

О НЕКОТОРЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ФУНКЦИЯХ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТЕХНОГЕННЫХ ОТХОДОВ ГОРНОРУДНЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ

В.М.Катола

*Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,
675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1.***РЕЗЮМЕ**

Из техногенных горнорудных отходов, содержащих в больших концентрациях различные тяжелые металлы, выделено 10 штаммов плесневых грибов рода *Penicillium*, которые при температуре 24...+29°C образуют комплексы внеклеточных целлюлаз, разрушающих фильтровальную бумагу. Одновременно эти же штаммы в различной степени синтезируют и выделяют в среду антибиотик пенициллин. При этом самыми активными продуцентами оказались *P. citreo-viride* и *P. canescens*: первый максимально выделял в культуральную среду 122,9 мкг/мл пенициллина, второй – 30,72 мкг/мл. Это открывает дополнительные возможности их практического применения в биотехнологии.

Ключевые слова: тяжелые металлы, плесневые грибы, внеклеточные целлюлазы, пенициллин.

SUMMARY**SOME BIOSYNTHETIC FUNCTIONS OF MOLD FUNGI ISOLATED FROM INDUSTRIAL WASTE MINING ENTERPRISES**

V.M.Katola

*Institute of Geology and Nature Management of Far
Eastern Branch RAS, 1 Relochny Lane,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

10 strains of *Penicillium* mold fungi which at 24...+29°C form a complex of extracellular cellulases destroying paper were isolated from industrial mining wastes containing high concentrations of various heavy metals. Simultaneously these strains synthesize and excrete penicillin antibiotic. The most active producers were *P. citreo-viride* and *P. canescens*: the first one excreted 122.9 mcg/mL of penicillin, the second one 30.72 mcg/mL. This suggests new opportunities of their practical application in biotechnology.

Key words: heavy metals, fungi, extracellular cellulase, penicillin.

Качество любого местообитания или степень соответствия параметров среды потребностям людей и других живых организмов определяет не только биологическое разнообразие, но и влияет на их функциональную роль. Поэтому нарушение природных местообитаний в настоящее время рассматривается как один из наиболее значимых экологических стрессоров. Тяжелые металлы (ТМ), занимая значительную долю среди загрязнителей окружающей среды, опасны для всех живых организмов [2, 3, 7]. Правда, в процессе эволюции микроорганизмы выработали различные механизмы изменчивости, включая металлорезистентность (ограничение поступления металлов в клетку

путем изменения клеточной проницаемости, активный выброс из клетки, внутриклеточное и внеклеточное связывания, конверсия в менее токсичную форму). Опасность ионов ТМ состоит в том, что в зависимости от состава, концентрации, экспозиции, температуры и других факторов они способны соединяться с нуклеотидами, белками, коферментами и другими классами веществ, участвующих в метаболизме. В итоге изменяются кинетика роста и размножения бактерий или грибов, проницаемость цитоплазматической мембраны и морфология клеток. В невысоких концентрациях ионы ТМ стимулируют биохимические реакции, необходимые для энергии и построения клетки, при избытке наступает ее гибель. Микроскопические грибы адсорбируют металлы на поверхности мицелия, бактерии – на поверхности или внутри клеток. Ртуть, кадмий, серебро и уран преимущественно скапливаются на поверхности клеток, ионы меди, цинка, никеля, кобальта, свинца, стронция, иногда кадмия и урана большей частью транспортируются внутрь клеток и лишь частично на поверхности. Способность металлов к биосорбции используется для их извлечения из растворов. Например, при помощи микроскопических грибов из растворов удается извлечь до 96-98% серебра и золота, до 84% платины. Характер взаимодействия микроорганизмов с ТМ подробно проанализирован еще в XX веке. В то же время многие аспекты действия комплекса токсичных металлов на биологический потенциал бактерий, плесневых и дрожжевых грибов, обитающих в техногенных горнорудных отходах, изучен далеко не в полной мере.

В данной работе представлены результаты исследований по определению целлюлазной активности и синтеза пенициллина плесневыми грибами, выделенными из террикона ручной сортировки руд Кировского рудника при шахтной добыче золота в Амурской области, многолетних хвостах шлихообогатительной установки (ШОУ) при русловой добыче золота Софийского золотоносного узла (Хабаровский край) и пыли медно-никелевых руд, осевшей в сортировочном отделении плавильного цеха Надеждинского металлургического завода (г. Норильск).

Материалы и методы исследования

О целлюлазной активности *Penicillium canescens*, *P. chrysogenum* и *P. citreo-viride* судили по степени гидролиза фильтровальной бумаги. Результаты оценивали по трехбалльной системе: 1 балл (+) означает слабый рост мицелия гриба; 2 балла (++) – рост мицелия при отсутствии зон просветления на бумаге; 3 балла (+++) – наличие хорошо развитого мицелия, обволакивающего субстрат, и обильное спорообразование. В этом случае визуально отмечается разрушение фильтровальной бу-

маги. Для определения пенициллина штаммы *P. canescens*, *P. chrysogenum* и *P. citreo-viride* инкубировали в жидкой питательной среде Чапека (источник азота NaNO_3 , исходная pH 7,0) в течение 10 суток при температуре $+24 \dots +29^\circ\text{C}$. Во время роста плесеней среду не оптимизировали, не продували стерильным воздухом и не добавляли предшественника, что обычно требуется в биотехнологии полноценной ферментации антибиотика. После удаления всего мицелия в послеинкубационном растворе методом серийных разведений определяли концентрацию пенициллина по его тормозящему влиянию на индикаторную культуру *Staphylococcus aureus* P 209 [5, 6]. При этом умножали наибольшее разведение культурального раствора, который задерживал рост тест- культуры, на наименьшую концентрацию стандарта пенициллина, задерживающий рост *Staphylococcus aureus*. Чтобы выяснить, синтезируют ли плесени антибиотик непосредственно в месте обитания, таким же способом выясняли его присутствие в стерильной водопроводной воде, которой отмывали образцы из террикона и хвостов ШОУ. В экспериментах исследовано 10 штаммов плесневых грибов. Концентрацию химических элементов в горнорудных отходах определяли с помощью спектрографа ДФС-9.

Результаты исследования и их обсуждение

Подчеркнем, что изучаемые нами техногенные горнорудные отходы различаются между собою генезисом, структурой, геохимическим составом, промышленными запасами полезных ископаемых, технологией обработки и др. В таблице 1 показано, что в отличие от хвостов ШОУ Софийского прииска, в терриконе Кировского рудника содержится меньше никеля (в 6 раз), кобальта (в 8 раз), хрома (в 16,2 раза), цинка (в 108 раз), свинца (в 6,8 раза) и мышьяка (в 6,8 раз), тогда как в медно-никелевой пыли по сравнению с Кировским терриконом и хвостами ШОУ меди больше в 15,7-54,2 раза и никеля в 255,6-45,9 раз. Ртуть в терриконе и пыли не найдена. Физико-химическое состояние этих отходов, а также состояние их микронаселения не постоянны, меняются под влиянием многих факторов окружающей среды, в первую очередь, в периоды увлажнения и высыхания. При оводнении (дожди, таяние снегов, водный конденсат) вода взаимодействует с ионами металлов и ее водная активность («*water activity*» – *aw*) становится ниже 1,0. Все микроорганизмы развиваются при *aw* от 0,99 до 0,6, в большинстве $\geq 0,95$. Растущих при *aw* $< 0,6$ не выявлено. Для грибов же *aw* должна составлять не менее 0,85-0,65, что способствует «оживлению» и прорастанию конидий (спор), формированию, развитию и функционированию мицелия и его адаптации к неблагоприятному воздействию водорастворимых элементов.

Микроорганизмы широко используются в биотехнологии как продуценты органических кислот, ферментов, антибиотиков и др. [1, 2, 5]. В аэробных и анаэробных условиях бактерии рода *Clostridium*, *Pseudomonas*, некоторые актиномицеты, обитатели желудка жвачных животных, грибы *Aspergillus amstel-*

dami, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Penicillium notatum*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Trichoderma lignorum*, *T. virida*, *T. koningii*, *Rhizopus oryzae*, вегетирующие в почве, растительных остатках и в организмах животных, расщепляют наиболее распространенный в природе сложный полисахарид – целлюлозу [1, 4]. Она содержится в клеточных оболочках всех высших растений и расщепляется ферментами целлюлазного комплекса, выделяемого в окружающую среду или связанного с клеточной поверхностью грибов. Считается, что целлюлоза ферментируется поэтапно: целлюлоза \rightarrow целлодекстрины \rightarrow целлотетроза \rightarrow целлобиоза \rightarrow d-глюкоза. Между тем, известен штамм *Aspergillus oryzae*, выделяющий как целлюлазу, так и целлобиозу. В технологии производства целлюлозы используются различные способы, включая культуру *Trichoderma viride*, глубоко разрушающую растительные полисахариды [4]. Это связано с тем, что целлюлазная активность грибов довольно высокая и составляет от 7,40 до 29,10 е.а. (единиц активности). Активность бактерий гораздо ниже – 0,01-0,2 е.а. Влияние тяжелых металлов на ферментативную активность целлюлаз неоднозначно: ионы кобальта, меди, цинка, хрома, ртути и свинца ее стимулируют, ионы серебра и их соединения – ингибируют. Кроме того, целлюлазная активность лимитируется низкой температурой. Как видно из таблицы 2, в интервале температур от $10 \dots +14^\circ\text{C}$ до $25 \dots +29^\circ\text{C}$ выделенные из токсичных хвостов ШОУ плесени в процессе роста разрушают фильтровальную бумагу (приготовленную из ценных сортов древесины) с образованием на ней зон просветления и деструкции. Но при температурах $10 \dots +14^\circ\text{C}$ интенсивность целлюлазной активности у всех штаммов выражена слабо, а рост *P. chrysogenum*, в отличие от роста *P. canescens* и *P. citreo-nigrum*, запаздывает на двое суток. К тому же, даже при оптимальных температурах он слабо лизирует бумагу. Зато к 10 суткам эффективность гидролиза бумаги всеми тремя штаммами возрастает и выравнивается. На наш взгляд, выделенные из перечисленных горнорудных отходов *P. canescens*, *P. citreo-nigrum* и *P. chrysogenum* в указанных параметрах температур характеризуются высокой целлюлазной активностью, так как оптимальная температура действия эндоглюканаз, целлобиогидролаз, бета-глюкозидаз или их комбинаций, которые гидролизуют целлюлозосодержащее сырье, колеблется от 45 до 80°C , комплексов – от 50 до 60°C . Следовательно, плесневые грибы, подвергаясь в горнорудных отходах комплексному воздействию ТМ, сохраняют способность к расщеплению различных растительных и животных остатков до полимераз. Последние затем проникают в клетку и включаются в биосинтетические процессы, заодно служат питательным субстратом для всего микросообщества. Поэтому не исключено, что плесневые грибы, обитающие в биотопах с высоким содержанием ТМ, могли бы представлять значительный интерес для ферментативного гидролиза целлюлозы, содержащейся в большом количестве в отходах целлюлозно-бумажной промышленности, лесоперерабатывающей, сельскохозяйственной, пищевой и др.

Таблица 1

Валовая концентрация некоторых минеральных элементов в горнорудных отходах (г/г)

Минеральные элементы	Объекты		
	Террикон Кировского рудника	Хвосты ШОУ	Пыль медно-никелевая
Co	7,0±0	56,0±6,0	40,0
Cr	185,0±35,0	3000,0±1204,1	170,0±63,0
Cu	1150,0±413,4	326,0±49,08	17670,0±3570
Ni	40,0±4,08	240,0±74,8	10220,0±212,6
Hg	-	160,0±36,7	-
Pb	50,0±8,16	340,0±92,7	19,2±0,8
Zn	-	108,0±18,0	98,0,0±26,0
As	850,0±45,6	5800±800,0	-

Примечание: (-) элемент не обнаружен.

Наряду с ферментами, микробные популяции выделяют в среду широкий спектр вторичных метаболитов самого разного химического строения. Они, не будучи основными соединениями обмена веществ в клетке, образуются в его тупиковых ветвях и не требуются для роста, развития и репродукции. В их числе витамины, алкалоиды, бактериоцины, антибиотики, токсины, пигменты и пр. Некоторые из них замедляют или предотвращают развитие других видов либо их убивают. Хотя значимость вторичных метаболитов для клетки постоянно дискутируется, имеется немало фактов, указывающих на их участие в обменных процессах, транспорте ионов, в адаптации и выживании продуцента, особенно в экстремальных условиях. Антибиотики, как важный экологический фактор, микроорганизмы могут продуцировать непосредственно в почвах, водах, на поверхности растительных остатков и других биотопах. В связи с этим отметим, что в воде, которой мы отмывали исследуемые образцы горноруд-

ных отходов, пенициллин не обнаруживался. Находящиеся под воздействием антибиотиков микробные популяции лишаются возможности свободно развиваться, прежде всего, потому, что мишенью являются либо клеточная стенка, либо цитоплазматическая мембрана, рибосомы или нуклеоид. Однако клетки микроорганизмов легко вырабатывают защитные механизмы: 1) модифицируют молекулы-мишени, затрудняющие действие антибиотика; 2) продуцируют ферменты, инактивирующие его; 3) развивают системы активного выброса антибиотика из клетки. Согласно таблице 3, продукция пенициллина у разных видов плесневых грибов, выделенных из техногенных отходов горнорудных предприятий, различается. Он более характерен для *P. canescens* и *P. citreo-viride*. Причем, какой-либо четкой связи между уровнем тяжелых металлов в месте обитания продуцентов и синтезом антибиотика не выявлено.

Таблица 2

Сравнительная характеристика целлюлазной активности грибов из рода *Penicillium* при различных температурах

Сутки роста	<i>P. canescens</i>		<i>P. citreo-nigrum</i>		<i>P. chrysogenum</i>	
	10...+14°C	24...+29°C	10...+14°C	24...+29°C	10...+14°C	24...+29°C
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	+	++	+	++	-	+
8	++	+++	++	+++	-	+
9	+++	+++	+++	+++	+	++
10	+++	+++	+++	+++	++	+++

Примечание: - отсутствие роста, + слабый рост, ++ появление зон просветления, +++ хорошие рост и зоны просветления с разрушением фильтровальной бумаги.

Таблица 3

Уровень пенициллина (мкг/мл) в культуральной среде 10-суточных грибов рода *Penicillium*, выделенных из горнорудных отходов

Разведение товарного пенициллина (мкг/мл)			3,9	1,95	0,97	0,48	0,24	...	0,015
Разведение культурального раствора			1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:8192		1:65536
Рост индикаторного штамма <i>St. aureus</i>			-	-	-	-	-	...	+
Биотоп	Штаммы грибов	№ штаммов	Ферментация пенициллина грибами						
ТРСР	<i>P. canescens</i>	1	-	-	-	30,72	+	...	+
		2		7,68	+	+	+		+
Хвосты ШОУ	<i>P. citreo-viride</i>	1	-	-	-	-	122,9		+
	<i>P. chrysogenum</i>	1	-	-	15,36	+	+		+
	<i>P. canescens</i>	1	-	-	-	30,72	+		+
		2	-	7,68	+	+	+		+
		3	3,84	+	+	+	+		+
		4	-	7,68	+	+	+		+
5	3,84	+	+	+	+		+		
МНП	<i>P. canescens</i>	1			15,36	+	+		+
		2	-	-	15,36	+	+	...	+

Примечание: ТРСР – террикон ручной сортировки руд; ШОУ – шлихообогажительная установка; МНП – медно-никелевая пыль; (-) отсутствие роста тест-культуры, (+) рост тест-культуры.

Выводы

1. Выделенные из различных горнорудных отходов грибы *Penicillium canescens*, *P. citreo-viride* и *P. chrysogenum* в интервале температур от 10...+14°C до 25...+29°C на 7 сутки роста проявляют высокую целлюлазную активность, вызывая деструкцию фильтровальной бумаги. Одновременно эти же штаммы способны с различной интенсивностью синтезировать и выделять антибиотик пенициллин. Наиболее активными его продуцентами являются *P. citreo-viride* и *P. canescens*, что открывает дополнительные возможности их практического применения в биотехнологии.

2. Несмотря на высокие концентрации ТМ, техногенные горнорудные отходы типа террикона Кировского рудника, образованного при шахтной добыче золота, многолетних хвостов ШОУ, накопленных при русловой добыче золота, и пыли (оседающей при дезинтеграции медно-никелевых руд) могут быть удобным объектом для изучения биологических свойств обитающего в них микронаселения, поиска и выделения штаммов, которые могли бы использоваться в биотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алмагамбетов К. Х. Биотехнология микроорганизмов. Астана, 2008. 244 с.
 2. Антипова Т.В. Штаммы-реликты грибов рода *Penicillium* как продуценты вторичных метаболитов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пушино, 2009. 22 с.
 3. Богачева А.С. Чувствительность цианобактерий к токсическому действию солей тяжёлых металлов: ав-

тореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 2011. 21 с.

4. Гнеушева Н.Е., Павловская Н.Е. Яковлева И.В. Биологическая активность грибов рода *Trichoderma* и их промышленное применение // Вестник Орловского гос. аграрного ун-та. 2010. Т.24, №3. С.36–39.

5. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с..

6. Навашин С.М., Фомина И.П. Справочник по антибиотикам. М.: Медицина, 1974. 415 с.

7. Теплая Г.А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды (обзор литературы) // Астраханский вестник экологического образования. 2013. №1. С.182–192.

REFERENCES

1. Almagambetov K. X. *Biotekhnologiya mikroorganizmov* [Biotechnology of microorganisms]. Astana, 2008.
 2. Antipova T. V. *Shtammy-relikty gribov roda Penicillium kak produtsenty vtorichnykh metabolitov* [Strains-relics of *Penicillium* fungi as producers of secondary metabolites: abstract of thesis. ... PhD of biol. sci.]. Pushchino; 2009.
 3. Bogacheva A.S. *Chuvstvitel'nost' cianobakteriy k toksicheskomu deystviyu soley tyazholykh metallov* [Sensitivity of cyanobacteria to toxic effects of heavy metals salts: abstract of thesis. ... PhD of biol. sci.]. St. Petersburg; 2011.
 4. Gneusheva N.E., Pavlovskaya N.E. Yakovleva I.V. *Vestnik Orlovskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 2010; 24(3): 36–39.

5. Egorov N.S. *Osnovy ucheniya ob antibiotikakh* [Fundamentals of theory of antibiotics]. Moscow: Nauka; 2004.
6. Navashin S.M., Fomina I.P. *Spravochnik po antibi-*

otikam [Handbook of antibiotics]. M.: Meditsina; 1974.

7. Teplaya G.A. *Astrakhanskiy vestnik ekologicheskogo obrazovaniya* 2013; 1:182–192.

Поступила 26.01.2015

Контактная информация

Виктор Моисеевич Катола,

кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник,

*Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,
675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1.*

E-mail: katola-amur@list.ru

Correspondence should be addressed to

Viktor M. Katola,

MD, PhD, Leading staff scientist,

*Institute of Geology and Nature Management of Far Eastern Branch RAS,
1 Relochniy Lane, Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.*

E-mail: katola-amur@list.ru