

УДК 663.5

СПОСОБНОСТЬ К АНАЭРОБНОМУ РОСТУ И АКТИВНОСТЬ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ У МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

© 2011 г. А. В. Кураков*, К. С. Хидиров**, В. С. Садыкова***, Д. Г. Звягинцев**

*Международный биотехнологический центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва 119991

e-mail: kurakov57@mail.ru

**Факультет почвоведения МГУ

***Биологический факультет МГУ

Поступила в редакцию 12.04.2010 г.

На основе предложенного метода проведено выделение грибов в анаэробных условиях и установлены различия в их численности и видовом составе в разных местообитаниях. На представительной выборке (344 штаммов более 60 видов) определена способность микромицетов разных таксонов к анаэробному росту и спиртовому брожению. Среди грибов, растущих в анаэробных условиях, выявлены виды с высокой, умеренной и низкой активностью брожения. Способность к анаэробному росту и брожению зависела от таксономической принадлежности. В ряде случаев проявление этих свойств зависело от местообитания, из которого штамм был выделен. Максимальный уровень накопления этанола в культуральной жидкости (1.2–4.7%) обнаружен у *Absidia spinosa*, *Aspergillus* sp. группы *flavus*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium* sp., *Mucor circinelloides*, *Mucor* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. sambucinum*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma* sp.

При производстве этилового спирта используют отобранные расы дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida scottii*, *C. tropicales*) и бактерий [1–3]. Значительно меньше внимания уделяли изучению способности мицелиальных микроскопических грибов к брожению, так как их традиционно рассматривали как аэробные организмы. Вместе с тем в природе эти грибы часто встречаются в местообитаниях с ограниченной обеспеченностью кислородом. Значительное количество грибного мицелия сохраняет жизнеспособность в длительно инкубируемых в восстановительных условиях почвах, в затопляемых болотных почвах и верховых болотах [4–6]. В последние годы появились сведения о способности микромицетов к росту в анаэробных условиях и спиртовому брожению [6, 7], причем не только представителей родов *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, что было известно ранее [8–11].

Микроскопические грибы представляют особый интерес для получения этанола из растительных полимерных субстратов, так как многие из них являются продуцентами активных гидролаз. Штаммы таких грибов могли бы использоваться для переработки растительного материала, для гидролиза полимерных субстратов в аэробных условиях и сбраживания сахаров при лимитированной обеспеченности среды кислородом.

Цель работы – оценка активности спиртового брожения у мицелиальных микроскопических грибов разных таксонов, выделенных из различных местообитаний.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. При поиске изолятов грибов, обладающих способностью к спиртовому брожению, исходили из предположения, что они должны характеризоваться хорошим ростом в анаэробных условиях на средах с простыми сахарами. Для исследования было отобрано 344 штамма микроскопических грибов, разных таксономических групп. Чистые культуры микромицетов были изолированы из образцов почв, отобранных в различных регионах и экотопах – дерново-подзолистой почвы, выщелоченного чернозема и с рисовых полей, растительных остатков, донных илов и затопляемых грунтов вдоль водоемов, плодовых тел макромицетов, семян хвойных и злаковых растений, торфа верхового болота, корней болотных растений и растений гидроморфных лугов, погребенных почв, культурных слоев из раскопа античного города Фанагории (Краснодарский край, Россия), вермикомпоста, пищеварительного тракта дождевых червей и личинок усачей.

Большинство отобранных штаммов (320 из 344) были выделены стандартным посевом на чашки Петри на среды Чапека и сусло-агар и выращиванием в атмосфере воздуха при 25°C. 24 штамма были отобраны из культур, изолированных из природных образцов непосредственно при анаэробной инкубации посевов.

Анаэробное выделение грибов. Выделение грибов в анаэробных условиях проводили методом посева мелкозема свежих образцов современных почв, культурных слоев и погребенных почв, фрагментов

корней, растительных материалов, содержимого пищеварительного тракта безпозвоночных на глюкозо-пептонную среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, KCl – 0.5, MgSO_4 – 0.5, FeSO_4 – 0.01, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.0, агар – 15.0 г/л, пептон – 5.0, глюкоза – 5.0, дрожжевой экстракт – 0.5, а также 1 мл/л раствора микроэлементов (мг/л): ЭДТА – 500, $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 200, $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10, $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 3, H_3BO_4 – 30, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1, Na_2MoO_4 – 3, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2. Для подавления роста бактерий в стерильную, расплавленную среду добавляли антибиотики стрептомицин и хлорамфеникол в концентрации 200 мг/л среды. Чашки Петри с посевным материалом помещали в специальные пластиковые боксы (“BioMerieux Co”, Франция) и инкубировали в течение 7–10 сут в анаэробных условиях при 25°C. Анаэробноз создавали с помощью газовых анаэробных пакетов “GENbox anaer”, (“BioMerieux Co”, Франция). Поглощение кислорода и повышение уровня диоксида углерода в боксах происходило в течение 2.5 ч. Анаэробноз в них контролировали индикаторами на основе резазурина (“Oxoid Limited”, Англия). Такой подход к созданию бескислородной атмосферы был ранее использован для анаэробного культивирования бактерий [12, 13]. В данной работе он применен для проверки способности к анаэробному росту чистых культур грибов и для их выделения в анаэробных условиях из природных объектов. В этом случае необходимо использовать оптимальные для роста грибов среды с дрожжевым экстрактом или витаминами) и микроэлементами, более низкую температуру (25°C), добавлять в повышенной дозе антибактериальные антибиотики и инкубирование проводить 1–2 нед.

Из каждого местообитания было проанализировано не менее 10 образцов.

Идентификация изолятов грибов. Идентификацию микроскопических грибов осуществляли по культурально-морфологическим признакам по соответствующим для конкретной систематической группы определителям [14–18].

30 изолятов, которые принадлежали к разным систематическим группам согласно определению по культурально-морфологическим признакам, были идентифицированы с помощью ПЦР-амплификации с последующим секвенированием амплификатов и их анализом (GenBank Data system: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, <http://rdp.cme.msu.edu/html/>, <http://www.arb-home.de>). Чистоту штаммов на наличие бактерий-спутников или бактериальной контаминации контролировали микроскопией и высевом на среды с циклогексимидом.

Оценка роста грибов в анаэробных условиях. Способность к росту в анаэробных условиях у штаммов, изолированных при инкубации посевов в атмосфере воздуха, проверяли на глюкозо-минеральной среде

или агаризованной среде Чапека с дрожжевым экстрактом и микроэлементами (рН 6.5). В среды добавляли 1 мл/л раствора микроэлементов (г/л): $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ – 0.8; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.8; $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.8; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.8. Чашки Петри помещали в герметичные пластиковые боксы с генераторами анаэробной атмосферы и индикаторами анаэробнозиса. Посев инкубировали в течение 7–14 сут при 25°C, при наличии роста грибов оценивали размеры их колоний и рассчитывали радиальную скорость роста [19].

Оценка активности спиртового брожения штаммов в анаэробных условиях. Активность брожения штаммов грибов оценивали по накоплению этанола в культуральной жидкости в анаэробных условиях. Мицелий предварительно выращивали на жидкой среде Чапека в течение 4–6 сут, отмывали в стерильной дистиллированной воде и переносили во флаконы объемом 100 мл с 50 мл глюкозо-минеральной среды при содержании глюкозы – 1, 4 и 5%. У ряда наиболее активных культур продукция этанола была определена при более высоких концентрациях глюкозы (10 и 20%). Флаконы закрывали резиновыми пробками, воздух замещали на N_2 при продувании азотом в течение 1 мин и инкубировали в течение 1 нед. при 25°C. Содержание спирта определяли в отфильтрованной культуральной жидкости на 4 и 7 сут на газо-жидкостном хроматографе (Московский опытный завод, Россия, модель Chrom 3700 с пламенно-ионизационным детектором, колонка SOVPOL (1.5 м), газ-носитель – аргон, температура колонки 160°C, испарителя 240°C, детектора 250°C).

Для расчета удельной активности образования этанола определяли биомассу грибов во флаконах после завершения опыта. Мицелий промывали дистиллированной водой и высушивали при 60–70°C до постоянного веса [19]. Рассчитывали также эффективность сбраживания глюкозы до этанола.

Для определения эндоглюканазной активности грибов использовали среду с микрокристаллической целлюлозой (“Sigma”, type 100, США) следующего состава (г/л водопроводной воды): KH_2PO_4 – 1.0, MgSO_4 – 0.5, KCl – 1.0, NaNO_3 – 2.0, FeSO_4 – 0.01, CaCl_2 (CaCO_3) – 0.04, дрожжевой экстракт – 0.02, микрокристаллическая целлюлоза – 8.0. Колбы на 250 мл со стерильной жидкой средой (100 мл) инокулировали мицелием и спорами и культивировали на качалке (120 об/мин) при 28°C в течение 7 сут. Культуральную жидкость отбирали в пластиковые пробирки на 2 мл и удаляли из нее мицелий и остатки целлюлозы центрифугированием (2 мин, 14000 г). Эндоглюканазную и ксиланазную активности в пробах определяли по накоплению восстанавливаемых сахаров, сахара – методом Шомоди–Нельсона с глюкозой в качестве стандарта. В качестве субстрата использовали 1%-ные растворы карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и березового ксилана

Таблица 1. Микроскопические грибы, изолированные из различных местообитаний в анаэробных условиях

Род/вид	Почва	Погребенная почва и культурные слои	Верховой торф и зеленые мхи	Корни и растительные субстраты	Место обитания ассоциированные с беспозвоночными
<i>Acremonium</i> sp.	+				
<i>Aspergillus niger</i>	+	+			+
<i>Aspergillus</i> sp. гр. <i>flavus</i>	+	+			
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	+	+		+	
<i>Cunningamella elegans</i>				+	
<i>Fusarium oxysporum</i>	+			+	+
<i>F. solani</i>	+			+	
<i>Fusarium</i> spp.	+	+		+	+
<i>Mucor circinelloides</i>	+				
<i>Mucor hiemalis</i>	+				+
<i>Mucor</i> spp.	+			+	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>					+
<i>Paecylomyces</i> sp.	+			+	
<i>Torrubiella confrasa</i>			+		
<i>Trichoderma aureoviride</i>			+		
<i>T. harzianum</i>	+		+		
<i>Trichoderma</i> spp.			+	+	+
<i>Zygorrhynchus heterogamus</i>			+		
<i>Zygorrhynchus</i> sp.			+	+	+
<i>Mycelia sterilia</i> (светлоокрашенный)	+		+		+
<i>Mycelia sterilia</i> (темноокрашенный)	+				

(“Sigma”, США), соответственно. Активность ферментов определяли при pH 5.0 и 50°C в течение 5 мин для КМЦ и 10 мин для ксилана [20]. Активность 1,4-β-эндоглюканазы и ксиланазы выражали в международных единицах (Е/мл).

Статистическая обработка. Опыты проводили в трехкратной повторности. Рассчитывали средние значения, стандартные отклонения и коэффициент вариации данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В анаэробных условиях инкубации посевов из различных местообитаний были выделены представители 23 видов и несколько изолятов в форме стерильного мицелия (табл. 1). Установлены различия в составе и доминировании видов в образцах из почв, верхового торфа, растительных остатков, корней, погребенных почв и культурных слоев, и экониш, связанных с беспозвоночными.

Наиболее разнообразный спектр видов обнаружен в анаэробных посевах из почв. Он включал представителей *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Aspergillus niger*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cun-*

ningamela elegans, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Fusarium* spp., *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *Mucor* spp., *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, несколько видов рода *Trichoderma*, *Zygorrhynchus heterogamus*, *Zygorrhynchus* sp. и организмы, представленные стерильным светлоокрашенным и темноокрашенным мицелием. В целом, данный состав видов сходен с тем, который был выявлен при использовании модификации метода Хангейта для анаэробной изоляции микромицетов из почв разных типов [6]. Таким образом, предложенный нами подход может использоваться для выделения микроскопических грибов в анаэробных условиях из почв и других объектов, а также для оценки способности к анаэробному росту их чистых культур.

Из погребенных почв и культурных слоев в анаэробных условиях инкубации посевов выделено значительно меньше видов. Среди них доминировали виды родов *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, а также *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp. гр. *flavus*. Эти таксоны грибов часто выделяются в анаэробных посевах из почв южнотаежной и степной зоны [6]. В посевах с корней и различных растительных остатков часто обнаруживали виды родов

Таблица 2. Рост в анаэробных условиях штаммов микроскопических грибов, выделенных при инкубации посевов в атмосфере воздуха (в аэробных посевах)

Род/вид	Число штаммов		
	прове- рено	радиальная ско- рость роста, мм/ч	
		0.03–0.10	>0.10
<i>Absidia</i> sp.	3	—	3
<i>Absidia spinosa</i>	3	1	2
<i>Acremonium</i> sp.	2	2	—
<i>Actinomucor elegans</i>	1	—	1
<i>Aspergillus</i> sp. гр. <i>flavus</i>	2	2	—
<i>Aspergillus niger</i>	4	4	—
<i>Aspergillus terreus</i>	2	1	1
<i>Aspergillus</i> sp.	3	2	1
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	5	3	2
<i>C. solani</i> f. <i>solani</i>	1	—	1
<i>Clonostachus</i> sp.	3	2	1
<i>Cunningamella echinulata</i>	1	1	—
<i>Fusarium avenacium</i>	4	2	2
<i>F. dimerum</i>	1	—	1
<i>F. fusarioides</i>	1	1	—
<i>F. moniliforme</i>	4	2	2
<i>F. oxysporum</i>	7	—	7
<i>F. poae</i>	1	1	—
<i>F. sambucinum</i>	1	1	—
<i>F. solani</i>	7	—	7
<i>F. sporotrichioides</i>	9	5	4
<i>Fusarium</i> spp.	28	8	20
<i>Mucor circinelloides</i>	2	—	2
<i>Mucor hiemalis</i>	2	—	2
<i>Mucor plumbeus</i>	1	—	1
<i>Mucor</i> spp.	21	2	19
<i>Paecilomyces</i> sp.	2	2	—
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	4	1	3
<i>Sphaerostilbella aureonitens</i>	1	—	1
<i>Trichoderma asperellum</i>	7	4	3
<i>T. atroviride</i>	7	3	4
<i>T. citrinoviride</i>	2	2	—
<i>T. harzianum</i>	7	6	1
<i>T. koningii</i>	3	1	2
<i>T. viride</i>	6	3	3
<i>Trichoderma</i> spp.	36	9	27
<i>Zygorrhynchus heterogamus</i>	1	—	1
<i>Z. moelleri</i>	2	—	2
<i>Zygorrhynchus</i> sp.	5	1	4

Fusarium (*Fusarium oxysporum*), *Trichoderma*, *Clonostachys*, из мукоровых, наряду с *Mucor* spp., *Cunningamella elegans* и *Zygorrhynchus* sp., а в образцах верхового торфяника доминировали виды родов *Trichoderma* и *Zygorrhynchus*. Из пищеварительного тракта дождевых червей и личинок усачей, а также ассоциированных с ними местообитаний (копролитах, вермикомпосте, переработанной древесине), в анаэробных условиях инкубации посевов изолировали представителей *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Zygorrhynchus* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Aspergillus niger*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Trichoderma harzianum*.

Результаты тестирования способности к анаэробному росту штаммов разных видов, изолированных в традиционных посевах на воздухе, даны в табл. 2. Грибные колонии в анаэробных условиях на твердых средах образовывали небольшое количество воздушного мицелия, или он отсутствовал. Радиальная скорость роста грибных колоний в анаэробных условиях по сравнению с аэробными ниже, как правило, в 1.5–4.0 раза, а накопление биомассы еще меньше (в 20 раз) [6]. Микромицеты разной таксономической принадлежности существенно различались по радиальной скорости роста и размерам колоний, которые они формировали в анаэробных условиях на питательной среде.

Обнаружено, что подавляющее большинство штаммов таких видов как *F. oxysporum*, *F. solani*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* характеризовались умеренным и хорошим ростом в анаэробных условиях. Однако у штаммов других видов эта способность заметно варьировала. В ряде случаев отмечали связь этого свойства с местом их выделения. В частности, изоляты триходерм из верховых болот, илов и затопляемых почв и грунтов вдоль водоемов демонстрировали хороший рост. В отличие от них штаммы, выделенные с поверхности семян и плодовых тел макромицетов, не росли в анаэробных условиях.

Умеренный и хороший рост в анаэробных условиях наблюдали, как правило, у представителей зигомицетов (*Absidia*, *Mucor*, *Actinomucor*, *Cunningamella*, *Rhizopus*, *Zygorrhynchus*), митотических грибов аскомицетного аффинитета (*Clonostachys*, *Fusarium*, *Trichoderma*), реже у отдельных видов родов *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Acremonium* и некоторых других. В дополнении к видам, для которых эта способность была известна ранее [6, 9–12], анаэробный рост установлен у представителей *Absidia spinosa*, *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Clonostachys solani* f. *solani*, *Cunningamella echinulata*, *Fusarium avenacium*, *F. dimerum*, *F. fusarioides*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *Trichoderma asperellum*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride*. Очень слабый рост при анаэробии отмечен у штаммов *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus* sp., *Chaetomium globosum*, *Fusarium clamydosporum*, *F. sambuci-*

num, *Fusarium* spp., *Humicola fuscoatra*, *Humicola grisea*, *Mucor* sp., *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces marquandii*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium funiculosum*, *P. islandicum*, *Trichoderma citrinoviride*, рост прекращался после формирования микроколоний диаметром не более 1–3 мм, видимых только под микроскопом. Способность к анаэробному росту не обнаружена при проверке штаммов: *Alternaria alternata*, *Aphalocladium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Blakslea trispora*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Geomyces pannorum*, *Geotrichum candidum*, *Lecanicillium* sp., *Paecilomyces variotii*, *Penicillium aurantionigriseum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. canescens*, *P. citreoviride*, *P. citrinum*, *P. diversum*, *Penicillium frequentans*, *P. glabrum*, *P. implicatum*, *P. nalgiovense*, *P. restrictum*, *P. rolsii*, *P. spinulosum*, *P. thomii*, *Penicillium* spp. (6 штаммов), *Sordaria fimicola*, *Stachybotrys* sp., *Talaromyces* sp., *Tolyocladium geodes*, *T. inflatum*, *Umbelopsis ramanniana*, *Verticillium nigrescens*. Также не росли в анаэробных условиях отдельные штаммы видов *Absidia* sp., *Aspergillus terreus*, *Aspergillus* spp., *Fusarium avenacium*, *F. dimerum*, *F. moniliforme*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *Humicola fuscoatra*, *Paecilomyces marquandii*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma asperellum* (33 штамма), *T. atroviride*, *T. citrinoviride* (16 штаммов) *T. hamatum*, *T. harzianum* (17 штаммов), *T. viride* (21 штаммов), *T. koningii* (5 штаммов), *Trichoderma* spp. (14 штаммов) Тестирование представителей разных видов рода *Penicillium*, изолированных в аэробных условиях, на способность к росту при анаэробно-озисе показало, что только два штамма (*Penicillium funiculosum*, *P. islandicum*) продемонстрировали очень слабый рост (образовывали микроколонии), а все остальные представители пенициллов не росли в этих условиях.

Следует отметить, что представители рода *Penicillium*, темноокрашенных грибов (*Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Stachybotrys* sp.) и ряда других видов (*Geomyces pannorum*, *Sordaria fimicola*, *Talaromyces* sp., *Botrytis cinerea*), которые являются типичными микромицетами для наземных биогеоценозов, не выделялись и в анаэробных посевах из почв, и других природных объектов (табл. 1).

Способность к росту в анаэробных условиях определялась преимущественно таксономической принадлежностью штамма, в ряде случаев отмечена связь этого свойства со спецификой местообитания, из которого они выделены (наличием в нем длительных периодов лимитированной обеспеченности кислородом).

У 170 штаммов микроскопических мицелиальных грибов, которые продемонстрировали умеренный и хороший рост в анаэробных условиях, была исследована активность спиртового брожения. Все штаммы этих факультативно-анаэробных грибов обладали способностью к спиртовому брожению на среде с глюкозой (табл. 3).

Таблица 3. Активность брожения штаммов мицелиальных микроскопических грибов, обладающих умеренным и хорошим ростом в анаэробных условиях

Род/вид	Число штаммов	Число активных штаммов		
		C ₂ H ₅ OH на 4–6 сут, %		
		0.02–0.1	0.1–0.5	0.5–1.5
<i>Absidia spinosa</i>	1	–	–	1
<i>Absidia</i> sp.	2	–	2	–
<i>Acremonium</i> sp.	1	–	–	1
<i>Actinomucor elegans</i>	1	–	1	–
<i>Aspergillus</i> sp. гр. <i>flavus</i>	4	1	1	2
<i>Aspergillus niger</i>	4	2	2	–
<i>Aspergillus terreus</i>	2	1	–	1
<i>Aspergillus</i> sp.	1	–	1	–
<i>Clonostachys rosea</i> var. <i>rosea</i>	1	–	1	–
<i>Cunningamella elegans</i>	1	1	–	–
<i>Fusarium avenacium</i>	2	2	–	–
<i>F. clamydosporum</i>	1	1	–	–
<i>Fusarium fusarioides</i>	1	–	–	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	10	1	2	7
<i>Fusarium sambucinum</i>	2	–	1	1
<i>Fusarium solani</i>	10	1	5	4
<i>F. sporotrichioides</i>	3	1	2	–
<i>Fusarium</i> sp.	19	6	7	6
<i>Mucor circinelloides</i>	2	–	1	1
<i>Mucor hiemalis</i>	1	1	–	–
<i>Mucor</i> spp.	4	2	1	1
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	1	–	–	1
<i>Sphaerostilbella aureonitens</i>	2	1	1	–
<i>Trichoderma asperellum</i>	8	6	1	1
<i>T. aureoviride</i>	2	–	1	1
<i>T. atroviride</i>	2	–	–	2
<i>T. citrinoviride</i>	2	2	–	–
<i>T. harzianum</i>	6	2	2	2
<i>T. hamatum</i>	1	1	–	–
<i>T. koningii</i>	1	1	–	–
<i>T. viride</i>	2	2	–	–
<i>Trichoderma</i> spp.	6	2	3	1
<i>Zygorrhynchus heterogamus</i>	1	–	1	–
<i>Z. moelleri</i>	1	1	–	–
<i>Zygorrhynchus</i> sp.	3	–	1	–

Наиболее высокой активностью спиртового брожения на среде с глюкозой обладали штаммы грибов следующих таксономических групп: *Absidia spinosa*, *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium* sp., *Mucor circinelloides*, *Mucor* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. sambucinum*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma* sp. В большинстве случаев эффективность сбраживания глюкозы у культур этих грибов превышала 50%. Несколькими ниже она была у представителей *Trichoderma aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningi*, *T. viride*, *Fusarium sporotrichoides*, *Aspergillus niger*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Zygorhynchus heterogamus*. Максимальная эффективность сбраживания глюкозы штаммами этих видов составляла 25–50%, что соответствовало накоплению 0.2–0.5% этанола к 4–7 сут на средах, содержащих 1–2% глюкозы. Заметно более слабой активностью спиртового брожения обладали штаммы других видов рода *Fusarium*, *Trichoderma*, а также *Mucor hiemalis*, *Zygorhynchus moelleri* и *Cunningamella elegans*. Накопление этанола не было обнаружено или накопление не превышало 0.02% у *Clonostachys* spp. (6 штаммов), *Fusarium clamydosporum*, *F. moniliforme* (2 штамма), *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *Fusarium* sp. (3 штамма), *Humicola fuscoatra*, *H. grisea*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma asperellum*, *T. atroviride* (2 штамма), *T. citrinoviride* (3 штамма), *T. hamatum*, *T. harzianum* (2 штамма), *T. koningii* (2 штамма), *T. viride*, *Trichoderma* sp. (12 штаммов), *Zygorhynchus moelleri*, *Zygorhynchus* sp. (2 штамма).

Установлено, что образование этанола природными изолятами дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* КБП-3781 и *Hanseniaspora* sp. 1R и 2КБП на среде с 1% глюкозы составляло 3.6–5.8 мг/мл и 2.6–4.0 мг/мл соответственно. При такой активности штаммы *Hanseniaspora* sp. сбраживали до этанола 39–49% глюкозы на 4 сут и 62% глюкозы на 7 сут, у *Saccharomyces cerevisiae* эти показатели были заметно выше (59–90% — на 4 сут). Удельная активность образования этанола у диких штаммов *Hanseniaspora* sp. и *Saccharomyces cerevisiae* была равна 33–48 мг C₂H₅OH/(г сухой биомассы·ч), что в 1.5–3 раза выше, чем у бродильщиков-микромикетов. Накопление этанола на среде с глюкозой (1%) у представителей *F. oxysporum*, *F. solani*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus terreus* достигало 50–100%, а у *Trichoderma aureoviride* — 20–50% от уровня продукции спирта у штаммов *Saccharomyces cerevisiae* и *Hanseniaspora* sp. Следовательно, многие факультативно-анаэробные мицелиальные грибы обладали скоростью брожения, близкой к таковой у диких штаммов дрожжей.

У штаммов грибов, образующих 0.5–1.5% спирта (табл. 3) на средах с 4–5% глюкозы были проверена активность при более высоких концентрациях сахара (10%). Максимальный уровень накопления этанола на средах для мицелиальных микромикетов составил 2.5–4.7%, что также сравнимо с активностью природных изолятов дрожжей.

Определение гидролитической активности у микромикетов-бродильщиков показало, что ряд штаммов *Trichoderma atroviride*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *C. rosea* f. *rosea* обладали относительно высокой эндоглюканазной и ксиланазной активностью — 1.0–4.0 ед./мл культуральной жидкости. То есть штаммы с активностью спиртового брожения, сопоставимой с таковой у мукоровых грибов — сахаролитиков, были обнаружены и среди видов с широким спектром гидролитических ферментов — *A. terreus*, *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *F. oxysporum*, *F. solani*.

Наблюдается определенная связь между местом выделения грибов и их способностью сбраживать глюкозу до этанола. Так, например, изоляты *Aspergillus*, выделенные из погребенных почв и культурных слоев характеризовались высокой активностью брожения, в то время как для других штаммов этого рода характерна более низкая активность.

Для сравнения с хорошо растущими в анаэробных условиях грибами способность к спиртовому брожению оценили у 20 штаммов микромикетов, не продемонстрировавших роста при анаэробнозисе или имевших очень слабый рост (*Humicola grisea*, *Tolypocladium inflatum*, *T. geodes*, *Umbelopsis issabelina*, *Lecanicillium* sp., *Penicillium brevicompactum*, *P. citreoviride*, *P. frequentans*, *Penicillium spinulosum*, *P. thomii*, *Penicillium* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *P. varioti*, *Paecilomyces* sp., *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Geomyces pannorum*) (табл. 2, 3). Активность спиртового брожения у этих грибов была низкой или отсутствовала.

Таким образом, среди микромикетов, как и дрожжей [21, 22], можно выделить таксоны, характеризующиеся разной интенсивностью роста в анаэробных условиях и активностью спиртового брожения: виды сильных, умеренных, слабых бродильщиков и не обладающих этой способностью. Относительно высокой активностью спиртового брожения среди микроскопических грибов обладали не только представители мукоровых, но и видов, способных осуществлять гидролиз полимерных углеводных соединений. Выявлено несколько перспективных штаммов, проявляющих высокие активности спиртового брожения и гидролиза целлюлозы, что важно для создания новых биотехнологий переработки растительных субстратов. Вместе с тем, необходимо продолжение поисков среди изолятов микромикетов более активных штаммов и дальнейшего изучения способности представителей разных систематических групп мицелиальных грибов к спиртовому брожению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М., МГУ, 1989.

2. Майоров А.Ю., Курамшин Р.А., Еникеев Ш.Г. // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2002. № 2. С. 22–25.
3. Жульков А.Ю., Витол И.С., Карпиленко Г.П. // Вестник МИТХТ. 2009. Т. 4. № 5. С. 12–15.
4. Добровольская Т.Г., Полянская Л.М., Головченко А.В., Смагина М.В., Звягинцев Д.Г. // Почвоведение. 1991. № 7. С. 69–77.
5. Полянская Л.М., Милановский Е.Ю., Звягинцев Д.Г. // Почвоведение. 2004. № 9. С. 1109–1113.
6. Кураков А.В., Лаврентьев Р.Б., Нечитайло Т.Ю., Голышин П.Н., Звягинцев Д.Г. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 1. С. 103–112.
7. Pushalkar S., Rao K.K. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. P. 289–291.
8. Tabak H.H., Cooke W.B. // Mycologia. 1968. V. 69. № 1. P. 115–140.
9. Curtis P.J. // Trans. Br. Mycol. Soc. 1969. V. 53. P. 299–302.
10. Marchant R., Nigam P., Banat I.M. // Mycol. Res. 1994. V. 98. № 7. P. 757–760.
11. Wainwright M., Ali T.A., Killham K. // Mycol. Res. 1994. V. 98. № 7. P. 761–762.
12. Van Horn K., Warren K., Baccaglini E. // Evaluation of a New Anaerobic Atmosphere Generation System. Abstracts. Washington: Amer. Soc. Microbiology, 1996. P. 41.
13. Van Horn K.C., Warren K., Baccaglini E.J. // J. Clin. Microbiol. 1997. V. 35. № 8. P. 2170–2173.
14. Schipper M.A.A. // Studies in Mycol. 1973. № 4. P. 1–40.
15. Booth C. *Fusarium*. Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. Kew-Surrey: Commonwealth Mycolog. Inst., 1977. 58 p.
16. Nelson P.E., Tousson T.A., Marasas W.F.O. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania: State University Press, 1983. 193 p.
17. Samuels G.J. // Mycol. Res. 1996. V. 100. P. 923–935.
18. Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Kubicek C.P. // Mycoscience. 2006. V. 47. P. 55–64.
19. Методы экспериментальной микологии / Ред. Билай В.И. Киев: Наукова Думка, 1982. 550 с.
20. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. // Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: Изд-во МГУ, 1995. 222 с.
21. The Yeasts a Taxonomic Study / Ed. Lodder J. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1970. 1385 p.
22. The Yeasts, a Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell S.W. Amsterdam: Elsevier Sci., 1998. 1055 p.

Anaerobic Growth Ability and Alcohol Fermentation Activity of Microscopic Fungi

A. V. Kurakov^a, K. S. Khidirov^b, V. S. Sadykova^c, and D. G. Zvyagintsev^b

^a International Biotechnological Center, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: kurakov57@mail.ru

^b Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^c Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

Received April 12, 2010

Abstract—The method proposed in this study was used to isolate fungi grown under anaerobic conditions and to reveal distinctions in their abundance and species composition in different habitats. The ability of micromycetes of different taxa to grow under anaerobic conditions and ensure alcohol fermentation was determined for a representative sample (344 strains belonging to more than 60 species). The group of fungi growing under anaerobic conditions included species with high, moderate, and low fermentation activity. The ability for anaerobic growth and fermentation depended on the taxonomic affiliation of fungi. In some cases, the expression of these characteristics depended on the habitat from which the strain was isolated. The maximum level of ethanol accumulation in culture liquid (1.2–4.7%) was detected for *Absidia spinosa*, *Aspergillus* sp. of group *flavus*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium* sp., *Mucor circinelloides*, *Mucor* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. sambucinum*, *Rhizopus arrhizus* var. *Arrhizus*, *Trichoderma atroviride*, and *Trichoderma* sp.