



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

Разнообразие и метаболизм грибов в анаэробных условиях

Выполнила:

Студентка 3-го курса
Фролова Марина Александровна

Научный руководитель:

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

Цель работы

Обобщение имеющихся материалов по группе анаэробных грибов и факультативно-анаэробных грибов, изучение их разнообразия, местообитания и метаболизма, с акцентом на способность к восстановлению серы и железа, а также некоторых негативных аспектов этой жизнедеятельности, в частности - биокорозии.

Классификация организмов в зависимости от отношения к кислороду

Таблица 1

Классификация базируется на оценке способности микроорганизмов:

- к использованию или не использованию O_2
- выживать или гибнуть при наличии в среде свободного кислорода или его активных форм: перекисей, супероксид радикалов
- функционировать только в определенных границах окислительно-восстановительного потенциала.

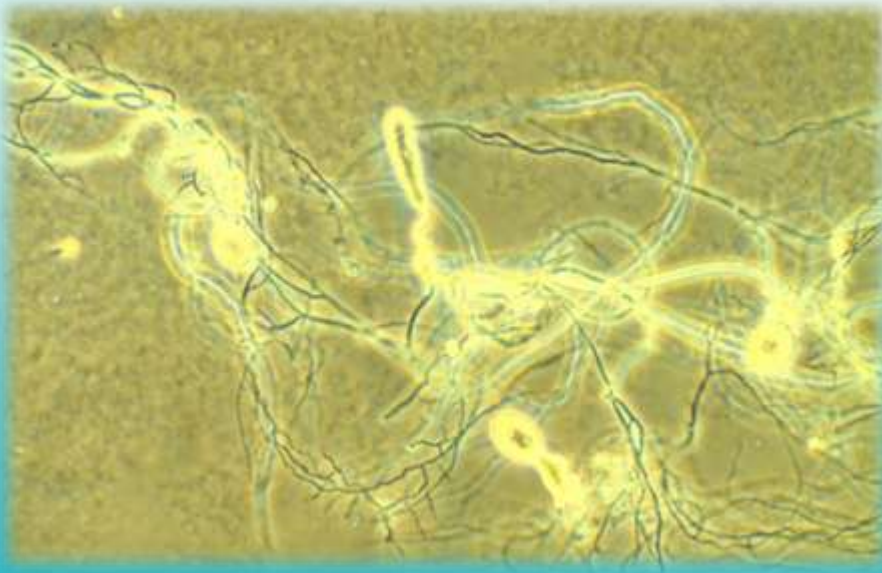
Для прокариот была предложена следующая классификация зависимости от их роста и необходимости обеспечения среды O_2 (по Brock et al., 1984), и принята в работах с грибами.

Классификация грибов по отношению к кислороду достаточно структурирована

Группа микроорганизмов	Отношение микроорганизмов к условиям среды		Наличие		Отношение микроорганизмов к O_2
	окисленные	Восстановленные	каталазы	Супероксид-дисмутазы	
Облигатные аэробы	растут	не растут	+	+	нуждаются
Факультативные анаэробы	растут	растут	+	+	не нуждаются, но лучше растут с O_2
Микроаэрофилы	растут, если не сильно окисленные	растут, если среда не сильно восстановлена	+	+	нуждаются, на уровне ниже $P_{O_2} = 0,2$ атм.
Аэротолерантные анаэробы	растут	растут	–	+	не нуждаются, в присутствии O_2 рост не лучше
Облигатные анаэробы	гибнут	растут	–	–	Повреждаются кислородом

Таксономическая принадлежность анаэробных грибов

К облигатно анаэробным грибам относятся представители отдела Neocallimastigomycota, класса Neocallimastigomycetes, семейства Neocallimastigaceae, рода Anaeromyces, Caecomyces, Syllamyces, Neocallimastix, Orpinomyces, Piromyces, которые являются обитателями рубца жвачных животных. (Trinci et al., 1994).



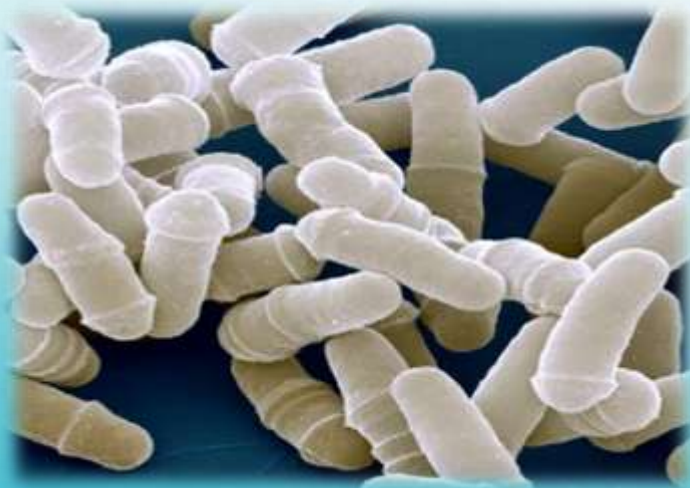
Представитель класса Neocallimastigomycetes

<http://www.fishbiosystem.ru/Fungi/Neocallimastigomycota/Foto/Neocallimastigomycota%201f.jpg>

Таксономическая принадлежность факультативно- анаэробных дрожжевых грибов

Виды родов *Hanseniaspora*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* и многих других аскомицетных дрожжей хорошо растут в анаэробных условиях (Кураков, 2009).

Значительно реже эта способность встречается у базидиомицетных дрожжей и рост, как правило, слабый.



Представитель рода
Schizosaccharomyces



Представитель рода *Hanseniaspora*

Таксономическая принадлежность факультативно-анаэробных микроскопических грибов

Таблица 2

На настоящее время известно порядка 40 видов мицелиальных микромицетов - *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Gibberella fujikuroi*, *Cylindrocarpon tonkinense*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma harzianum*, *Mucor erectus*, *M. hiemalis*, *M. fragilis*, *M. abundans*, *M. rouxii* (*Amylomyces rouxii*), *M. subtilissimus*, *Zygorhynchus moelleri*, *Z. vuilleminii*, *Absidia spinosa* и ряда других (Kirk, Cannon, Minter & Stalpers, Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 2008)

Разнообразие их, видимо, выше, но пока эта способность установлена у относительно небольшой группы микромицетов.

Изучение групп микромицетов способных к росту в анаэробных и микроаэробных условиях требует дополнительного изучения.

Отдел	Порядок	Семейство	Род/вид
Ascomycota	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. (1881)
			<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. (1824)
			<i>Fusarium</i> spp.
			<i>Clonostachys grammicospora</i> Schroers & Samuels (2001)
			<i>Clonostachys rosea</i> (J.C. Gilman & E.V. Abbott) Schroers (2001) f. <i>rosea</i> (syn <i>Gliocladium roseum</i>)
			<i>Clonostachys</i> sp.
			<i>Acremonium</i> sp., близок к <i>A. kashiense</i> (<i>Rhizostilbella hibisci</i> (Pat.) Seifert, (1985))
			<i>Sphaerostilbella aureonitens</i> (Tul. & C. Tul.) Seifert, Samuels & W. Gams (1985) (syn <i>Gliocladium penicilloides</i>)
			<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai (1969)
			<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969)
			<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai (1969)
			<i>Trichoderma viride</i> Pers. (1794)
			<i>Trichoderma koningii</i> Oudem. (1902)
		Clavicipitaceae	<i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimm.) Zare & W. Gams (2001) (syn <i>Verticillium lecanii</i>)
			<i>Tolypocladium inflatum</i> W. Gams (1971)
	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus terreus</i> Thom (1918)
			<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem (1867)
			<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson (1974)
	Incertae sedis		<i>Acremonium strictum</i> W. Gams (1971)
			<i>Humicola grisea</i> Traaen (1914)
	Mucorales	Mucoraceae	<i>Actinomucor elegans</i> (Eidam) C.R. Benj. & Hesselt. (1957)
			<i>Absidia glauca</i> Hagem (1908)
			<i>Mucor circinelloides</i> van Tiegh. (1875)
			<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer (1903)
			<i>Mucor racemosus</i> Fresen (1850)
			<i>Rhizopus arrhizus</i> A. Fisch., in Rabenhorst (1892), var. <i>arrhizus</i> (syn <i>Rhizopus oryzae</i>)
			<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuill. (1903)
			<i>Zygorhynchus heterogamus</i> (Vuill.) Vuill. (1903)
		Umbelopsidaceae	<i>Umbelopsis isabellina</i> (<i>Mortierella isabellina</i> Oudem. (1902))
	Mortierellales	Mortierellaceae	<i>Mortierella</i> sp.

Распространение грибов, способных к анаэробной жизнедеятельности

Таблица 2

Облигатно анаэробные грибы – обитатели рубца жвачных *Caecomyces*, *Piromyces*, *Neocalimastix*, *Anaeromyces*, *Orpinomyces* (Orpin, 1975; Trinci et al., 1994).

Дрожжевые грибы – способные к анаэробному росту в сахаристых плодах, нектаре, торфах *Candida paludigena*, *C. drymidis*, *C. sake*, *Pichia silvi- cola*, *P. capsulata* (Bartnicki-Garsia S., W.J. Nickerson 1961; Tabak H.H., Cooke W.B. 1968; Curtis P.J. 1969; Gunner H.B., Alexander M. 1964; Лаврентьев Р.Б., Кураков А.В. 2004). Мицелиальные микроскопические грибы в почвах зонального ряда, верховых и низинных болотах, почвах пойм (Таблица 2).

Наиболее часто в дерново-подзолистой, серой и темно-серой лесной, выщелоченного и обыкновенного черноземов, дерновоаллювиальной почвы, аллювиально-луговой пойменной почвы, низинно-торфяных почв, компосте, экскрементах и кишечнике червей в анаэробных условиях анаэробных условиях выделяли виды родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorrhynchus*

В болотных почвах и болотах – доминировали различные виды триходермы.

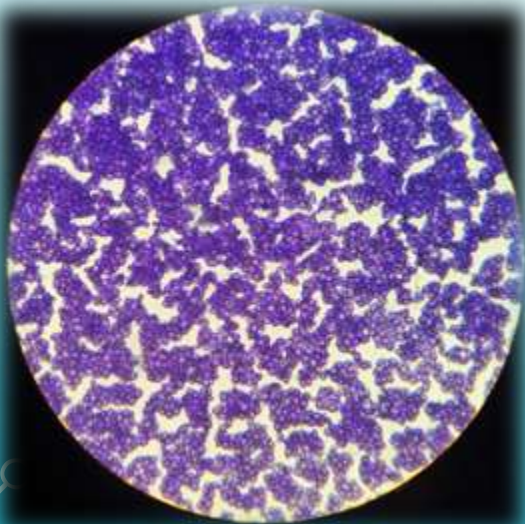
Почва	доля от общего числа изолятов, %		
	> 15	15-7	< 7
Дерново-подзолистая	<i>Mucor hiemalis</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Mucor</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Zygorhynchus moelleri</i> , <i>Trichoderma viride</i>	
Серая лесная	<i>Mucor</i> sp., <i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>		
Чернозем выщелоченный	<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i> , <i>Mucor racemosus</i>	<i>Humicola grisea</i> , <i>Sphaerostilbella aureonitens</i>
Черноземно-луговая солонцеватая	<i>Fusarium solani</i>	<i>Mucor</i> sp.	
Корковый солончак, солончаковато-солонцеватая аллювиальная, лугово-буряя солонцеватая солончаковатая	<i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Fusarium</i> sp.	<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	<i>Acremonium</i> sp., <i>Nectria grammicospora</i> *, <i>Aspergillus terreus</i>
Аллювиально-луговая пойменная	<i>Mucor hiemalis</i> , <i>M. circinelloides</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Actinomucor elegans</i> , <i>Zygorhynchus heterogamus</i>	<i>Absidia</i> sp.
Дерново-аллювиальная почва	<i>Trichoderma polysporum</i> , <i>T. Atroviride</i> *, <i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
Торфяная почва верхового болота	<i>Trichoderma aureoviride</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. koningii</i>	<i>Mucor hiemalis</i> , <i>Umbelopsis isabellina</i> *, <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Tolypocladium inflatum</i> *
Низинно-торфяная почва	<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma viride</i>	<i>Zygorhynchus</i> sp.

Энергетический метаболизм грибов в анаэробных условиях

Брожение

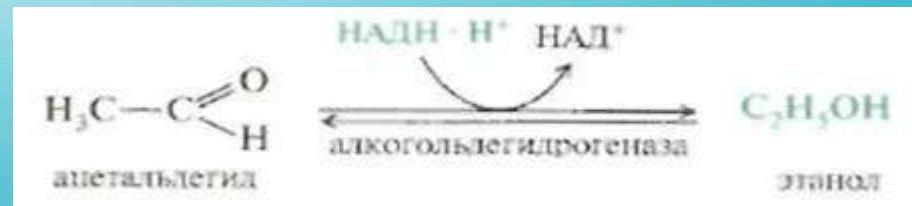
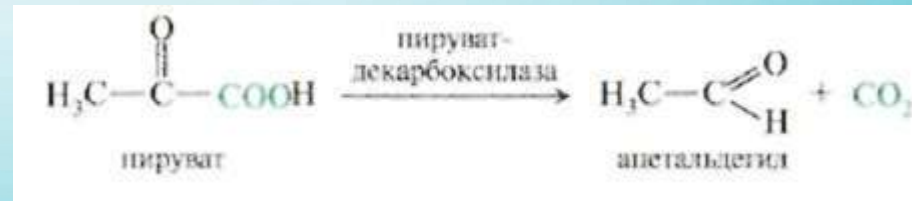
Процесс брожения - это неполное окисление органических веществ в анаэробных условиях.

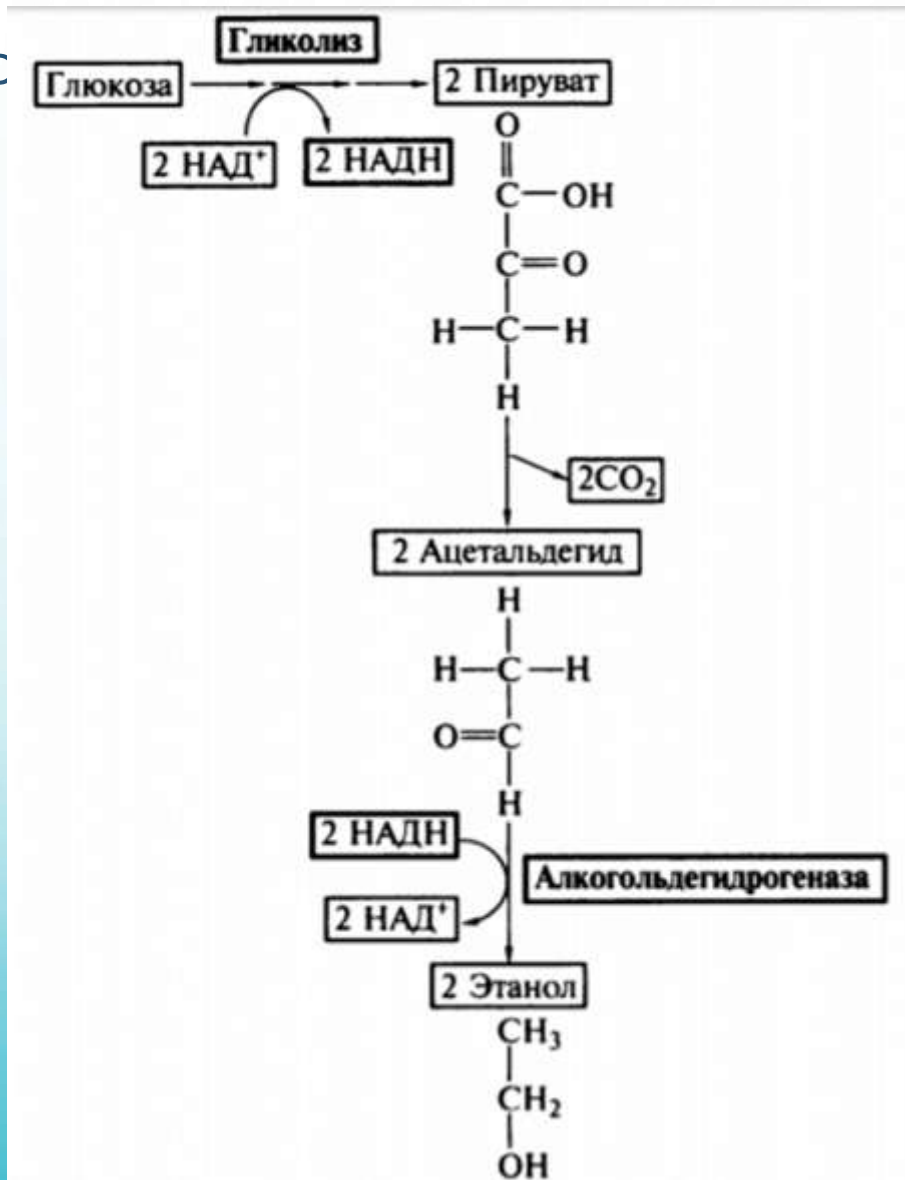
Донором водорода при брожении является одно органическое вещество, а акцептором – другое органическое вещество, которое при этом восстанавливается.



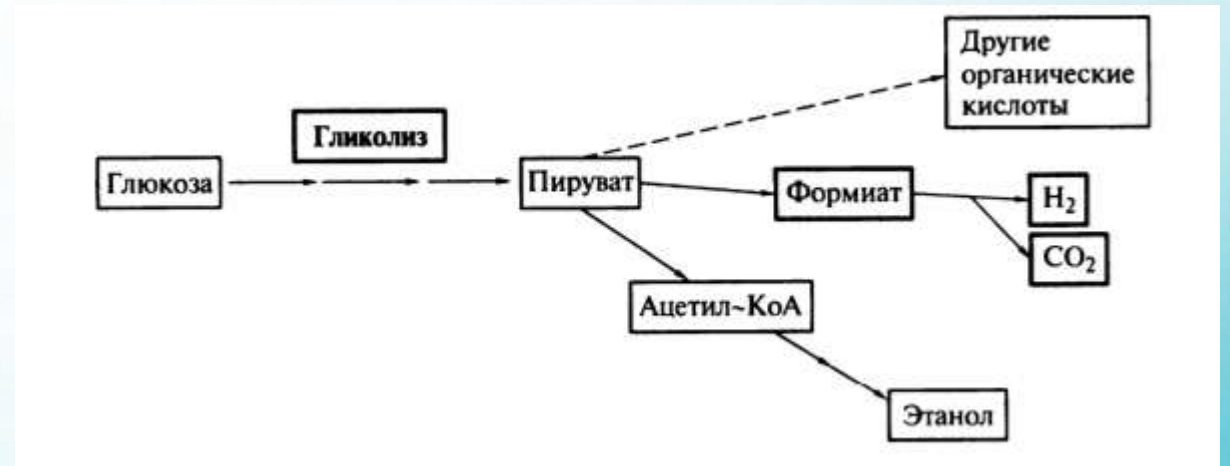
Гликолиз:

Процесс гликолиза включает реакцию окисления фосфоглицеринового альдегида, в которой образуется восстановленный пиридиннуклеотид НАД·Н. В отсутствии кислорода НАД·Н окисляется до НАД⁺ при декарбоксилировании пирувата и превращении образовавшегося при этом ацетальдегида в этанол. Образовавшийся НАД⁺ может принимать участие в окислении следующей молекулы фосфоглицеринового альдегида (Бабьева, Чернов, 2004).

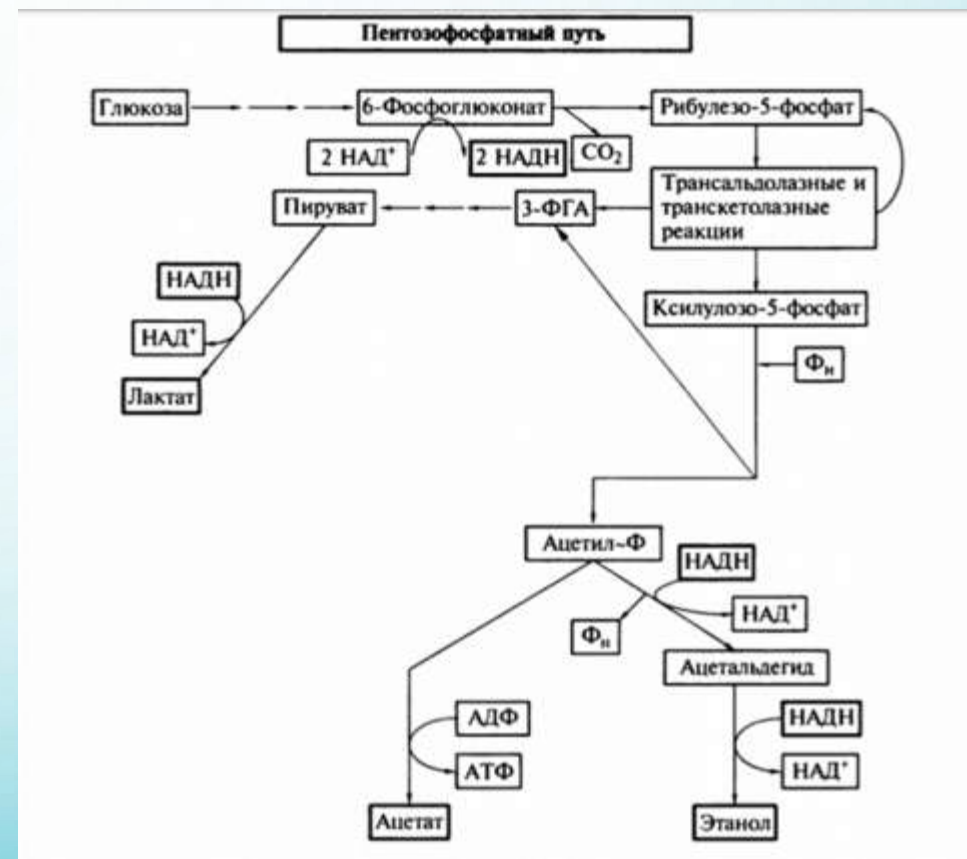




Спиртовое брожение у дрожжей (А.И. Нетрусов, И.Б. Котова, 2009)



Смешанное (кисотно-спиртовое) брожение
(А.И. Нетрусов, И.Б. Котова, 2009)



Гомо- и Гетероферментативное молочнокислое брожение (соответственно)
(А.И. Нетрусов, И.Б. Котова, 2009)

Процессы брожения

Кислотно-спиртовое брожение с образованием спиртов и летучих жирных кислот установлено у облигатно анаэробных грибов (Бабьева, Чернов, 2004).

Из 62 родов аскомицетных дрожжей представители 21 рода являются активными спиртовыми бродильщиками. 100% штаммов видов родов *Hanseniaspora*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* способны к брожению. Среди базидиомицетов встречаются только слабые бродильщики – виды родов *Mrakia*, *Trichosporonoides*, *Xanthophyllomyces* (ссылка).

Есть виды, сбраживающие до этанола широкий спектр сахаров (глюкоза, сахароза, галактоза, мальтоза, лактоза, раффиноза, трегалоза). Некоторые способны сбраживать полисахариды, *Kluveromyces fragilis* - инулин (полифруктозан), а *Schwanniomyces occidentalis* и *Saccharomyces fibuliger* - крахмал (ссылка).

У мицелиальных микромицетов (представители аскомицетов и зигомицетов) установлено спиртовое и реже молочнокислое (зигомицеты и хитридиомицеты)

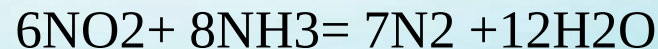
Процессы брожения достаточно изучены и требует оценки побочные продукты превращения.

Диссимиляторное восстановление нитратов и нитритов

Помимо брожения грибы обладают способностью к диссимиляции нитратов и образованию окислов азота. У грибов *Fusarium oxysporum* (Kobayashi, Shoun, 1995), *Cylindrocarpon tonkinense* (Kobayashi et al, 1996) и *Fellomyces fuzhouensis* (Uchimura et al, 2002) была обнаружена диссимиляторная нитритредуктаза, катализирующая восстановление NO_2^- в NO и связанная с синтезом АТФ в митохондриях.

Ацетилен, который служит ингибитором редуктазы закиси азота, не влиял на количество продуцируемой грибами закиси азота (Kurakov et al., 2001). То есть N_2O является основным конечным продуктом анаэробного восстановления нитритов и нитратов у микромицетов.

Реакция восстановления нитрата:



Итак, грибы могут использовать и альтернативные пути диссимиляторной нитратредукции при недостаточном снабжении кислородом. Так, *Fusarium oxysporum*, способен осуществлять спиртовое брожение, а в присутствии нитрата или нитрита осуществлять денитрификацию до закиси азота и анаэробное восстановление нитрата в аммоний.

Трансформация серы грибами в анаэробных условиях

Культивировании *Fusarium oxysporum* в анаэробных условиях, на среде содержащей различные неорганические сульфаты наблюдался их переход в H_2S в присутствии S_8 (Abe et al., 2007). Наблюдалось увеличение клеточной массы спустя несколько дней культивирования, несмотря на то что в среде отсутствовал NO_3^- , который, как показывают предыдущие исследования необходим для роста клеток, поэтому был сделан вывод, что восстановление S_8 до H_2S поддерживает рост грибов в анаэробных условиях.

Сульфат, сульфит, тиосульфат и тетратионат способствовали получению H_2S , и рост клеток был менее значительный.

Это говорит о том, что рост клеток и продуцирование H_2S , специфичны для S_8 . Также помимо образования H_2S , *Fusarium oxysporum* одновременно образовывал ацетат и CO_2 , что указывает на то, что при уменьшении массы гриба источник углерода (этанол) окислялся до ацетата и CO_2 .

Реакции восстановления серы:



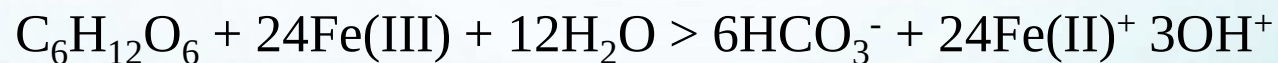
Анализ литературы показывает, что в сравнении с бактериями, о возможностях грибов к анаэробной

трансформации соединений серы мы имеем очень скудные знания

Трансформация соединений железа грибами

Информации по метаболизму железа грибами в анаэробных условиях мало.

Установлено, что добавление к питательной среде Fe(III) стимулировало анаэробный рост *Fusarium oxysporum* на глюкозе (Gunner et al., 1964).



Однако так и не доказано восстановление Fe (III) или Mn (IV) было связано с переносом электронов и непосредственно давали энергию для поддержки этого роста. Fe (III) и Mn (IV), по-видимому, служат второстепенными акцепторами электронов в основном ферментативном метаболизме.

Метаболизм железа грибами в анаэробных условиях требует дополнительного изучения

Негативные аспекты деятельности факультативно-анаэробных грибов в деятельности человека на примере биокоррозии

Метаболическая активность грибов по в анаэробных условиях приводит к образованию большого количества агрессивного сероводорода (H_2S) и биокоррозии металлов, внутренних стенок трубопроводов, емкостей для хранения, насосного оборудования (Е.И. Андреюк, В.И. Билай, Э.З. Коваль, И.А. Козлова, 1980; А.А. Герасименко 1987; Каменщиков, Ф.А., 2007).

Кроме поражения стального оборудования грибы повреждают и другие металлы. *Aspergillus niger* в десятки раз повышает скорость коррозии алюминиевого сплава за счет разрушения защитной оксидной пленки из-за подкисление им среды, что вызывает нарушению этой пленки (Е.И. Андреюк, В.И. Билай, Э.З. Коваль, И.А., 1980).

Учитывая важность процессов восстановления серы и железа в анаэробных условиях в понимании их циклов в природе, практическое значение для обеспечения защиты металлов имеет большую перспективу и новизну, работа по изучению участия грибов в превращениях этих элементов.

Заключение

Собрана информация о таксономической принадлежности облигатных анаэробных (представители неокалимастигомикота) факультативно-анаэробных грибов (зигомицеты и аскомицеты, реже базидиомицеты), их распространении и обилии в разных экотопах.

Получение энергии у облигатно анаэробных грибов основывается на смешанном брожении (кисотно-спиртовом), у факультативно анаэробных грибов – гомоферментативное - спиртовое, реже молочнокислое брожение, а также возможно диссимиляторное восстановление нитритов и нитратов.

Информации о способности грибов к анаэробному восстановлению серы и, особенно, железа очень мало, имеются только единичные публикации. Полагается, что у грибов возможно энергодающее восстановление серы до сероводорода.

Интерес к исследованиям в этой области существенно вырос в связи с развитием биотехнологий, в которых свойства анаэробных грибов используют для производства биотоплив и других, востребованных рынком, продуктов, а также для решения проблем по переработке отходов, токсикантов и защиты от биокоррозии, порчи продуктов и материалов.

Методы изучения

Для изоляции и последующей инкубации в анаэробных условиях чистых культур грибов использовали модифицированный метод Хангейта (Hungate, 1969).

Агаризованную среду, разлитую в небольшие матрасы, инкубировали в течение 4-12 суток при 24-26°C, а антибиотики добавляли в более высоких концентрациях, чем при обычных посевах.

Для создания анаэробных условий чашки помещались в герметичные пластиковые боксы GENbox объемом 2,5 и 7 л вместе с генераторами анаэробной атмосферы GENbox anaer фирмы Biomerieux и индикаторами окислительно-восстановительного потенциала.

При обеспечении анаэробной среды азота в боксы добавляют питательную среду такие как:

- 1) 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; пептон – 5,0; глюкоза – 5,0; дрожжевой экстракт - 0,5 + 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) + 1 мл/л раствора витаминов ((мг/л): 4-аминобензойной кислоты - 25, D-биотина - 100, никотиновой кислоты - 25, пантотената кальция - 25, пиридоксина гидрохлорида - 25, фолиевой кислоты - 10, рибофлавина - 25, B12 - 0,5, липоевая кислота – 25)
- 2) глюкозо-минеральную среду (аналогичный состав, но без пептона, дрожжевого экстракта и витаминов).

Содержание глюкозы варьировали от 0,5 до 0,001%.

Длительность инкубации чашек в анаэробных условиях 8-13 суток.

В посевах из почв для подавления роста бактерий в расплавленную, стерильную, не горячую среду добавляли антибиотики: стрептомицин и хлорамфеникол в концентрации 200 мг/л среды.

Идентификацию грибов осуществляли с помощью соответствующих для конкретной систематической группы определителей.

Методы для изучения жизнедеятельности грибов и их идентификации разнообразны и достаточно проработаны для изучения жизнедеятельности грибов в анаэробных условиях.