

Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

**Активность брожения и образования закиси азота грибами
из морских донных грунтов**

Выполнила:

Студентка 4-го курса

Фролова Марина Александровна

Научный руководитель:

Кураков Александр Васильевич, д.б.н. проф.

Среди организмов, способных функционировать при лимитированном обеспечении кислородом в различных экотопах рассматривают, как правило, бактерии и археи. Однако существуют и виды грибов активные в анаэробных и микроаэробных условиях. В последние годы существенно расширен спектр известных видов факультативно-анаэробных грибов, их распространение в почвах .

Грибы получают энергию за счет спиртового, реже молочнокислого и смешанного, брожения и диссимиляторного восстановления нитратов и нитритов (Shoun, 1992, 2006; Trinci et al., 1994; Griffins, 1995; Kobayashi et al, 1995; Kurakov et al., 1997,2000, 2011; Uchimura et al, 2002).

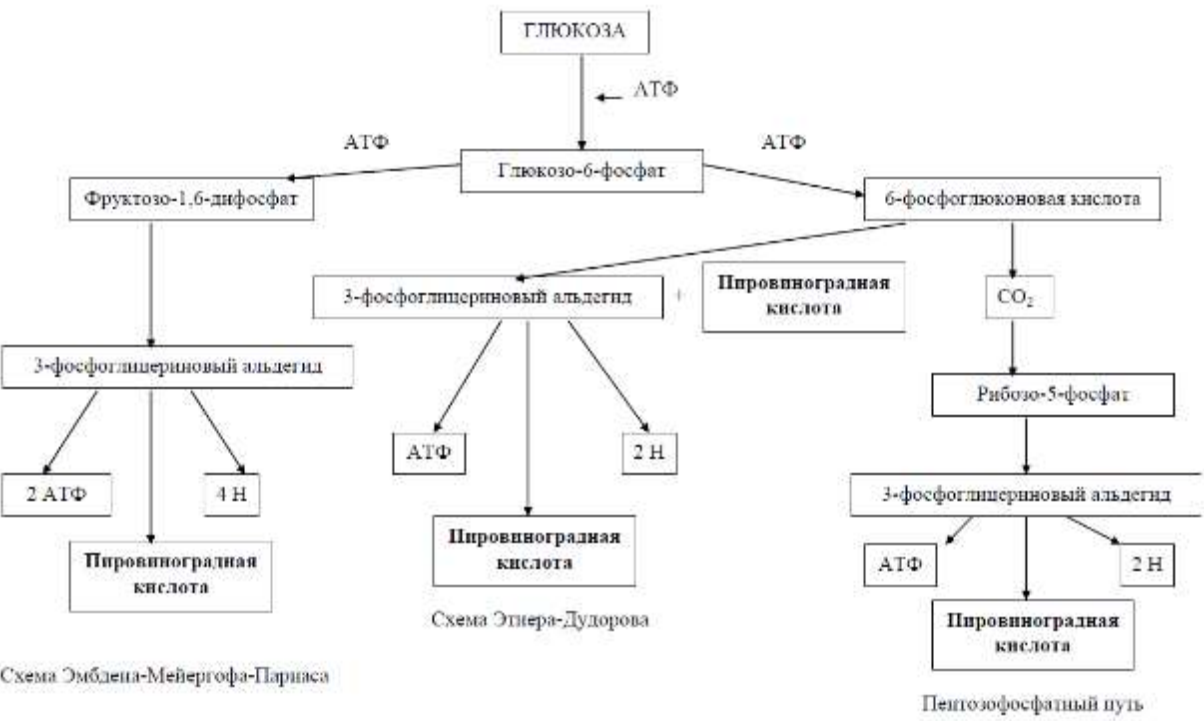
При диссимиляторном восстановлении нитратов и нитритов выделяется закись азота (N_2O), парниковый газ, разрушающей озоновый экран планеты.

Показано, что в значительной мере грибы ответственны за образование закиси азота в почвах: кислых лесных и ряде других. (Кураков и др., 1998; Кураков, 2001; Castaldi, Smith, 1998; Laughlin, Stevens, 2002; McLain, Martens, 2006; Spokas et al., 2006; Kurakov, 2005; Blagodatskiy et al., 2008; Crenshaw et al., 2008).

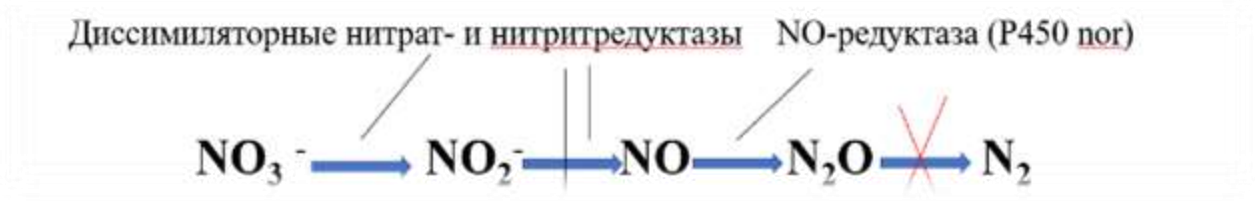
В морских экосистемах обнаружено довольно большое разнообразие грибов (Артемчук, 1981; Пивкин и др., 2006; Бубнова, 2009; Хуснуллина и др., 2018; Damare et al., 2006; Zuccaro et al., 2008; Arfi et al., 2012; Gnavi et al., 2017; Raghukumar, 2017). Для некоторых из них показана способность к росту в анаэробных условиях (Хуснуллина и др., 2018).

Поэтому актуально, изучение механизмов получения энергии морскими представителями этих видов грибов в анаэробных условиях и определение активности этих процессов, выяснение может ли образование грибами закиси азота в морских экосистемах представлять один из источников его поступления в атмосферу .

Брожение



Анаэробное восстановление нитратов и нитритов с образованием закиси азота



Shoun et al., 1992, 2006, Tanimoto et al., 1992, Kobayashi et al., 1995, Kurakov et al., 1997, 2000, Takasaki et al., 2004

Схема превращения глюкозы в пировиноградную кислоту (Еремина, 1997)

Цель работы:

Целью работы было изучение способности к брожению и образованию закиси азота у штаммов микроскопических мицелиальных грибов, выделенных из морских экотопов.

В задачи исследования входило:

- 1) Оценка способности грибов морских донных грунтов к восстановлению нитратов.
- 2) Проверка способности штаммов разных видов к образованию этанола в анаэробных условиях.

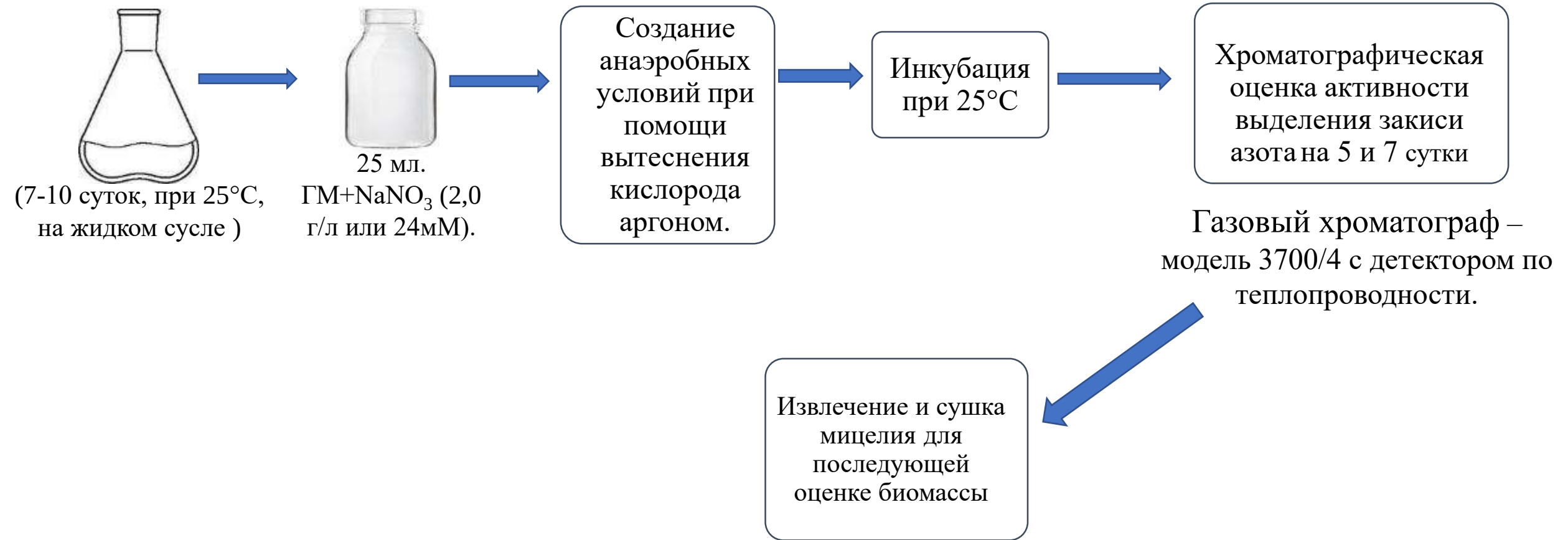
Объекты исследования

18 штаммов 14 видов микромицетов выделенных из донных отложений Белого моря (работа аспирантки А. Хуснуллиной), из коллекции экстремофильных грибов кафедры альгологии и микологии. е отобранные штаммы, характерны для донных грунтов, факультативные анаэробы - росли в аэробных и анаэробных условиях.

<i>Отдел Ascomycota</i>	<i>Пор. Hypocreales</i>	1) <i>Emericellopsis sphaerospora</i> Udagawa & Furuya	49 аН-20м-1кап-2
		2) <i>Fusarium culmorum</i> (Wm. G. Sm.) Sacc. (1892)	44 аН-20-3-САМС-5 ⁰ С
		3) <i>Tolypocladium cylindrosporum</i> W. Gams	• 53 аН-20м-1к • 60 аН-10м-2кап-1
		4) <i>Tolypocladium inflatum</i> W. Gams (4 штамма)	• 62 аН-10м-2кап-2 • 65 аН-20м-4к • 38 аН-20м-2кап-1 • 59 аН-пом-2кап-2
		5) <i>Tolypocladium tundrense</i> Bissett	66 аН-20м-4к
		6) <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	*аН-лтр-2а-рк39
		7) <i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai	41 аН-20м-2кап-1
		8) <i>Lecanicillium muscarium</i> (Petch) Zare & W. Gams	43 аН-20м-1кап-1
	<i>Пор. Eurotiales</i>	1) <i>Penicillium montanense</i> M. Chr. & Backus	• 37 аН-20м-2кап-1 • 50.1 аН-20м-1кап-2
		2) <i>Penicillium spinulosum</i> Thom;	50.2 аН-20м-1кап-2
		3) <i>Penicillium solitum</i> Westling	73 аН-пом-1к
		4) <i>Talaromyces variabilis</i> (Sopp) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert	105 аН-лит-0,5мл-1-5 ⁰ С
<i>Отдел Mucoromycota</i>	<i>пор. Umbelopsidales</i>	<i>Umbelopsis vinacea</i> (Dixon-Stew.) Arx	*44 аН-20м-1кап-1

Методы исследования

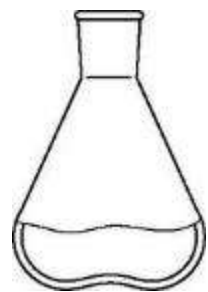
1) Изучение образования закиси азота



- Значения биомассы использовались для расчета максимального накопления N₂O мкг/г в.-с. биомассы и активности образования (нмоль N-N₂O/(час x г в.-с. биомассы))

Методы исследования

2) Оценка активности спиртового брожения



(4-7 суток, при 25°C, на жидком сусле)



(45 мл. ГМ+NaNO₃ (2,0 г/л или 24мМ).



Создание анаэробных условий при помощи вытеснения кислорода аргоном.



Инкубация при 25°C



Отфильтровка культуральной жидкости на 5 сутки.



Анализ наличия и концентрации этанола, а также побочных соединений проводилась методами:

- хромато-масс-спектрометрии.
- высокоэффективный метод (ВЭЖХ).

- Для метода ВЭЖХ, использовался детектор Waters 600-MC System Controller, рефрактометр KNAUER, колонка Phenomenex Rezex RPM-Monosaccharide Ca⁺ в качестве элюента использовали дистиллированную воду.
- Использовался хроматограф модель Focus GC фирмы Thermo scientific с масспектрометром DSQ II, колонка - Thermo TR-5MC (30м×0,25мм), газ носитель - гелий, температура колонки - 40°C.

Результаты: Образование закиси азота факультативно-анаэробными микроскопическими грибами из донных грунтов Белого моря

№	Вид	Номер штамма	Максимальное накопление N ₂ O мкг/г в.-с. биомассы	Активность образования (нмоль N- N ₂ O/(час x мл среды.)
1	<i>Tolypocladium inflatum</i> W. Gams	65 ан-20м-4к	8353,8**	49,7
2	<i>Tolypocladium inflatum</i> W. Gams	62 ан-10м-2кап-2	1229,9**	7,3
3	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> W. Gams	53 ан-20м-1к	701,5**	4,2
4	<i>Tolypocladium tundrense</i> Bissett	66 ан-20м-4к	482,1**	2,7
5	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> W. Gams	60 ан-10м-2кап-1	309,9*	2,6
6	<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai	41 ан-20м-2кап-1	392,0**	2,3
7	<i>Emericellopsis sphaerospora</i> Udagawa & Furuya	49 ан-20м-1кап-2	234,9**	1,4
8	<i>Penicillium montanense</i> M. Chr. & Backus	50.1 ан-20м-1кап-2	208,7**	1,2
9	<i>Tolypocladium inflatum</i> W. Gams	59 ан-пом-2кап-2	110,3*	0,9
10	<i>Penicillium solitum</i> Westling	73 ан-пом-1к	90,9*	0,8

№	Вид	Номер штамма	Максимальное накопление N ₂ O мкг/г в.-с. биомассы	Активность образования (нмоль N-N ₂ O/(час х г в.-с. биомассы))
11	<i>Penicillium spinulosum</i> <i>Thom</i>	50.2 ан-20м-1кап-2	61,6**	0,4
12	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Rifai</i>	*ан-лтр-2а-рк39	52,3**	0,3
13	<i>Penicillium montanense</i> M. <i>Chr. & Backus</i>	37 ан-20м-2кап-1	54,9**	0,3
14	<i>Fusarium culmorum</i> (Wm. <i>G. Sm.) Sacc. (1892)</i>	44 ан-20-3-САМС- 5°C	28,6*	0,2
15	<i>Lecanicillium muscarium</i> (Petch) Zare & W. Gams	43 ан-20м-1кап-1	10,7*	0,1
16	<i>Tolypocladium inflatum</i> W. <i>Gams</i>	38 ан-20м-2кап-1	8,7**	0,1
17	<i>Talaromyces variabilis</i> (Sopp) Samson, N. Yilmaz, <i>Frisvad & Seifert</i>	105 ан-лит-0,5мл-1- 5°C	11,1**	0,1
18	<i>Umbelopsis vinacea</i> (Dixon- <i>Stew.) Arx</i>	*44 ан-20м-1кап-1	0,0	0,0

“*” – Максимальное накопление на 5 сутки

“**” – Максимальное накопление на 7 сутки

Контроль 0,0 (нмоль N-N₂O/(час× г в.-с. биомассы))

1) Активность образования закиси азота у морских штаммов была ниже чем у самого активного известного изолята- *Fusarium oxysporum* Schltdl. (приблизительно 600 нмоль N-N₂O/(час x мл среды.)), но близка к таковой у других почвенных изолятов. (например, *Trichoderma polysporum* (Link) Rifai, *Trichoderma harzianum* (Rifai) (Кураков и др., 2008, 2011; Пахненко и др., 1998; Лаврентьев, Кураков, 2004).

2) Впервые установлено, что и такие виды грибов, как *Tolypocladium inflatum* W. Gams, *T. cylindrosporum* W. Gams, *T. tundrense* Bissett, *Emericellopsis sphaerospora* Udagawa & Furuya, *Penicillium solitum* Westling, *Penicillium montanense* M. Chr. & Backus), которые являются характерными для донных грунтов Белого моря (Хуснуллина и др., 2018), имеют довольно высокую скорость образования закиси азота.

Целесообразно проведение работ по оценке активности этого процесса непосредственно в этих экотопах морских экосистем, особенно, загрязненных соединениями азота. Следует изучить активность анаэробного восстановления нитритов до закиси азота у морских видов.

Результаты: Активность брожения микроскопических грибов донных грунтов Белого моря.

№	Штамм	Номер изолята	C ₂ H ₅ ОН*, мг/мл	Побочные продукты.
1	<i>Penicillium solitum</i> Westling	73 ан-пом-1к	0,00272	-
2	<i>Fusarium culmorum</i> (Wm. G. Sm.) Sacc. (1892)	44 ан-20-3-САМС-5°С	0,00154	изопропанол, этилацетат, уксусный альдегид, 2-метилпропанол-1

“-“ – побочные продукты небыли зафиксированы.

Из 7 штаммов способность к сбраживанию глюкозы с использованием нитратов в качестве источника азота установлена у 2-х штаммов. Концентрация образовавшегося этанола у штамма *Fusarium culmorum* (44 ан-20-3-САМС-5°С) достигала (0,2% этанола) и штамма *Penicillium solitum* (73 ан-пом-1к) (0,3% этанола). Остальные штаммы образовывали этанол в следовых количествах.

Небольшая активность брожения или её отсутствие у большинства штаммов, связано с тем, что для этого процесса оптимальным источником азота являются восстановленные соединения азота (аммоний) (Звягильская и др., 1996 и др.).

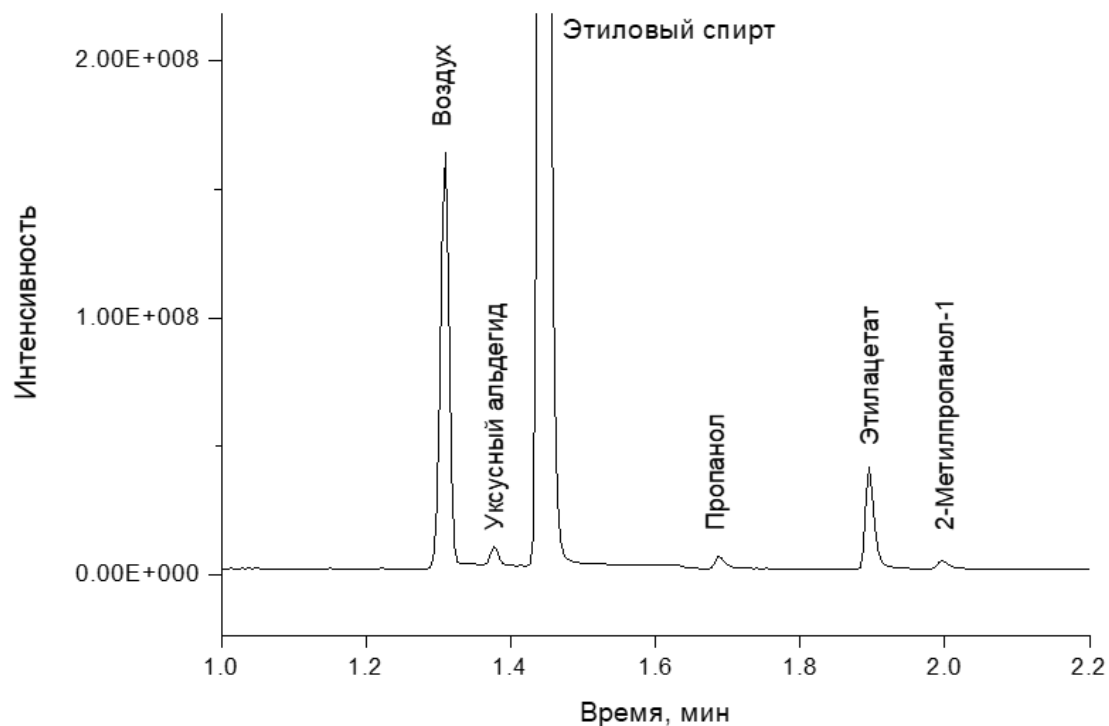


Рис. 4. Хроматограмма культуральной жидкости *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. (1892)

Состав и количество побочных соединений спиртового брожения *F. culmorum*

- 1) уксусный альдегид – 0,004%,
- 2) изопропанол – 0,003%,
- 3) этилацетат – 0,149%,
- 4) 2-метилпропанол-1 – 0,002%.

Бутонол и изобутанол - более низкие, следовые количества

Среди побочных соединений при спиртовом брожении на глюкозе фузариев и других почвенных микромицетов также было отмечено наличие ацетата, ацетатальдегида и другие спирты, альдегиды и эфиры (Лаврентьев, 2006.)

Выводы:

- 1) Микроскопические грибы - представители рода *Tolypocladium*, характерные для морских донных грунтов, способны с довольно высокой активностью к анаэробному восстановлению нитратов с образованием закиси азота. Выделение закиси азота в этих условиях продемонстрировали также морские штаммы видов *Trichoderma polysporum*, *T. harzianum*, *Emericellopsis sphaerospora*, *Penicillium solitum* Westling, *Penicillium montanense*, остальные 11 из 18 штаммов видов - *Umbelopsis vinacea*, *Lecanicillium lecanii* и ряда других её не образовывали.

Обнаружение довольно высокой активности выделения закиси азота грибами в условиях лимитации снабжения кислородом указывает на необходимость оценки этого процесса непосредственно в донных грунтах и, в том числе, с использованием нитритов.

- 2) Спиртовое брожение на среде с нитратом установлено у штаммов *Fusarium culmorum* и *Penicillium solitum* (накопление этанола 0,2-0,3% на 5 сут) из 8 морских изолятов видов, способных к анаэробному росту. Это связано, видимо, с использованием нитратов, а не более предпочтительных восстановленных источников азота, с которыми и необходимо в дальнейшем провести изучение активности брожения морских видов грибов

Спасибо за внимание!