

Биолог. журн. Армении, 3-4 (56), 2004

УДК 620.193.82

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ШТАММОВ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *PENICILLIUM*, ПОВРЕЖДАЮЩИХ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

С.А. ГЕВОРКЯН, Н.С. ХАЧАТУРЯН, А.В. ГАСПАРЯН, А.А. ХАЧАТУРЯН

Республиканский Центр депонирования микробов НАН Армении, 378510, г. Абовян

Из биоповрежденных полимерных образцов космической техники выделены новые штаммы микромицетов рода *Penicillium*. Изучены культурально-морфологические и биохимические особенности 6 штаммов, представленных видами *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. melinii*. Штаммы видов *P. aurantiogriseum* и *P. melinii* предлагаются для оценки грибостойкости полиэфирных и фторсодержащих полимерных материалов.

Սեկուսացվել են միկրոմիցետների *Penicillium* ցեղի նոր շտամներ տիեզերական տեխնիկայի կենսավնասված պոլիմերների նմուշներից: Ուսումնասիրվել են 6 շտամների մորֆո-կուլտուրալ և կենսաքիմիական առանձնահատկությունները, որոնք ներկայացված են *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. melinii* տեսակներով: Առաջարկվել են *P. aurantiogriseum* և *P. melinii* տեսակների շտամներ պոլիէթերային և ֆտոր պարունակող պոլիմերային նյութերի սեկադիմացկունության գնահատման համար:

New strains of micromycetes of genus *Penicillium* have been isolated from biodeteriorated polymer samples of space technics. The morpho-cultural and biochemical properties of 6 strains presented by species *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum* and *P. melinii* have been studied. The strains of *P. aurantiogriseum* and *P. melinii* for evaluation of fungal stability of polyethers and fluoroplastics have been proposed.

Биоповреждение - микромицеты рода Penicillium — грибостойкость

Исследование процессов биологического повреждения синтетических полимеров важно с точки зрения их биостойкости, поскольку они широко используются в сельском хозяйстве, химической промышленности, технике и медицине. Актуально это и в экологическом плане, так как широкое применение полимеров приводит к накоплению их в окружающей среде. Большую роль в этом процессе играют микромицеты, особенно виды рода *Penicillium*, которые способны вызвать деструкцию природных и синтетических полимеров [1, 11]. Культуры рода *Penicillium*, обладающие сильной биоповреждающей активностью, включены в набор тест-культур грибов, разрушающих разные полимерные материалы [9, 11]. В то же время многие виды данного рода являются продуцентами биологически активных веществ, ферментов, антибиотиков [3, 7].

Целью настоящей работы было изучение культурально-морфологических и биохимических особенностей новых штаммов некоторых видов рода *Penicillium*, выделенных из биоповрежденных полимерных

образцов космической техники, а также оценка грибостойкости полимерных материалов, в частности, из классов полиэфиров и фторопластов.

Материал и методика. Выделение культур микромицетов из биоповрежденных полимерных образцов космической техники проводили методом накопительных культур на питательных средах Чапека и сусле.

Чистые культуры получали рассевом накопительных культур на агаризованные среды. Инкубировали 14 сут при 28°. Отобранные культуры поддерживали в пробирках с агаризованной средой Чапека.

Выделенные штаммы микромицетов идентифицировали до родов [12, 13].

Культуры рода *Penicillium* на основании культурально-морфологических свойств идентифицировали до видов [12, 14].

Для изучения биосинтеза органических кислот исследуемые культуры рода *Penicillium* выращивали в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл, содержащих 75 мл жидкой среды Чапека-Докса, в течение 7 сут при 28°.

Органические кислоты - лимонную, яблочную, янтарную, фумаровую, винную определяли в культуральной жидкости (КЖ) методом бумажной хроматографии (БХ). Молочную кислоту определяли с помощью стандартного кита "Lactate reagent" фирмы Sigma. В качестве растворителя использовали смесь н-бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 18:2:9, а в качестве проявителя - 0,04%-ный спиртовый раствор бромфенолсинего. Количество органических кислот определяли с помощью калибровочного графика, построенного при использовании стандартных растворов органических кислот в концентрациях 50, 100, 150, 200 мкг в 0,1 мл. Спектрофотометрировали при длине волны 540 нм.

Расчет коэффициента кислотообразования проводили по формуле:

$$\sum_{i=1}^n = k^1 g a_1 + k^2 g a_2 + \dots + k^n g a_n,$$

где k_g - константы, характеризующие долю индивидуальных кислот по отношению к винной, $a_1, a_2, \dots, a_n$ - количество кислот в КЖ, г/л.

Полифенолоксидазную (п-дифенолоксидазу или лактазу и о-дифенолоксидазу или тирозиназу), пероксидазную и каталазную активность определяли методами [8].

Липазную активность определяли в среде следующего состава (%): пептон - 1,0; NaCl - 0,5; CaCl₂ - 0,01; агар - 2,0-3,5, pH 6,5, с использованием разных твинов (Т-20, Т-40, Т-65, Т-80) в количестве 2%. О липазной активности судили по появлению прозрачных зон гидролиза при росте культур.

Грибостойкость проверяли на двух полимерных материалах - фторопласте и полиэфире. Для оценки грибостойкости брали 14-суточные, хорошо спорулирующие культуры, готовили водные суспензии каждого штамма в отдельности, определяли титр в камере Горяева ($1-2 \cdot 10^6$ кл/мл). Затем водной суспензией каждого штамма заражали поверхность материала (5x5 см) путем равномерного нанесения ее пульверизатором. Зараженные материалы в эксикаторах помещали в термостат при 28° на 28 сут.

Оценку грибостойкости проводили по шестибальной шкале согласно ГОСТ 9.048-75 - ГОСТ 9.053-75.

Результаты и обсуждение. Из биоповрежденных полимерных образцов космической техники выделены штаммы микромицетов, которые относятся к родам *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Ulocladium*. Преобладали виды рода *Penicillium*, представленные видами *P.aurantiigriseum*, *P.chrysogenum*, *P.melinii*, среди которых для изучения параметров биоповреждающей активности отобраны типичные штаммы. Все выделенные культуры рода *Penicillium* включены в коллекцию Республиканского Центра депонирования микробов Армении.

Ниже приводятся описания культурально-морфологических особенностей исследованных штаммов рода *Penicillium*. Номера штаммов

представлены по коллекции РЦДМ с условным акронимом ИНМИА

P.aurantiogriseum ИНМИА F-12040. Колония растет медленно, бархатистая, плотная, складчато-морщинистая, ярко-зеленая, края гладкие, вдавленные в агар. Реверзум кремовый, по краям светло-зеленый. Гифы септированные, размерами 1,7-3,4 мкм в диаметре, веточки редкие, слабо шероховатые. Метулы слабошероховатые, размерами 10,3-15,1 x 3,4-4,1 мкм, фиалиды бутыловидные, слабошероховатые, размерами 6,2-8,3 x 2,4-3,1 мкм, конидии округлые в очень длинных переплетающихся цепочках, слабошероховатые, 3,4-4,5 мкм в диаметре.

P.aurantiogriseum ИНМИА F-12050. Колония растет медленно, подушковидная, плотная, выпуклая в центре, с крупными, вдавленными в агар складками, серо-зеленая. Реверзум в центре кремовый, а по периферии серо-зеленый. Микроморфологические признаки в основном аналогичны предыдущему штамму.

P.aurantiogriseum ИНМИА F-12061. Колония растет медленно, плотная, ограниченная, выпуклая в центре, куполовидная, светло - серо-зеленая. Реверзум серый, в центре кремовый. Микроморфологическими признаками похож на штамм F-12040, но конидии округлые, в диаметре 2,9-3,9 мкм.

P.melinii ИНМИА F-12035. Колония растет медленно, плоская, бесцветная, позже светло-зеленая, хлопьевидная, края реснитчатые, реверзум бесцветный. Гифы септированные в диаметре 2-3,7 мкм. Веточки отсутствуют, метулы слабошероховатые, в мутовках по 2-3, размерами 16-19,3 x 2,3-3,4 мкм. Фиалиды бутылевидные, слабошероховатые, размерами 7-13,8 x 2-3,2 мкм. Конидии округлые в очень длинных изогнутых цепочках, шероховатые, 3,1-3,9 мкм в диаметре.

P.melinii ИНМИА F-12087. Колония растет медленно, прозрачная, плоская, позже хлопьевидная, болотно-зеленая, реверзум бесцветный. Микроморфологические признаки в основном сходны с предыдущим штаммом.

P.chrysogenum ИНМИА F-12039. Колония растет медленно, плотная, плоская, выпуклая в центре, замшевая, лимонно-желтая в центре, зеленая по периферии, края гладкие, белые. Образует желтый растворимый пигмент. Реверзум светло-желтый. Гифы септированные, в диаметре 3-7,5 мкм. Веточки гладкие, септированные 13-19,2 x 3,3-4,5 мкм, метулы слабошероховатые, в мутовках по 4, размерами 10,5-17 x 3-4,5 мкм, фиалиды слабошероховатые, 5,6-9,5 x 3-3,5 мкм. Конидии сферические, слабошероховатые, в длинных цепочках, 2,9-3,9 мкм в диаметре.

Признаки вышеприведенных штаммов рода *Penicillium* кодированы по принципу Адансона и включены в базу данных грибов – биодегрантов РЦДМ [15].

Повреждение полимеров грибами-биоразрушителями происходит как в результате механического разрушения разрастающимся мицелием, так и за счет воздействия на полимеры различных продуктов метаболизма грибов, в первую очередь, органических кислот и ферментов. Эти критерии являются одной из основ для отбора микроорганизмов, повреждающих полимерные материалы. [2].

Установлено, что органические кислоты, образуемые грибами, способствуют микробному обрастанию и деструкции материалов. Наиболее агрессивными факторами являются винная, лимонная, фумаровая, яблочная, молочная, а сильноразрушающими – уксусная и щавелевая кислоты, которые предлагаются в качестве параметра при отборе агрессивных культур-биодегрантов для оценки биостойкости полимерных материалов [4,5].

Нами изучено кислотообразование новых культур рода *Penicillium*. Результаты изучения состава органических кислот, продуцируемых отобранными штаммами рода *Penicillium*, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Образование двух-и трехосновных кислот культурами грибов рода *Penicillium* (инкубация 7 сут, 28°)

Наименование и номера штаммов по ИНМИА	Общая сумма кислот, г/л КЖ	Количество органических кислот, г/л КЖ						Коэффициент кислот образования
		вин-ная	лимон-ная	яблоч-ная	янтар-ная	молоч-ная	фумаро-вая	
<i>P.aurantiogriseum</i>								
F-12040	0,3	0,02	0,2	0,03	0,02	0,01	0,02	0,1
F-12050	0,14	0,03	0,05	0,02	0,02	0,01	0,01	0,2
F-12061	0,15	0,03	0,05	0,02	0,02	0,01	0,02	0,2
<i>P.chrysogenum</i>								
F-12039	0,41	0,12	0,2	0,03	0,02	0,02	0,02	0,3
<i>P.melinii</i>								
F-12035	0,54	0,1	0,05	0,1	0,15	0,04	0,1	0,2
F-12087	0,12	0,01	0,01	0,02	0,02	0,05	0,01	0,1

Агрессивность культур грибов зависит от количества синтезируемых кислот и их качественного состава, от условий развития микромицета. В связи с этим важным фактором является коэффициент кислотообразования, что учитывает количество каждой кислоты в литре КЖ и относительную долю кислот по отношению к винной, как наиболее сильной.

Выявлено, что высокий коэффициент кислотообразования отмечен у шт. *P.chrysogenum* F-12039 (0,3). У штаммов *P.aurantiogriseum* F-12050 и F-12061, а также у шт. *P.melinii* F-12035 кислотность составляет 0,2, а у шт. *P.aurantiogriseum* F-12040 и шт. *P.melinii* F-12087 – 0,1.

Согласно литературным данным, четкой корреляции между кислотообразованием микромицетов и их агрессивностью не существует. Так, кислотная активность метаболитов *Aspergillus flavus* - 38 и *Aspergillus niger* - 42 на среде Чапека-Докса составляла 0,56 и 0,25 соответственно, однако *A.niger* - 42 продуцировал щавелевую кислоту, которая, кристаллизуясь в трещинах бетона, разрушала его прочность [4].

Микробиологическое повреждение обусловлено не только воздействием органических кислот, но и грибными ферментами, особенно оксидоредуктазами (полифенолоксидазами, пероксидазой, каталазой) и эстеразами (липазы, фосфатазы). Оксидоредуктазы повреждают разные полифенолы,

комбинированные строительные материалы с древесной основой, а липазы - полиэферы, резинотехнические, лакокрасочные материалы [2, 10].

Результаты данных о ферментативной активности культур грибов рода *Penicillium* представлены в табл. 2.

Таблица 2. Характеристика ферментативной активности культур грибов рода *Penicillium*

Наименование и номера штаммов по ИНМИА	Ферментативная активность							
	Лак- каза	Тирози- наза (п-дифе- нолокси- даза)	Перокси- даза (о-дифе- нолокси- даза)	Ката- лаза	Липазы			
					Твин -20	Твин -40	Твин -60	Твин -80
<i>P.aurantiigriseum</i> F-12040	-	-	+++	+++	+	-	+++	+++
F-12050	-	-	+++	+++	+	-	++	++
F-12061	-	-	+	+++	+	-	+++	+++
<i>P.chrysogenum</i> F-12039	-	-	+++	+++	+	+++	-	++
<i>P.melinii</i> F-12035	-	-	++	+++	+++	+	-	+++
F-12087	-	-	++	+++	+	-	+++	+++

Примечание: Степень активности ферментов отмечена по 3-балльной системе.

Полученные нами данные показали, что изученные штаммы рода *Penicillium* не продуцируют полифенолоксидазы. Ряд авторов отмечает корреляцию между полифенолоксидазной активностью и продуцированием темноокрашенных пигментов [6]. Следует отметить, что при росте все изучаемые штаммы не образуют темноокрашенных пигментов и, возможно, отсутствие полифенолоксидаз связано с подобной корреляцией. Литературные данные также указывают, что полифенолоксидазная активность часто присутствует у агрессивных штаммов микромицетов-биоразрушителей, однако не является характерным признаком [9].

Наши данные показали, что из оксидоредуктаз все культуры рода *Penicillium* активно продуцируют каталазу. Пероксидазная активность проявляется у всех изучаемых культур, однако активными продуцентами пероксидазы являются штаммы *P.aurantiigriseum* F-12040 и F-12050, а также шт. *P.chrysogenum* F-12039.

Изучение липолитических ферментов показало, что все культуры в целом активно гидролизуют твин-80 (полиоксиэтилен-сорбитанмоноолеат).

Все штаммы действуют на твин-20 (полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат), однако активность особенно выражена у шт. *P.melinii* F-12035.

Твин-40 (полиоксиэтиленсорбитанмонопалмитат) не гидролизуются штаммами *P.aurantiigriseum*. Высокая липазная активность на твин-40 проявляется у шт. *P.chrysogenum* F-12039. Наличие липазы, гидролизующей твин-40, отмечено у шт. *P.melinii* F-12035, отсутствие - у шт. *P.melinii* F-12087.

Твин-65 (полиоксиэтиленсорбитантристеарат) активно гидролизуют штаммы *P.aurantiogriseum* F-12061 и F-12040, а также - шт. *P.melinii* F-12087, однако шт. *P.chrysogenum* F- 12039 и шт. *P.melinii* F-12035 этот твин не гидролизуют.

На основе гидролиза разных твинов можно предположить, что изучаемые штаммы рода *Penicillium* обладают широким спектром липаз, что проявляется на видовом и штаммовом уровне.

Данные по изучению биосинтеза органических кислот и ферментативной активности новых выделенных штаммов рода *Penicillium* положены в основу изучения грибостойкости полиэфирных и фторсодержащих полимеров. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Оценка грибостойкости полиэфира и фторопласта при поражении штаммами рода *Penicillium*

Наименование и номера штаммов по ИНМИА	Степень обрастания, баллы	
	полиэфир	фторопласт
<i>P.aurantiogriseum</i> F-12040	4	4
F-12050	2	4
F- 12061	4	4
<i>P.chrysogenum</i> F-12039	1	3
<i>P.melinii</i> F- 12035	2	2
F- 12087	3	3

Примечание: Балл 0 - при осмотре под микроскопом рост грибов не виден. Балл 1 - при осмотре под микроскопом видны проросшие споры и незначительно развитый мицелий в виде неветвящихся гиф. Балл 2 - при осмотре под микроскопом виден мицелий в виде ветвящихся гиф, возможно спороношение. Балл 3 - при осмотре невооруженным глазом рост грибов едва замечается. Балл 4 - при осмотре невооруженным глазом отчетливо виден рост грибов, покрывающих менее 25% испытываемой поверхности. Балл 5 - при осмотре невооруженным глазом отчетливо виден рост грибов, покрывающих более 25% испытываемой поверхности.

Выявлено, что штаммы *P.aurantiogriseum* F-12040 и F-12061 активно поражают фторопласт и полиэфир, что отмечается по оценке степени обрастания (4 балла), однако шт. F-12050 более активно поражает фторопласт, чем полиэфир, что по оценке степени обрастания составляет 4 и 2 балла соответственно.

Из штаммов *P.melinii* наиболее активным является шт. F-12087, так как степень обрастания полиэфира и фторопласта составляет 3 балла.

Штамм *P.chrysogenum* F-12039 незначительно повреждает полиэфир, но интенсивнее - фторопласт, что составляет по оценке обрастания 1 и 3 балла соответственно.

Результаты исследований позволяют заключить, что штаммы *P.aurantiogriseum* F-12040, F-12061 и шт. *P.melinii* F-12087 могут служить в качестве тест-культур для оценки грибостойкости полиэфирных и фторсодержащих полимеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда МНТЦ (Проект А-092.2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алехова Т.А., Новожилова Т.Ю., Александрова А.В., Борисова В.А., Самосадная Т.Е., Ермак А.Л. Мат-лы I междун. конгр. «Биотехнология-состояние и перспективы развития», М., 315, 2002.
2. Анисимов А.А., Смирнов В.Ф., Семичева А.С. В кн: Биоповреждения, М., 211-251, 1987.
3. Зеленкова Н.Ф., Винокурова Н.Г., Аринбасаров М.У. Прик. биохимия и микробиология, 39, 1, 52-62, 2003.
4. Кадошников В.М., Олишевская С.В., Фомина М.А., Соботович Э.В., Яценко В.Г., Гречановская Е.Е. Мат-лы I междун. конгр. «Биотехнология-состояние и перспективы развития», М., 315-316, 2002.
5. Кулик Е.С., Карякина М.И., Виноградова Л.М., Моисеева Н.Г. В кн: Микроорганизмы и низшие растения - разрушители материалов и изделий, М., 90-96, 1979.
6. Лях С.П. Микробный меланиногенез и его функции, М., 1981.
7. Махсумханов А.А., Якубов И.Т., Давранов К.Д. Прик. биохимия и микробиология, 39, 1, 47-51, 2003.
8. Методы экспериментальной микологии (под ред. Билай В.И.), Киев, 1973.
9. Пивазян Л.А., Давтян С.А., Хачатурян Н.С., Арутюнян А.Е., Петросян С.М., Африкян Э.К. Биолог. журн. Армении, 51, 1-2, 48-55, 1998.
10. Пивазян Л.А., Хачатрян Л.С., Хачатурян Н.С., Давтян С.А., Арутюнян А.Е., Петросян С.М., Африкян Э.К. Там же, 56-61.
11. Сычугова О.В., Колесникова Н.Н., Лихачев А.Н., Попов А.А. Мат-лы I междун. конгр. «Биотехнология - состояние и перспективы развития», М., 313-314, 2 002.
12. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (Ed. Kirk P.M. et al.), 9th edition, CAB International, 2001.
13. Domsch K.H., Games W., Traute-Heidi Anderson Compendium of soil fungi, 1, 1993.
14. Pitt J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species, Australia, 188p., 1991.
15. Rogosa M., Krichevsky M.I., Colwell R.R. Coding Microbiological Data for Computers, Springer-Verlag, 299pp., 1986, version Internet, 1994.

Поступила 16.VI.2004