

В. Г. Червецова¹, Н. Л. Заярнюк¹, О. В. Швед^{1,2}, В. І. Буцяк², В. П. Новіков¹

¹Національний університет “Львівська політехніка”,

кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

² Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнології,
кафедра біотехнології та радіології

ОТРИМАННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НАГРОМАДЖУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ КОМПОСТУВАННЯ

© Червецова В. Г., Заярнюк Н. Л., Швед О. В., Буцяк В. І., Новіков В. П., 2018

Опрацьовано способи виділення та умови культивування культур аеробних целюлолітичних бактерій та грибів з високою целюлазною активністю з метою подальшого одержання ферментних препаратів на їх основі. Як джерело нагромаджувальних культур целюлолітичних мікроорганізмів використовували природні субстрати. Визначено морфологічні ознаки та фізіологічні особливості біомаси виділених мікроорганізмів для підсилення компостування твердих відходів та утилізації опалого листя.

Ключові слова: целюлолітичні мікроорганізми, нагромаджувальні культури, компостування.

V. H. Chervetsova¹, N. L. Zaiarniuk, O. V. Shved^{1,2}, V. I. Butsyak², V. P. Novikov¹

RECEIVING AND OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS OF ENRICHED CULTURES OF CELLULOTIC MICROORGANISMS FOR COMPOSTING

© Chervetsova V. H., Zajarnuk N. L., Shved O. V., Butsyak V. I., Novikov V. P., 2018

Methods of isolation and cultivation conditions of aerobic cellulolytic bacteria and fungi cultures with high cellulase activity have been worked for the purpose of further preparation of enzyme preparations on their basis. As a source of enriched cultures of cellulolytic microorganisms, natural substrates were used. The morphological features and physiological characteristics of isolated microorganisms biomass for increasing composting of solid waste and utilization of fallen leaves have been determined.

Key words: cellulose-digesting microorganisms, enriched culture, compostin.

Постановка проблеми. Проблема утилізації твердих целюлозних відходів сільського господарства (солома, кукурудзяні качани, соняшникове лушпиння тощо), деревообробної та целюлозно-паперової промисловості (гілки, тирса, кора дерев, сульфітні лужні золи), комунальних відходів, що на 40–50 % складаються з рослинної біомаси, особливо опалого листя, забрудненого газовими техногенними викидами, набула критичного значення в урбаністичному та аграрному секторі господарювання. Щороку в Україні утворюється 11–13 млн тонн твердих побутових відходів (ТПВ) [1]. Закон України “Про відходи” та “Програма поводження з ТПВ” спрямовані на розвиток технологій переробки, оскільки Закон забороняє викидати неперероблені відходи на полігони, починаючи з 1 січня 2018 року, а також спалювати тверді побутові відходи, опале листя, стерню, залишки сухої рослинності.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Переробка твердих целюлозних відходів здійснюється складуванням на сміттєвих полігонах, спалюванням чи біоконверсією, компосту-

ванням та перетворенням субстратів у процесі ферментації з одержанням технологічно важливих продуктів [2]. Утилізувати листя пропонується компостуванням чи вермикультивуванням з отриманням біогумусу [3, 4]. Проте ці відходи, зокрема опале листя, відрізняються за хімічним складом і, відповідно, за швидкістю процесу їхнього розкладу (мінералізації). Для прискорення мінералізації можна також використати ферментоліз целюлолітичними ферментами цих субстратів. Тому, окрім вермикультивування, біоконверсія та використання біомаси целюлолітичних організмів як “мішка з ферментами” можуть стати перспективним методом переробки целюлозних відходів. Зокрема, ферментні системи базидоміцетів трансформують або повністю деструктують природний біотоповий субстрат залежно від здатності до біосинтезу целюлолітичних ферментів [10].

Метою дослідження було розроблення умов культивування нагромаджувальних бактеріальних та грибних культур целюлолітичних продуцентів різного ступеня природної деградації.

Матеріали і методи дослідження. Як ймовірні джерела целюлолітиків відібрано багаті на залишки целюлози природні субстрати, а саме: ґрунти різного походження та деревина – тирса, гнилизна, яка відрізнялась за ступенем природної деградації і містила целюлозу і лігнін; суха трава – багаса – волокнисті залишки цукрової тростини або стебел сорго, агави, які подрібнюють для отримання соку, а також вторинне рослинне целюлозне волокно (*макулатура*), що піддається кислотному гідролізу. Відсотковий склад компонентів у субстратах дуже різний і становить (%): 15–70 целюлози, 10–85 геміцелюлози, 0–70 лігніну (рис. 1).

					
	<i>Листя, %</i>	<i>Багаса, %</i>	<i>Дерево листяне, %</i>	<i>Тирса хвойна, %</i>	<i>Макулатура, %</i>
целюлоза	15–20	30–35	40–55,	45–50	40–70
геміцелюлоза	80–85	20–22	24–40	25–35	10–40
лігнін	0	18–20	18–25	25–35	5–30

Рис. 1. Відсотковий склад компонентів у субстратах

Нагромаджувальні культури (НК) аеробних целюлолітичних мікроорганізмів (бактеріальних та грибних) культивували на твердому та рідкому середовищі Хатчинсона–Клейтона для отримання колоній целюлолітиків, які розкладають базовий субстрат [6]. Як базовий субстрат джерела карбону використовували стерильні диски з фільтрувального паперу діаметром 9 см, на які накладали грудочки природного субстратного матеріалу в кількості 1г.

Середовище стерилізували в автоклаві при 0,5 атм протягом 30–40 хвилин.

Для одержання нагромаджувальних культур аеробних целюлолітичних мікроорганізмів застосовували модифіковані ємності з широкими горлом на 250 мл (класичні ватні корки замінено за європейською мікробіологічною практикою кришками з фольги), куди вносили по 45 мл середовища Хатчинсона–Клейтона і культивували за температури 28 °С протягом 14 діб. Через зазначений час колонії, навколо яких спостерігалось найбільше руйнування паперового фільтра, відокремлювали і ресуспендували в стерильній водопровідній воді (рис. 2).

За необхідності посіву культури на тверде середовище в рідке середовище Хатчинсона–Клейтона додавали 2 % агар-агару, і охолоджене агаризоване поживне середовище розливали в чашки Петрі по 20 мл в кожну, наносили 0,1 мл суспензію з культурами, після чого накривали стерильним диском фільтрувального паперу та культивували за температури 28 °С протягом 14 діб, і вже через 7 діб уже відзначали зони просвітлювання фільтрувального паперу (рис. 3).



Рис. 2. Нагромаджувальні культури целюлолітичних мікроорганізмів на рідкому поживному середовищі



Рис. 3. Нагромаджувальні культури целюлолітичних мікроорганізмів на твердому поживному середовищі

Виділення аеробних бактерій, які розкладають целюлозу, проводили на відповідних елективних середовищах.

Для дослідження здатності засвоювати карбоновмісні субстрати в стерильні пробірки вносили різні джерела карбону (контроль – фільтрувальний папір “Фільтрак”) та середовище Хатчинсона–Клейтона у співвідношенні 1:1, після чого засівали суспензією вибраного штаму в кількості 0,1 мл (рис. 4).

НК з кори старого дерева	НК з пожовклої гнилої трави	НК зі старого опалого листа	НК з оціпок деревини	Загальний вигляд виділення культур бактерій на твердому середовищі

Рис. 4. Розрідження субстрату зразком нагромаджувальної культури

Вивчення морфологічних ознак (форми та розміри клітин) та фотографування фіксованих фарбованих препаратів досліджуваних бактерій та живих препаратів досліджуваних міцеліальних грибів здійснювали із застосуванням світлопольного тринокулярного мікроскопа MBL2100 (“Kruss”, Німеччина – збільшення 15х40) з подальшою комп’ютерною обробкою фотографій (рис. 5).

НК1: волокна целюлози, міцелій, товсті волокна, довгі ниткоподібні структури	НК2: волокна міцелію, волокна, наявність конідій, волокна целюлози	НК3: волокна міцелію, наявність конідій, дріжджі, волокна целюлози, довгі ниткоподібні структури	НК4: цвілі, міцелій, наявність конідій, дріжджі, довгі ниткоподібні структури, волокна, що частково переплітаються та розділяються

Рис. 5. Результати мікроскопування нагромаджувальних культур аеробних целюлолітичних організмів: Препарат “роздавлена крапля”

Результати та обговорення. Проведене маркетингове дослідження показало, що асортимент целюлолітичних мікроорганізмів та їх ферментів є обмеженим; більшість наявних у продажу целюлолітичних ферментів мають на меті відновлення ґрунтів після сільгоспобробки та одержання біологічного добрива, деякі з них можуть бути використані для целюлозного ферментолізу отримання біоетанолу, зокрема, препарат “ЕКО стерн”, Фермент “ДЦ”, препарат “Деструктол стерні”, “Целюлад”-ТзОВ “Агроцентр-Галичина”, однак купити такий препарат навіть у невеликій кількості у роздрібній торгівлі складно.

Власне пошук продуцентів та виділення нагромаджувальних культур аеробних целюлолітичних бактерій та грибів з високою целюлозною активністю із зразків субстратів природного походження та одержання ферментних препаратів на їх основі є актуальним завданням для підсилення компостування та біоутилізації [5].

Целюлозолітичний комплекс продуцентів визначається природою субстрату та фізіологічними властивостями мікроорганізмів. Ферментоліз субстрату опалого листя целюлолітиками важко здійснювати через неоднорідність хімічного складу за різних умов гідролізу. Відомо, що погано піддаються мінералізації листки рослин таких родин: листки груші *Pyrus communis* L (Rosaceae) родина Розові; листки вільхи клейкої *Alnus glutinosa* (Betulaceae) родина Березові; листки вільхи сірої *Alnus incana* (Betulaceae) родина Березові. Вкрай важко піддаються мінералізації листки дуба звичайного (*Quercus robur* (Fagaceae) родина Букові; листки горіха волоського *Juglans regia* (Juglandaceae) родина Горіхові. На противагу їм легко піддаються мінералізації листки рослин з родини Липові, зокрема листки липи серцелистої (*Tilia cordata*), листки підродино Яблуневі, зокрема яблуні домашньої (*Malus domestica*); родини Гіркокаштанові, зокрема листки гіркокаштану звичайного (*Aesculus hippocastanum*), родини Березові, зокрема берези бородавчастої (*Betula verrucosa*), ліщини звичайної (*Corylus avellana*).

Гриби відіграють важливу роль у кругообігу речовин у природі. Руйнування целюлозовмісних субстратів (рослинні залишки, коріння, опале листя), розклад целюлози в сіроземах здійснюються переважно грибною флорою [1] і займають важливе місце в процесі кругообігу речовин у природі і в створенні родючості ґрунту. Разом з цим встановлено, що різні види целюлолітичних грибів володіють не однаковою здатністю до гідролізу природних целюлозовмісних рослинних субстратів. При цьому зазначено відмінності не лише в активності і властивостях целюлаз, але й в характері росту, ступені дезагрегації субстрату, можливості використання продуктів гідролізу клітковини. Серед найактивніших грибів виділяють представників родів *Chaetomium*, *Stachybotrys*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Cladosporium*.

Хоча бактерії є менш ефективними продуцентами целюлаз, ніж гриби, ареал їх існування значно ширший. Серед бактерій зустрічаються екстремальні галофіли (стійкі до високих концентрацій солей), ацидофіли та алкалофіли (ростуть при рН відповідно, 2 або вище 10), термофіли (функціонують за температури 100 °С у гарячих джерелах). Тому целюлази цих мікроорганізмів можуть виявитись особливо стабільними в екстремальних умовах, які полегшують гідроліз целюлози, з одного боку, і утруднюють ріст сторонньої мікрофлори – з іншого. Провідна роль у розщепленні целюлози належить міксобактеріям. Міксобактерії, що руйнують клітковину, належать до родів *Cytophaga*, *Sporocytophaga* та *Sorangium*. Вони живуть у слабкокислих, нейтральних та слаболужних ґрунтах.

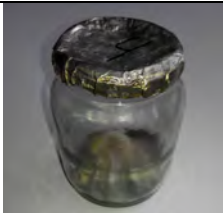

			
старого опалого листя, яке почало розкладатися	окремих частинок деревини	кори старої деревини	старої пожовклої кори, яка почала гнити

Рис. 6. Біомаса нагромаджувальних культур на зразках природних субстратів

Отримані нами нагромаджувальні культури – це початковий етап отримання чистої культури (ЧК) мікроорганізму із природних субстратів зі зразків біомаси НК на рідкому середовищі (рис. 6).

У всіх зразках спостерігається руйнування паперових фільтрів, що свідчить про наявність целюлолітичних мікроорганізмів. Спостерігались колонії різного кольору та форми. З місць найбільшого руйнування було відібрано зразки мікроорганізмів, які мікроскопували та відокремлювали в окреме середовище для подальшого культивування.

Результати спостережень із використання різних природних взірців для одержання нагромаджувальних культур целюлолітичних мікроорганізмів через 7–14 діб експерименту подано в табл. 1.

Таблиця 1

Органолептичні характеристики одержаних нагромаджувальних культур аеробних целюлолітичних мікроорганізмів

Досліджувані взірці целюлозовмісного субстрату	На рідкому середовищі (ємність на 250 мл)	На твердому середовищі (чашка Петрі)
1. Грунт з вазонка (м. Львів, домашнє)	– колонії, пігментовані в зелений та сірий кольори; – на фільтрувальному папері пігменти жовтого кольору;	– зони прорідження фільтрувального паперу; – виділили колонії, забарвлені в рожевий (штам 1б) та жовтий (штам 1в) кольори
2. Грунт “Флора”	– колонії, пігментовані в чорний, сірий та зелений кольори; – розчин - мутний жовтий	– зони прорідження фільтрувального паперу; – виділили колонії, забарвлені в жовтий колір (штам 2в)
3. Грунт (с. Оброшино)	– колонії, забарвлені в сіро-зелений та жовтий колір; – розчин прозорий.	– зони прорідженого фільтрувального паперу навколо грудочок ґрунту; – колонії яскраво-жовтого, оранжевого, чорного та ледь рожевого кольорів; – виділили штам 3в із прорідженого фільтрувального паперу
4. Грунт (м. Рава-Руська)	– колонії, пігментовані в жовтий та зелений кольори; – розчин мутний; – виділили штам 4б із суспензії	– зони прорідження фільтрувального паперу; – колонії, пігментовані в жовтий та рожевий кольори
5. Зігниле дерево1 (м. Львів, Цитадель)	– колонії, пігментовані в сірий, зелений та білий кольори; – розчин мутний, жовтого кольору;	– зони прорідження фільтрувального паперу; – колонії, пігментовані в жовтий колір – виділили штам 5в
6. Зігниле дерево2 (м. Львів, Цитадель)	– колонії, пігментовані в жовтий та сіро-зелений колір; – розчин прозорий; – виділили штам 6б ;	– зони прорідження фільтрувального паперу; – колонії, пігментовані в жовтий колір.
7. Грунт з-під однолітніх рослин (м. Львів, Цитадель)	– колонії жовтого кольору на складках конуса; – розчин прозорий; – виділили штам 7а	– зони прорідження фільтрувального паперу, – колонії пігментовані в жовтий та червоний колір.
8. Солома (Турківський район)	– колонії забарвлені в жовтий, рожевий та зелений кольори. – розчин прозорий, – виділили штам 8а	– зони прорідження фільтрувального паперу; – досліджуваний матеріал обріс цвіллю білого і чорного кольорів

У результаті культивування біомаси виділено 9 штамів бактерій та 8 штамів грибів, які здатні ферментативно розкласти целюлозу. З них для подальших експериментів відібрано 2 штами бактерій (2в та 4б) (рис. 3) та 2 штами грибів (2а та 8д) (рис. 4), які дослідили на здатність

утилізувати різні джерела карбонового живлення, а саме: КМЦ (карбоксиметилцелюлоза), опале листя, тирса, стружка, подрібнений фільтрувальний папір, вата, сіно.

Аналіз результатів розкладу накопичувальними культурами (НК) целюлозовмісних субстратних середовищ (ЦСС) показав, що найлегшим для біотрансформації джерелом карбону для виділених штамів бактерій та грибів виявилась КМЦ. Розрідження цього субстрату спостерігалось вже через 24–48 годин після засівання культур. Результати дослідження здатності відібраних штамів утилізувати целюлозу на різних джерелах карбону подано в табл. 2.

Таблиця 2

Органолептичні характеристики утилізуючої здатності відібраних штамів целюлолітиків

НК/ЦСС/ час, доба		Стан целюлозовмісного субстратного середовища після ферментолізу					
		КМЦ	тирса	стружка	солома	папір	вата
2в	4	– повне розрідження	– без змін	– без змін	– без змін	– без змін	– поверхня жовта
	6	– повне розрідження – поява біомаси	– утворення сірого нальоту	– без змін	– мутний розчин	– без змін	– поверхня жовта
	15	– повне розрідження – багато біомаси	– початок розкладу целюлози	– піноутворення	– мутний розчин	– окремі жовті тільця	– поверхня жовта
4б	4	– повне розрідження	– без змін	– без змін	– бродіння, – мутний розчин	– без змін	– без змін
	6	– повне розрідження – поява біомаси	– зелені колонії	– без змін	– бродіння, – мутний розчин	– без змін	– без змін
	15	– повне розрідження – багато біомаси	– зелені колонії	– без змін	– бродіння, – мутний розчин	– без змін	– біомаса
2а	4	– неповне розрідження – поява міцелію	– без змін	– без змін	– бродіння, – мутність	– без змін	– поверхня жовта
	6	– неповне розрідження – міцелій	– потемніння	– без змін	– бродіння – мутність	– без змін	– поверхня жовта
	15	– повне розрідження – міцелій	– потемніння	– без змін	– бродіння – мутність	– без змін	– поверхня жовта
8д	4	– часткове розрідження – міцелій	без змін	– без змін	– без змін	– без змін	– без змін
	6	– активне розрідження – міцелій	– без змін	– без змін	– без змін	– без змін	– без змін
	15	– повне розрідження – міцелій	– сіро-зелені колонії	– піноутворення	– без змін	– зелені колонії	– зелене тільце

Виходячи з результатів дослідів та враховуючи літературні дані про застосування КМЦ та Na-КМЦ для визначення активності целюлоз, нами проведено подальший скринінг активних целюлолітичних бактерій (рис. 7) та грибів (рис. 8) саме на цьому субстраті.



Рис. 7. Культивування штаму бактерій **2в** на різних карбоновмісних субстратах



Рис. 8. Культивування штаму грибів **8д** на різних карбоновмісних субстратах

Для попередньої ідентифікації виділених культур целюлолітичних бактерій та виявлення їх найхарактерніших морфологічних ознак проводили виготовлення мікроскопічних препаратів.

З колоній, які, на нашу думку, мали бактеріальне походження, виготовляли фіксовані препарати за загальноприйнятою методикою із застосуванням фуксину основного як барвника. Виявилось, що відібрані штами бактерій мали форму коротких паличок, довгих паличок, іноді зібраних у ланцюжки, та містили сферичні структури, які профарбовувались гірше, ніж вегетативні клітини (рис. 9, 10).

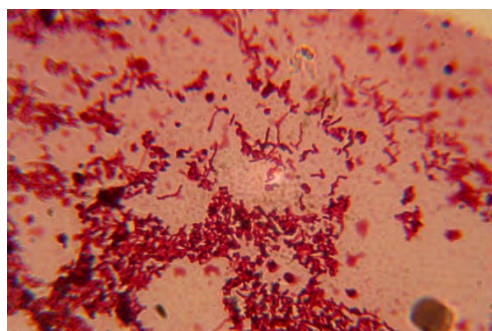


Рис. 9. Фіксований забарвлений препарат штаму **2в**

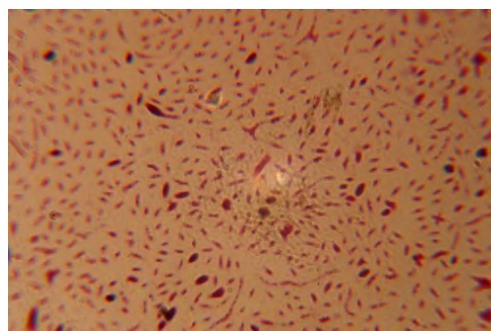


Рис. 10. Фіксований забарвлений препарат штаму **4б**

Для попередньої ідентифікації виділених культур целюлолітичних грибів та виявлення їх найхарактерніших морфологічних ознак виготовляли мікроскопічні препарати.

З колоній мікроміцетів, які мали візуально ідентифікований повітряний міцелій, виготовляли препарати “роздавлена крапля”, а також фіксовані фарбовані препарати відповідно до загальноприйнятих методик. Спостерігали наявність конідій, довгих ниткоподібних структур, а також товстих волокон, що часто переплітаються та розділяються. Виявили, що культура не була однорідною (рис. 11, 12).

Виділені культури целюлолітичних бактерій представлені неоднорідними за морфологічними ознаками формами. Дослідження накопичувальних культур для утилізації целюлолітичних відходів та збагачування мікроелементами компостів та для здійснення селекції штамів бактерій та грибів продовжуються. Окрім того, враховуючи, що ферментативний гідроліз є перспективним методом підготовки сировини до бродіння [8], є підґрунтям для створення нових видів біопалива [9], а біоконверсія лігноцелюлозних відходів є суттєвим внеском у подолання багатьох екологічних та

економічних проблем, пошук продуцентів для підготовки целюлозної структури до ферментативного гідролізу продовжується визначенням впливу на целюлазну активність отриманих накопичувальних культур активної кислотності субстратного середовища, температурного режиму активації ферментативного гідролізу целюлозних структур, співвідношення компонентів та джерел вуглецю та азоту для розроблення умов компостування твердих побутових відходів та опалого листя.

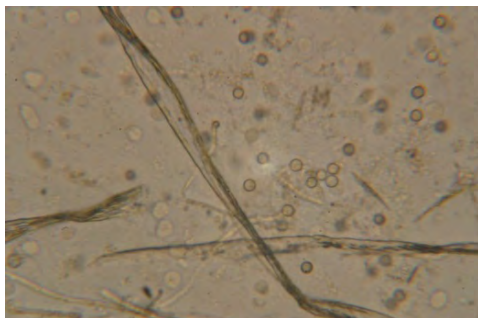


Рис. 11. Препарат “роздавлена крапля” штаму 2а

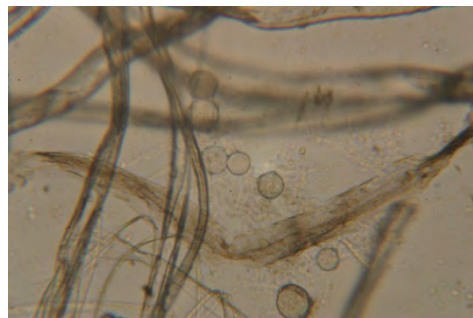


Рис. 12. Препарат “роздавлена крапля” штаму 8д

Висновки. Одержано нагромаджувальні культури аеробних целюлолітичних мікроорганізмів гідролізом целюлози в карбоновмісних субстратах природного походження, а саме ґрунтів різного походження, опалого листя та деревини, яка відрізнялась за ступенем природної деградації. Виділено окремі штами целюлолітичних бактерій та грибів та оптимізовано умови їх культивування.

1. Тверді побутові відходи в Україні: потенціал розвитку сценарії розвитку галузі поводження з твердими побутовими відходами. – Підсумковий звіт Міжнародної фінансової корпорації (ІФС, Група Світового банку) – 2018. 2. Гапоненко Г. М., Хоменко І. О. / Проблеми утилізації сміття в Україні // Збірник тез Міжнародної наук.-практ. конф. студентів, аспірантів і молодих вчених “Юність науки – 2017: соціально-економічні та гуманітарні аспекти розвитку суспільства” (м. Чернігів, 26–27 квітня 2017 р.): ЧНТУ. – Чернігів: Черніг. нац. технол. ун-т, 2017. – С. 17–18. 3. Скин О. С., Швед О. В., Буцяк В. И. Перспективы альтернативности субстратов опавших листьев в вермикультуровании // *Technological aspect of modern agricultural production and environmental protection/proceedings XIII International scientific-applied conference. daRostim.* – Алмату Казак. ун-т, 2017. – С. 102–103. 4. Manczarski P. Kompostowanie odpadów komunalnych // *Referat na Forum Technologii Ochrony Środowiska . POLEKO.* – 2007, UP – 1–16 s. 5. Пащенко І., Палюх Г., Червецова В., Заярнюк Н., Швед О., Новіков В. Оптимізація умов культивування нагромаджувальної культури целюлолітичних мікроорганізмів // *Матеріали Міжнародн. наук.-практ. інтернет-конференції “Біотехнологія : досвід, традиції та інновації, присвячена 50-ти річчю започаткування біотехнологічної освіти в Україні (14–15 грудня 2016).* – К.: НУХТ, 2016. – С. 350–356. 6. Билай В. И., Билай Т. И., Мусич Е. Г. Трансформация целлюлозы грибами. – К.: Наук. думка, 1982. – 296 с. 7. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. – М.: Колос, 1983. – 295 с. 8. Скомаровский А. А., Марков А. В., Гусаков А. В. и др. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы // *Прикл. биохим. мик робиол.* – 2006. – Т. 42, № 6. – С. 674–680. 9. Даниляк Н. И., Семичевский В. Д., Дудченко Л. Г., Трутнева И. А. Ферментные системы высших базидомицетов. – К.: Наука, 1989. – 280 с. 10. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целлюлозолитических ферментов // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология* – 1993. – Т. 25. – 152 с. 11. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: учеб. пособие. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с. 12. Патица В. П., Копилов Є. П., Скуловато О. В. Целюлозолітична активність ґрунтового гриба *Chaetomium globusum* // *Вісник Уманського національного університету садівництва. “Мікробіологія”.* – 2016. – № 1. – С. 27–30.