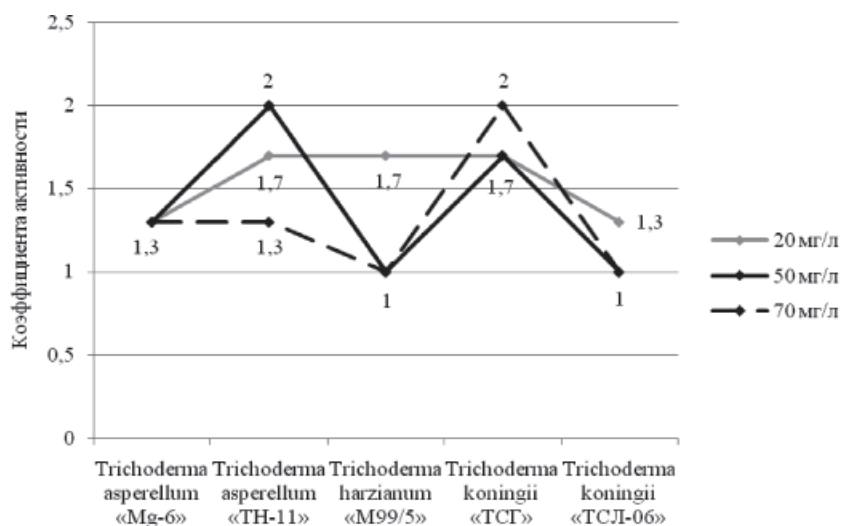


Рис. 1. Коэффициенты активности роста грибов рода *Trichoderma* в присутствии различных концентраций фенола в среде

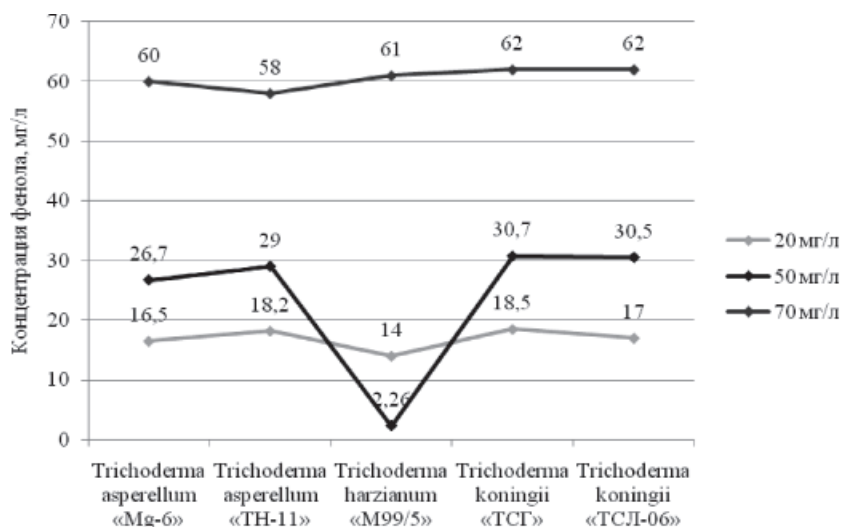


Рис. 2. Результаты биодеструкции фенола различных концентраций в среде штаммами *Trichoderma*

и *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» снизили концентрацию на 17,5 и 15% соответственно, а штаммы *Trichoderma asperellum* «ТН-11» и *Trichoderma koningii* «ТСГ» – менее чем на 9%.

При концентрации фенола в среде 50 мг/л характерна наибольшая, по сравнению с другими начальными концентрациями, эффективность биодеструкции. Так, наблюдалось существенное снижение его концентрации штаммом *Trichoderma harzianum* «М99/5» на 95,5%, штаммы *Trichoderma asperellum* «Мг-6» и *Trichoderma asperellum* «ТН-11» снизили концентрацию на 46,6 и 42% соответственно, штаммы *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» и *Trichoderma koningii* «ТСГ» – на 39%.

При концентрации фенола в среде 70 мг/л штаммы *Trichoderma asperellum* «ТН-11», *Trichoderma asperellum* «Мг-6» и *Trichoderma harzianum* «М99/5» снизили его концентрацию на 17,2; 14,3 и 12,9% соответственно, штаммы *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» и *Trichoderma koningii* «ТСГ» – на 11,4% (рис. 2).

Выводы

Результаты экспериментальных испытаний показали, что исследуемые штаммы видов *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma koningii* и *Trichoderma harzianum* проявляют внеклеточную фенолоксидазную активность, но обладают различной чувствительностью к изменению концентрации фенола в среде.

Скрининг штаммов для биодеструкции фенола показал, что при добавлении фенола в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрациях 50–70 мг/л при поверхностном культивировании перспективными являются *Trichoderma asperellum* «ТН-11» и *Trichoderma koningii* «ТСГ», а в условиях глубинного культивирования – *Trichoderma harzianum* «М99/5», *Trichoderma asperellum* «Мг-6», *Trichoderma asperellum* «ТН-11», *Trichoderma koningii* «ТСГ».

В целях создания биопрепарата на основе триходермы при совмещении поверхностного и глубинного принципов культивирования в одной иммерсионной биотехнологической системе можно рекомендовать штаммы *Trichoderma asperellum* «ТН-11» и *Trichoderma koningii* «ТСГ».

Список литературы

1. Алимova, Ф.К. Биологическое разнообразие видов рода *Trichoderma* (Fungi, Ascomycetes, Hipocreales) и их роль в функционировании микробиоты и защите растений в агроценозах различных почвенно-климатических зон на территории Республики Татарстан: дис. ... д-ра биолог. наук. – Казань, 2006.
2. Большова, Т.А. Основы аналитической химии: учеб. для вузов, в 2 кн. / Т.А. Большова, Г.Д. Брыкина, А.В. Гармаш и др.; под ред. Ю.А. Золотова. – 2-е изд. – М.: Высш. шк., 2002.
3. ГН 2.1.5.689-98. ПДК химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования;
4. Махова, Е.Г. Культивирование грибов рода *Trichoderma* на лигноуглеводных субстратах и получение биопрепарата: автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Красноярск, 2003. – 21 с.
5. Решетникова, И.А. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. Накопление селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами. – М.: СП Новинтех-Пресс, 1997. – 202 с.
6. Pérez-Guerra, N. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation / N. Pérez-Guerra, A. Torrado-Agrasar, C. López-Macias and L. Pastrana // Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – Vol. 2. – № 3. – P. 343–350.
7. Verma M. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control / M. Verma, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, J.R. Val'ero // Biochemical Engineering Journal. – 2007. – Vol. 37. – P. 1–20.

References

1. Alimova, F.K. Biologicheskoe raznoobrazie vidov roda *Trichoderma* (Fungi, Ascomycetes, Hipocreales) i ih rol v funkcionirovanii mikrobioty i zashhite rastenij v agrocenozah razlichnyh pochvenno-klimaticheskikh zon na territorii Respubliki Tatarstan: Diss. doktora biologicheskikh nauk, Kazan, 2006.
2. Bolshova, T.A. Osnovy analiticheskoy himii: Ucheb. dlja vuzov, v 2 kn. / T.A. Bolshova, G.D. Brykina, A.V. Garmash i dr.; pod red. Ju.A. Zolotova. 2-e izd. M.: Vyssh. shk., 2002.
3. GN 2.1.5.689-98. PDK himicheskikh veshhestv v vode vodnyh ob'ektov hozyaystvenno-pitevogo i kulturno-bytovogo vodopolzovaniya.
4. Mahova, E.G. Kultivirovanie gribov roda *Trichoderma* na lignouglevodnyh substratah i poluchenie biopreparata: avtoref. dis. kand. tehn. nauk. Krasnojarsk, 2003. 21 p.
5. Reshetnikova, I.A. Destrukciya lignina ksilotrofnymi makromicetami. Nakoplenie selena i frakcionirovanie ego izotopov mikroorganizmami. M.: SP Novinteh-Press, 1997. 202 p.
6. Pérez-Guerra, N. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation / N. Pérez-Guerra, A. Torrado-Agrasar, C. López-Macias and L. Pastrana // Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 2003. Vol. 2. no. 3. pp. 343–350;
7. Verma M. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control / M. Verma, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, J.R. Val'ero // Biochemical Engineering Journal. 2007. Vol. 37. pp. 1–20.