



УДК 582.28+595.142.34

Изучение воздействия *Trichoderma viride* на выживаемость дождевых червей *Eisenia fetida* в процессе трансформации целлюлозосодержащих ОТХОДОВ

В. А. Быбин, О. В. Грузных, Д. И. Стом, Б. Н. Огарков

Иркутский государственный университет, Иркутск
E-mail: godolin@mail.ru

Аннотация. Показано использование системы деструкторов «дождевые черви *Eisenia fetida* – микромицет *Trichoderma viride*» для утилизации отходов пивоварения. Продемонстрировано воздействие *T. viride* на выживаемость дождевых червей в процессе функционирования такой системы. Ранее авторами были получены материалы, указывающие на подавление жизнедеятельности дождевых червей триходермой в зависимости от количества и возраста культуры, вводимой олигохетам перорально. В представленных исследованиях черви сохраняли жизнеспособность при выдерживании на газонах из исследуемого гриба. Обеззараживание субстратов, трансформируемых триходермой, путём автоклавирования перед внесением в них вермикомпонента, негативно сказывалось на состоянии олигохет.

Ключевые слова: дождевые черви, микромицеты, триходерма, целлюлоза, утилизация отходов.

Введение

На сегодняшний день значительно возрос интерес к методам утилизации целлюлозосодержащих отходов пищевой промышленности. В связи с этим актуален поиск направлений рационального использования целлюлозосодержащих отходов. Широко используемым методом утилизации целлюлозных материалов является двухстадийный процесс: гидролиз – кислотный или ферментативный – с последующим сбраживанием полученного гидролизата дрожжами в этиловый спирт и углекислоту. Однако кислотный гидролиз относится к одному из наиболее экологически неблагоприятных производств, ферментативный же более экологичен, но и более дорогой, поскольку требует создания дополнительной стадии производства целлюлолитических ферментов. В результате гидролиза образующиеся сахара ассимилируются дрожжами неполностью (~50 %). Альтернативной технологией, обладающей рядом преимуществ, является вермикюльтивирование с использованием культур целлюлозоразрушающих грибов [3; 4]. При внесении в субстрат из органических отходов сельского хозяйства, вермикомпостируемых при помощи промышленной линии дождевых червей *Eisenia fetida*

(красный калифорнийский гибрид), культуры целлюлозолитического гриба (*Trichoderma viride*) интенсифицируется скорость и увеличивается степень утилизации отходов и переработки их в биогумус [7]. В этом случае наблюдается повышение ростостимулирующей и фунгистатической активности получаемого биогумуса по сравнению с аналогичными показателями вермикомпоста, приготавливаемого по традиционной методике. Кроме того, сроки трансформации отходов снижаются с 4–6 месяцев до 3–4 недель при умеренной температуре (+20...+25 °С) [7]. Таким образом, применение системы микроорганизмы – дождевые черви интенсифицирует процесс трансформации отходов.

Однако штаммы *Trichoderma* довольно агрессивны [5]. Как показали наши исследования, штамм *T. viride*, перспективный для создания таких систем, может негативно влиять на дождевых червей [1]. В связи с вышеизложенным целью работы явилось изучение воздействия триходермы на выживаемость дождевых червей в процессе трансформации целлюлозосодержащих отходов.

Материалы и методы

В качестве целлюлозосодержащих отходов в эксперименте использовали некондиционный по сроку хранения ячмень и пивную дробину (ООО «Адмирал Колчак», Иркутск). Дробина является отходом пивоваренного производства: это гуща, остающаяся после варки и отсасывания ячменного сула и содержащая частицы ядер и оболочки зерна.

Целлюлозосодержащие отходы утилизировали с помощью внесения суспензии гриба *T. viride*, а затем подвергали воздействию дождевых червей из популяции, содержащейся в лабораторных условиях.

Культура *T. viride* Pers., (1794) (Нурогееасеае) содержится в коллекции Б. Н. Огаркова. Штамм-продуцент гриба синтезирует высокоактивный комплекс целлюлолитических ферментов [5; 8; 9].

В качестве объекта использованы половозрелые (имеющие поясковую зону – *clitellum*) особи гибрида красного калифорнийского червя *E. fetida andrei* Vouche, 1963 длиной 8–10 см. В лаборатории червей разводили в ящиках при температуре 20–25 °С и влажности 80–85 %.

Опыты по изучению деструкции отходов *T. viride* проводили в чашках Петри, в которые закладывали по 40 г ячменя или дробины. Ячмень измельчали в лабораторном гомогенизаторе до состояния порошка. Субстраты смачивали дехлорированной водопроводной водой и дважды автоклавируют при 1,5 атм в течение 30 мин. В подготовленные субстраты вносили культуру *T. viride* в количестве 2 % от массы субстрата [7]. Чашки помещали в термостат и экспонировали в течение 7 сут. при температуре 31 °С, периодически увлажняя субстраты стерильной водой.

При изучении деструкции целлюлозосодержащих отходов дождевыми червями после воздействия на субстраты *T. viride* использовали чашки Петри с солодом и дробинной из предыдущего опыта, частично трансформированными *T. viride*. Перед интродукцией червей часть чашек автоклавируют

ли, чтобы инактивировать культуру микромицета и попытаться ослабить его возможное негативное влияние на дождевых червей. Контрольные чашки оставили без автоклавирования. В каждую чашку помещали по 3 особи половозрелых червей одного размера. На протяжении эксперимента поддерживали оптимальные для жизнедеятельности червей условия (влажность субстратов 80–85 %, температура +20...+25 °С). Контролировали выживаемость червей в субстратах, трансформированных *T. viride*, оценивали визуально.

Полученные результаты статистически обработаны с использованием программы Excel из пакета MS Office 2010. Все эксперименты производили в пяти независимых опытах в трёх параллельных повторностях. Достоверность различия результатов определяли с помощью критерия Стьюдента. Выводы сделаны при $p \leq 0,05$ [2].

Результаты и обсуждение

При культивировании *T. viride* на целлюлозосодержащем субстрате отмечали интенсивный рост мицелия гриба на ячмене и дробине уже на 7-е сутки (рис. 1).

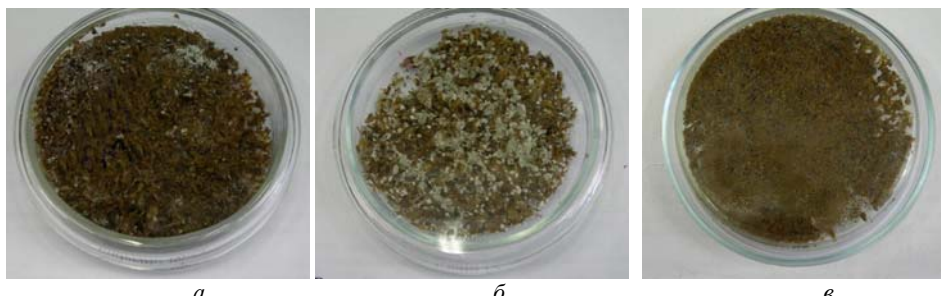


Рис. 1. Рост *T. viride* на дробине: а – на 7-е сут.; б – на 14-е сут.; в – контроль

На 14-е сутки культивирования мицелий гриба полностью обростал поверхность ячменя и дробины (рис. 2). При этом на ячмене *T. viride* рос лучше, чем на дробине.

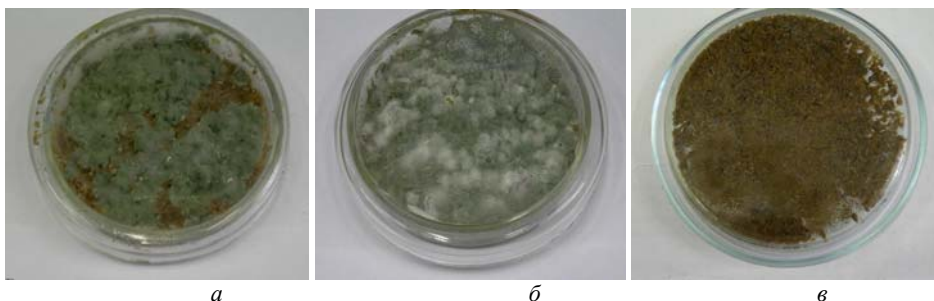


Рис. 2. Рост *T. viride* на ячмене: а – на 7-е сут.; б – на 14-е сут.; в – контроль

Следует отметить, что при экспонировании дождевых червей на солоде, на котором предварительно культивировали *T. viride*, уже через сутки отмечали 100%-ную гибель животных, через 5 сут. черви полностью погибли и на дробине. В варианте с автоклавированными субстратами на солоде черви гибли также через сутки и быстрее на дробине – на 2-е сут.

По результатам исследований для деструкции целлюлозосодержащих отходов с помощью *T. viride* и *E. fetida* рекомендуется предварительное внесение микромицета в суспензии из расчета 2 % от массы субстрата, твёрдофазную ферментацию проводить при температуре 31 °С в течение 14 сут., ферментированные субстраты перед вермитрансформацией не обеззараживать автоклавированием, поскольку полученные результаты говорят о повышении их токсичности для червей в этом случае.

Список литературы

1. Взаимодействие красного калифорнийского гибрида и целлюлозоразрушающего гриба *Trichoderma viride* / В. А. Быбин [и др.] // Проблемы экологии: чтения памяти проф. М. М. Кожова : тез докл. Междунар. науч. конф. (Иркутск, 20–25 сент. 2010 г.). – Иркутск : Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010. – С. 388.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М : Практика, 1999. – 459 с.
3. Зябрева Н. В. Прямая биоконверсия целлюлозосодержащих материалов термофильными анаэробами : дис. ... канд. техн. наук : 03.00.23 / Н. В. Зябрева – М., 2001. – 198 с.
4. Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК / И. В. Соловьева [и др.]. – М., 2004. – С. 55–56.
5. Огарков Б. Н. Биотехнология на основе грибов / Б. Н. Огарков, Г. Р. Огаркова, Л. В. Самусенок. – Иркутск : Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2005. – 235 с.
6. Синицын А. П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов / А. П. Синицын, А. В. Гусаков, В. М. Черноглазов. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
7. Способ получения биогумуса / Н. Н. Терещенко, А. Б. Бубина, Т. В. Юнусова ; заявитель и патентообладатель Гос. науч. учреждение Сиб. науч.-исслед. Ин-та сельского хозяйства и торфа СО Россельхозакадемии. – № 2408563 ; заявл. 27.07.2009 ; опубл. 10.01.2011, Бюл. № 1. – [7 с.].
8. Seven new taxa of *Trichoderma* from Asia / J. Bissett [et al.] // Can. J. Bot., 2003. – Vol. 81. – P. 570–586.
9. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success / I. Druzhinina [et al.] // Nature Reviews Microbiology. – 2011. – Vol. 9. – P. 749–759.

The Study of the Effects of *Trichoderma Viride* on Survival of Earthworms *Eisenia Fetida* in The Process of Transformation of Cellulose-Containing Waste

V. A. Bybin, O. V. Gruznykh, D. I. Stom, B. N. Ogarkov

Irkutsk State University, Irkutsk

Abstract. The paper illustrates the use of system of destructors which are earthworms *Eisenia fetida* and micromycetes *Trichoderma viride* for utilization of the brewing wastes. The impact of *T. viride* on survival of earthworms in the operation of such a system was demonstrated. We previously were received indicating the suppression of the vitality of the earthworms by *Trichoderma* depending on the number and age of the culture inoculated orally to oligochaetes. In the present study worms remained viable when exposed on the lawns of the test-fungus. The decontamination of substrates transformed by *Trichoderma* by autoclaving before introduction of the vermi component influenced negatively on the state of oligochaetes.

Keywords: earthworms, fungi, *Trichoderma*, cellulose, waste disposal.

Быбин Виктор Александрович
кандидат биологических наук
научный сотрудник
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 34-34-37
e-mail: godolin@mail.ru

Bybin Viktor Alexandrovich
Candidate of Sciences (Biology)
Research Scientist
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 34-34-37
e-mail: godolin@mail.ru

Грузных Оксана Васильевна
аспирант
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 34-34-37
e-mail: gruznykh@mail.ru

Gruznykh Oksana Vasiliyevna
Postgraduate
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 34-34-37
e-mail: gruznykh@mail.ru

Стом Дэвард Иосифович
доктор биологических наук, профессор
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 34-34-37
e-mail: stomd@mail.ru

Stom Devard Iosiphovich
Doctor of Sciences (Biology), Professor
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 34-34-37
e-mail: stomd@mail.ru

Огарков Борис Никитович
доктор биологических наук, профессор
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 34-34-37
e-mail: bornik@mail.ru

Ogarkov Boris Nikitovich
Doctor of Sciences (Biology), Professor
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 34-34-37
e-mail: bornik@mail.ru