

## Грибные препараты для деградации лигнинсодержащих отходов: оценка биобезопасности

© 2012. В. А. Терехова<sup>1,2</sup>, д.б.н., зав. лабораторией, О. В. Королева<sup>3</sup>, д.б.н., зав. лабораторией, А.А. Рахлеева<sup>1</sup>, к.б.н., ст. преподаватель, Н.А. Куликова<sup>1,3</sup>, д.б.н., с.н.с., Е.О. Ландесман<sup>3</sup>, глав. специалист, О.И. Кляйн<sup>3</sup>, аспирант,

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

<sup>2</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,

e-mail: letap.msu@gmail.com

Методами биотестирования с использованием различных тест-объектов (микроводоросли, инфузории, дафнии, клетки млекопитающих) проведена оценка биобезопасности грибных биопрепаратов, получаемых на основе культуральной жидкости базидиомицетов *Trametes hirsuta* и *T. maxima*, и предназначенных для ускорения деградации лигнинсодержащих отходов. Установлено, что при выращивании на стандартной глюкозо-пептонной среде получаемые биопрепараты не обладают токсичностью к выбранным тест-объектам, что позволяет сделать вывод об их биобезопасности. При добавлении в питательную среду ионов меди для дополнительной индукции синтета лакказы – одного из основных лигнолитических ферментов, участвующего в процессах деградации лигноцеллюлозных субстратов, биопрепараты приобретали токсичность к ряду изучаемых тест-объектов, что обусловлено, по-видимому, выделением базидиомицетами в процессе роста ряда токсичных метаболитов.

The preparations based on residual nutrition media of basidiomycetes *Trametes hirsuta* and *T. maxima* and designed for degradation of lignin-containing wastes have been subjected to bioassay using different test-objects (microalgae, infusoria, daphnids, and spermatozoa). When standard glucose-peptone nutrition media was used for the fungi growth, the obtained bio-preparations were demonstrated not to be toxic to the selected test objects and were therefore concluded to be safe. In case with copper ions added to the nutrition media to increase laccase production, biopreparations were estimated to be toxic to some of the test-objects. The latter probably resulted from toxicity of some metabolites excreted by basidiomycetes.

Ключевые слова: базидиомицеты, грибные биопрепараты, лигнинсодержащие отходы, биodeградация, биотестирование

Keywords: basidiomycetes, fungal bio-preparations, lignocellulose waste, biodegradation, bioassay

В настоящее время значительно возрос интерес к исследованию разложения лигнинсодержащих отходов микроорганизмами, и к сегодняшнему моменту активно изучается и используется целый ряд биологических препаратов бактериального состава, пригодных для этих целей [1]. Несмотря на доказанную эффективность препаратов бактериального происхождения, их применение невозможно для случаев комплексных отходов, когда наряду с лигнином в обрабатываемом субстрате одновременно присутствуют токсичные ксенобиотики и / или тяжёлые металлы. Единственной группой микроорганизмов, пригодной для целей утилизации комплексных лигнинсодержащих отходов, являются базидиальные грибы «белой гнили», которые, с одной стороны, способны иммобилизовать тяжёлые металлы и разлагать ксенобиотики, а, с другой, обладают высоким деградационным потенциалом по

отношению к лигнину. Уникальной особенностью базидиальных грибов является экстрацеллюлярное выделение этими организмами ферментов, обладающих широкой субстратной специфичностью. Именно эта особенность позволяет базидиальным грибам разлагать в природных условиях не только лигнин, но и ксенобиотики различной химической природы, что определяет возможность использования биопрепаратов на их основе для интенсификации биodeградации лигнинсодержащих отходов в условиях высокого техногенного загрязнения [2].

Установлено, что процесс деградации лигнина грибами «белой гнили» осуществляется по трём основным путям, включая ферментативную деградацию, опосредованно ферментативную и неферментативную деградацию. Наибольшую практическую значимость имеет ферментативный путь разложения, а сре-

ди множества внеклеточных ферментов, принимающих участие в процессе модификации и разрушения лигнина (лигнинпероксидазы, марганецпероксидазы, лакказы, полифункциональные пероксидазы), наиболее перспективной системой для использования в технологиях детоксификации и деградации в настоящее время являются системы на основе лакказ [2]. Поэтому одним из перспективных путей повышения эффективности грибных биопрепаратов для биodeградации лигнинсодержащих отходов является интенсификация синтеза лакказы базидиомицетами, что достигается путём введения в среду для выращивания базидиомицетов ионов меди [3]. Однако присутствие меди в препарате может обуславливать его токсичность, т. к. она способна образовывать прочные хелатные комплексы с белками. Поэтому одним из важнейших этапов создания биопрепаратов является проверка их биобезопасности, которая заключается, в частности, в биотестировании с целью получения оценки их токсичности по отношению к стандартизованным тест-объектам, рекомендованным для целей государственного экологического контроля.

**Основная задача работы** заключалась в оценке биобезопасности разрабатываемых биопрепаратов, получаемых на основе культуральной жидкости штаммов *Trametes hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pil. и *T. maxima* (Mont.) David & Rajchenb, выращенных на стандартной глюкозо-пептонной среде и среде с добавлением меди – индуктора биосинтеза лакказы. Данные штаммы базидиомицетов были выбраны в качестве объектов исследования благодаря их способности разлагать труднодеградируемые субстраты с высокой эффективностью, обусловленной продуцированием высокоактивных лакказ и пероксидаз [3]. В частности, было показано, что за 45 сут. культивирования потери лигнина в соломе, на которой осуществляли рост грибов, составляли 38,9% и 35,4% под воздействием *T. hirsuta* и *T. maxima* соответственно.

### Способ получения грибных препаратов

Штаммы базидиальных грибов *T. hirsuta* и *T. maxima* из коллекции Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН ЛЕ(БИН) хранили на агаризованных косяках, которые готовили путём разбавления сула водой в объёмном соотношении 1:4 с добавлением 2% агара при температуре +4 °С. Среду стерилизовали при 0,5 атм. в течение 1 ч. Среду разливали

горячей в стерильные пробирки и оставляли скошенными на 6 ч. Затем производили рассев грибных культур методом агаровых блоков и оставляли на 7–9 сут. при температуре +27 °С, пока образующийся мицелий не закрывал поверхность агара. В таком виде культура может храниться без пересева от 6 мес. до одного года без потери биосинтетической активности. Для получения грибных биопрепаратов проводили первоначальное наращивание культур с агара методом статического жидкофазного культивирования (поверхностный способ) с последующим пересевом на глубинное культивирование.

При поверхностном способе культивирования выращивание посевного материала проводили на питательной среде с начальным значением pH 6,0 следующего состава (г/л): глюкоза 10,0; пептон 3,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,6;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,001;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  0,4;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,0005;  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  0,05;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5. При выращивании посевного материала грибов *T. hirsuta* поверхностным способом в колбу объёмом 750 мл, содержащую керамические бусы и 150 мл питательной среды, вносили кусочки мицелия с агарового косяка и инкубировали при 26–28 °С в течение 6–8 сут. Колбы с поверхностной плёнкой мицелия могут храниться 6–8 дней при +4 °С.

**Для статического жидкофазного культивирования** грибной инокулюм (кусочки мицелия с агарового косяка) вносили в глюкозо-пептонную питательную среду следующего состава (г/л): глюкоза 10,0; пептон 3,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,6;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,001;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  0,4;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,0005;  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  0,05;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5. Начальное значение pH 6,0 среды доводили титрованием винной кислотой, после чего стерилизовали автоклавированием при 1 атм в течение 30 мин. Выращивание поверхностным способом проводили в колбах объёмом 750 мл, содержащих керамические бусы и 150 мл питательной среды, инкубируя в течение 6–8 сут при 26–28 °С. В дальнейшем поверхностную плёнку мицелия использовали для глубинного культивирования. При температуре +4 °С поверхностная плёнка мицелия в колбах может храниться 6–8 сут без признаков автолиза.

**Глубинное жидкофазное культивирование грибных культур.** При глубинном культивировании мицелиальную плёнку, полученную при поверхностном выращивании культуры, размельчали керамическими бусами, находящимися в колбе, до малых размеров. Полученный таким образом инокулюм вносили

в качалочные колбы в количестве 10–15% от объёма среды и инкубировали на круговых лабораторных качалках при 120–160 об/мин и 27–28 °С в тёмной аэрируемой камере. Для индукции биосинтеза внеклеточной лакказы *T. maxima* и *T. hirsuta* в питательную среду перед стерилизацией дополнительно вносили сульфат меди ( $\text{CuSO}_4$ ) до концентрации 0,25 г/л.

По окончании инкубации грибных культур в питательной среде культуральную жидкость отделяли от мицелия центрифугированием (8000 g, 15 мин). Готовый препарат представлял собой разбавленную в 100 раз культуральную жидкость базидиомицетов, выращенных описанным выше способом. Концентрация белка в исходной культуральной жидкости обеих культур (до разбавления) составляла  $0,60 \pm 0,05$  мг/мл.

**Оценка экотоксичности грибных препаратов.** Проверку биобезопасности биопрепаратов на основе культуральной жидкости грибов *T. hirsuta* и *T. maxima* проводили на 4 стандартизованных тест-культурах разной таксономической принадлежности: протококковых микроводорослях *Scenedesmus*, простейших инфузориях парамециях, низших ракообразных дафниях и на культуре подвижных половых клеток млекопитающих (сперматозоидах быка).

**Микроводоросли.** При действии биопрепаратов на микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Gréb. исследовали отклонение прироста численности популяции клеток в опыте относительно контроля за 72 ч экспозиции стационарной культуры на свету (4000 лк), световой период 24 ч. Учёт проводили прямым счётом клеток (ценобиев) при микроскопировании суспензии в камере Горяева. Критерием токсичности в тест-системе с водорослями считали подавление прироста численности клеток в опыте на 20% относительно контроля или чрезмерную стимуляцию развития водорослей (на 30% и более).

**Инфузории.** В биотестах с использованием инфузорий *Paramecium caudatum* Ehr. токсичность устанавливали по выживаемости особей за 24-ч экспозицию культуры при 22–24 °С в темноте. Согласно методике, токсичной признавали пробу, в которой гибель в опыте составляла 10% и более от первоначальной численности при условии, что контроль соответствовал норме, т. е. выживаемость особей в контрольной выборке инфузорий была не менее 90%.

**Дафнии.** В биотестах с низшими ветвистоусыми рачками *Daphnia magna* Straus. ток-

сичность определяли по выживаемости мальков через 96 ч экспозиции в исследуемых пробах. В соответствии со стандартной методикой пробу считали токсичной при выживаемости дафний менее 90% по сравнению с контролем.

**Сперматозоиды быка.** В биотестах на культуре подвижных половых клеток быка *Bos taurus* L. токсичность оценивали *in vitro* путем мониторинга подвижности сперматозоидов с помощью цифрового анализатора микроскопических видеоизображений АТ-05 пр-ва БМК-ИНВЕСТ. Тест-параметром служил безразмерный индекс токсичности  $I_r$ , отражающий динамику снижения скорости подвижности клеток в опыте относительно контроля. Проба признавалась нетоксичной, если диапазон значений индекса  $I_r$  лежал в диапазоне 80–120%.

Исследование токсичности проб микробиологических препаратов проводили в сертифицированной лаборатории (ЛЭТАП МГУ, № РОСС RU.0001.513050) по аттестованным методикам выполнения измерений (МВИ, Токсикологические методы контроля), рекомендованным для целей государственного экологического контроля и мониторинга.

## Результаты и обсуждение

При выращивании грибов в условиях глубинного культивирования состав культуральной жидкости и, следовательно, её токсичность, может определяться как присутствием веществ, изначально входящих в состав питательной среды (в нашем случае, присутствием ионов меди), так и соединениями, выделяемыми базидиомицетами в процессе роста. Поэтому токсичность биопрепаратов оценивали для двух случаев наращивания грибов: в отсутствие меди и при её внесении.

Результаты испытаний биопрепаратов, полученных на основе культуральных жидкостей базидиомицетов, выращенных на среде без добавления меди, показали их нетоксичность (табл. 1).

Полученные результаты указывают на то, что исследуемые грибные биопрепараты являются безопасными и могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения в качестве активаторов разложения лигноцеллюлозных отходов.

Во второй серии экспериментов биотестированию подвергали препараты, полученные на основе культуральной жидкости грибов *T. hirsuta* и *T. maxima*, выращенных на питательной среде с добавлением ионов меди в

Таблица 1

Результаты оценки токсичности биопрепаратов на основе культуральной жидкости базидиомицетов *T. hirsuta* и *T. maxima*, выращенных на питательной среде без добавления меди

Тест-объект	Препарат на основе культуральной жидкости			
	<i>T. hirsuta</i>		<i>T. maxima</i>	
	значение тест-функции	токсичность	значение тест-функции	токсичность
<i>S. quadricauda</i>	прирост численности 28 %	нет	прирост численности 22 %	нет
<i>P. caudatum</i>	выживаемость 100 %	нет	выживаемость 100 %	нет
<i>D. magna</i>	выживаемость 100 %	нет	выживаемость 100 %	нет

качестве индукторов биосинтеза лакказы. Результаты биотестирования препаратов, приведённые в таблице 2, показали, что биопрепарат на основе культуральной жидкости *T. hirsuta* оказался токсичен по отношению к микроводорослям, а биопрепарат на основе культуральной жидкости *T. maxima* обладал токсичностью по отношению к *P. caudatum* и *D. magna*.

Можно предположить, что токсичность биопрепаратов в данном случае была обусловлена, в первую очередь, присутствием в культуральной жидкости ионов меди. Высказанное предположение хорошо объясняет не обнаруженную токсичность биопрепаратов по отношению к подвижным половым клеткам быка (табл. 2), которые характеризуются наименьшей чувствительностью к меди среди выбранных тест-объектов. Согласно существующим данным, минимальная концентрация сульфата меди, которая может определяться с использованием биотеста по подвижности сперматозоидов (в работе использовали половые клетки кроликов), составляет 3,7 мг/л, т. е. около

$2 \times 10^{-2}$  М меди [4]. В то же время установлено, что 100% гибель инфузорий *P. caudatum* может наблюдаться уже при концентрации меди  $10^{-6}$  М [5], а 50% гибель рачков – при концентрации меди около  $2 \times 10^{-6}$  М [6]. Концентрация меди, угнетающая рост микроводоросли рода *Scenedesmus* на 50%, составляет около  $5 \times 10^6$  М [7]. Таким образом, по чувствительности к меди исследуемые объекты можно расположить в следующий ряд: *P. caudatum* > *D. magna* > *S. quadricauda* > сперматозоиды *B. taurus*. Поэтому возможное присутствие остаточных количеств меди в культуральной жидкости не объясняет результатов оценки токсичности в случае с биопрепаратом на основе *T. hirsuta*, когда была обнаружена токсичность по отношению к микроводоросли *S. quadricauda*, но не по отношению к *P. caudatum* и *D. magna*. Кроме того, вывод о токсичности по отношению к водоросли сделан на основании стимулирующей активности биопрепарата, тогда как в токсичных концентрациях медь обладает ингибирующим действием по отношению к микроводорослям, связанным со способностью  $Cu^{2+}$  замещать

Таблица 2

Результаты оценки токсичности биопрепаратов на основе культуральной жидкости базидиомицетов *T. hirsuta* и *T. maxima*, выращенных на питательной среде с добавлением ионов меди в качестве индукторов биосинтеза лакказы

Тест-объект	Препарат на основе культуральной жидкости			
	<i>T. hirsuta</i>		<i>T. maxima</i>	
	значение тест-функции	токсичность	значение тест-функции	токсичность
<i>S. quadricauda</i>	прирост численности 82%	есть	прирост численности 12%	нет
<i>P. caudatum</i>	выживаемость 100%	нет	выживаемость 3,3%	есть
<i>D. magna</i>	выживаемость 97%	нет	выживаемость 0%	есть
Сперматозоиды <i>B. taurus</i>	It = 96,7	нет	It = 90,0	нет

ионы  $Mg^{2+}$  в хлорофилле, что приводит к ингибированию фотосинтеза и, как следствие, угнетению остальных ростовых процессов [8]. Следовательно, проведённые исследования указывают на то, что токсичность биопрепаратов была обусловлена не остаточным количеством меди в культуральной жидкости, а метаболитами базидиомицетов, выделяемыми в процессе роста.

Таким образом, отобраны наиболее перспективные с точки зрения пригодности для переработки лигноцеллюлозных субстратов штаммы *T. hirsuta* и *T. maxima*, обнаружившие существенную активность в процессах деградации лигнина и целлюлозы при твёрдофазном культивировании. Проверка биобезопасности проб, проведённая в соответствии со стандартными методиками и актуализированными природоохранными нормативными документами, регламентирующими выполнение исследований токсичности образца не менее, чем в двух тест-системах по тест-реакциям организмов разной таксономической принадлежности показала, что можно получить экологически безопасные грибные препараты, пригодные для компостирования растительных отходов, оптимизируя условия культивирования. В данном случае, следует отказаться от искусственной индукции лакказы добавлением к питательной среде ионов меди.

*Авторы благодарят к.б.н. Попутникову Т. О., асп. Тимофеева М.А., ст. инж. Вавилову В.М. за помощь в работе.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009-2013 «Оптимизация процессов биоконверсии органического сырья с целью получения биопродуктов комплексного действия на основе гуминовых веществ» (проект 14. 740. 11.0796).*

## Литература

1. Kumar R, Singh S., Singh O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008 V. 35 P. 377–391.
2. Куликова Н.А., Кляйн О.И., Степанова Е.В., Королева О.В. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2011 Т. 47. № 6. С. 619–634.
3. Степанова Е.В., Королева О.В., Васильченко Л.Г., Карапетян К.Н., Ландесман Е.О., Явметдинов И.С., Козлов И.П., Рабинович М.Л. Разложение овсяной соломы при жидкофазном и твердофазном культивировании // Прикл. биохим. микробиол. 2003. Т. 39. №1. С. 74–84.
4. Roychoudhury Sh., Massanyi P., Bulla J., Choudhury M.D., Straka L., Lukac N., Formicki G., Dankova M., Bardos L. In vitro copper toxicity on rabbit spermatozoa motility, morphology and cell membrane integrity // J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. 2010. V. 45. № 12. P. 1482–1491.
5. Nogueira P.F.M., Melao M.G.G., Lombardi A.T., Nogueira M.M. Natural DOM affects copper speciation and bioavailability to bacteria and ciliate // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2009. V. 57. P. 274–281.
6. Fan W.H., Cui M.M., Liu H., Wang, C.A., Shi Z.W., Tan C., Yang X.P. Nano-TiO(2) enhances the toxicity of copper in natural water to *Daphnia magna* // Environ. Pollution. 2011. V. 159. № 3. P. 729–734.
7. Ma M., Zhu W.Z., Wang Z.J., Witkamp G.J. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid // Aquatic Toxicology. 2003. V. 63. P. 221–228.
8. Kupper H., Setlik I., Setlikova E., Ferimazova N., Spiller M., Kupper F.C. Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda* // Functional plant biology – 2003. V. 30. № 12. P. 1187–1196.