

## МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИДОВ *TRICHODERMA* ИЗ ПОГРЕБЕННЫХ ПОЧВ

© Р. И. Тухбатова,<sup>1</sup> Ю. А. Морозова, Ф. К. Алимова

Казанский (Приволжский) федеральный университет;

<sup>1</sup> электронный адрес: [resedushka@gmail.com](mailto:resedushka@gmail.com)

Ранее 135 штаммов *Trichoderma*, выделенных из погребенных почв Республики Татарстан, были идентифицированы и отнесены к видам *T. asperellum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. citrinoviride* и *T. longibrachiatum*. На данном этапе был проведен биохимический анализ штаммов с помощью системы Biolog, которая является простым скрининг-тестом и позволяет быстро получить метаболический профиль штаммов на основании 95 субстратов. Выявлено, что каждый вид имеет строго специфичный профиль потребления субстратов. Биохимический анализ позволяет получить большой объем информации, который в дальнейшем можно использовать для оптимизации биотехнологических процессов, в частности подбора эффективных питательных сред.

Ключевые слова: *Trichoderma*, Biolog, метаболический профиль.

*Trichoderma/Hypocrea* — род почвенных, дереворазрушающих грибов, представители которого являются важными продуцентами промышленных ферментов, антибиотиков, используются в сельском хозяйстве как агенты биоконтроля, также могут быть потенциально опасны для людей со сниженным иммунитетом как условные патогены (Druzhinina, Kubicek, 2005). Выделение и изучение новых штаммов *Trichoderma*, перспективных для биотехнологий, является важной задачей (Druzhinina et al., 2012).

Известно, что погребенные почвы являются природными резервуарами сохранения численности и видового разнообразия видов рода *Trichoderma*, где частота их встречаемости составляет более 60 % (Алимова, 2006; Тухбатова, 2008). Ранее из погребенных почв Республики Татарстан нами было выделено и идентифицировано 135 штаммов этих грибов (Тухбатова и др., 2010). Для исследования распространения и идентификации использовались морфологические, молекулярно-генетические и кинетические методы, однако биохимическая активность микроорганизмов практически не рассматривалась.

В этой работе мы рассмотрели возможность использования метода метаболического профилирования для биохимической характеристики ранее выделенных штаммов.

### Материал и методика

Микропланшеты Biolog FF (Biolog, Inc., Хейворд, США), содержащие 95 различных источников углерода, были инокулированы штаммами *Trichoderma* в двух повторях согласно протоколу фирмы-производителя и инкубированы при 28 °С. В таблице указан перечень использованных субстратов. Оптическую плотность в каждой лунке определяли при 490 и 750 нм с помощью мультипланшетного ридера Biolog MicroStation и программного

обеспечения MicroLog по снижению тетразолия фиолетового, который реагирует на окисление субстратов, через каждые 24 ч. Микропланшет оценивался как положительный, если хотя бы в двух лунках OD<sub>490</sub> была выше 0.4 (Verschuere et al., 1997).

Индекс подобия (SIM), коррелирующий с генетической дистанцией (DIS), был рассчитан для каждого штамма и 10 наиболее тесно связанных с ним видов, присутствующих в базе данных. Метаболические профили исследуемых штаммов сравнивали друг с другом и типовыми видами из базы данных с помощью программы для кластерного анализа Biolog UPGMA.

### Результаты и обсуждение

Ранее (Тухбатова и др., 2010) 135 штаммов *Trichoderma*, выделенных из погребенных почв Республики Татарстан, были идентифицированы по комплексу морфологических и молекулярно-генетических признаков и были отнесены к следующим видам — *T. asperellum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. citrinoviride* и *T. longibrachiatum*.

Был проведен биохимический анализ штаммов с помощью системы Biolog (Garland, Mills, 1991), которая является простым скрининг-тестом и позволяет быстро получить метаболический профиль штаммов на основании 95 субстратов. На рис. 1 представлена культура *T. asperellum* через 168 ч инкубирования на микропланшете FF при 28 °С. От скорости потребления субстрата зависит интенсивность окраски в лунке. Анализ роста грибных культур на микропланшетах в динамике позволяет выявить тонкие метаболические различия между тестируемыми штаммами, в частности демонстрируют, на какой стадии роста включается тот или иной субстрат в метаболизм клетки.

Схема расположения субстратов на микропланшетах FF

A1 Water	A2 Tween 80	A3 N-Acetyl-DGalactosamine	A4 N-Acetyl-DGlucosamine	A5 N-Acetyl-DMannosamine	A6 Adonitol	A7 Amygdalin	A8 D-Arabinose	A9 L-Arabinose	A10 D-Arabitol	A11 Arbutin	A12 D-Cellobiose
B1 $\alpha$ -Cyclo-dextrin	B2 $\beta$ -Cyclo-dextrin	B3 Dextrin	B4 i-Erythritol	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 D-Glucosamine	B12 $\alpha$ -D-Glucose
C1 Glucose-1-Phosphate	C2 Glucuronamide	C3 D-Glucuronic Acid	C4 Glycerol	C5 Glycogen	C6 m-Inositol	C7 2-Keto-D-Gluconic Acid	C8 $\alpha$ -D-Lactose	C9 Lactulose	C10 Maltitol	C11 Maltose	C12 Maltotriose
D1 D-Mannitol	D2 D-Mannose	D3 D-Melezitose	D4 D-Melibiose	D5 $\alpha$ -Methyl-DGalactoside	D6 $\beta$ -Methyl-DGalactoside	D7 $\alpha$ -Methyl-DGlucoside	D8 $\beta$ -Methyl-DGlucoside	D9 Palatinose	D10 D-Psicose	D11 D-Raffinose	D12 L-Rhamnose
E1 D-Ribose	E2 Salicin	E3 Sedoheptulosan	E4 D-Sorbitol	E5 L-Sorbose	E6 Stachyose	E7 Sucrose	E8 D-Tagatose	E9 D-Trehalose	E10 Turannose	E11 Xylitol	E12 D-Xylose
F1 $\gamma$ -Aminobutyric Acid	F2 Bromosuccinic Acid	F3 Fumaric Acid	F4 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	F5 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	F6 p-Hydroxyphenylacetic Acid	F7 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	F8 D-Lactic Acid Methyl Ester	F9 L-Lactic Acid	F10 D-Malic Acid	F11 L-Malic Acid	F12 Quinic Acid
G1 D-Saccharic Acid	G2 Sebacic Acid	G3 Succinamic Acid	G4 Succinic Acid	G5 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	G6 N-Acetyl-L-Glutamic Acid	G7 Alaninamide	G8 L-Alanine	G9 L-Alanyl-Glycine	G10 L-Asparagine	G11 L-Aspartic Acid	G12 L-Glutamic Acid
H1 Glycyl-L-Glutamic Acid	H2 L-Ornithine	H3 L-Phenylalanine	H4 L-Proline	H5 L-Pyroglutamic Acid	H6 L-Serine	H7 L-Threonine	H8 2-Amino Ethanol	H9 Putrescine	H10 Adenosine	H11 Uridine	H12 Adenosine-5'-Monophosphate
A1 Water	A2 Tween 80	A3 N-Acetyl-DGalactosamine	A4 N-Acetyl-DGlucosamine	A5 N-Acetyl-DMannosamine	A6 Adonitol	A7 Amygdalin	A8 D-Arabinose	A9 L-Arabinose	A10 D-Arabitol	A11 Arbutin	A12 D-Cellobiose
B1 $\alpha$ -Cyclo-dextrin	B2 $\beta$ -Cyclo-dextrin	B3 Dextrin	B4 i-Erythritol	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 D-Glucosamine	B12 $\alpha$ -D-Glucose
C1 Glucose-1-Phosphate	C2 Glucuronamide	C3 D-Glucuronic Acid	C4 Glycerol	C5 Glycogen	C6 m-Inositol	C7 2-Keto-D-Gluconic Acid	C8 $\alpha$ -D-Lactose	C9 Lactulose	C10 Maltitol	C11 Maltose	C12 Maltotriose
D1 D-Mannitol	D2 D-Mannose	D3 D-Melezitose	D4 D-Melibiose	D5 $\alpha$ -Methyl-DGalactoside	D6 $\beta$ -Methyl-DGalactoside	D7 $\alpha$ -Methyl-DGlucoside	D8 $\beta$ -Methyl-DGlucoside	D9 Palatinose	D10 D-Psicose	D11 D-Raffinose	D12 L-Rhamnose
E1 D-Ribose	E2 Salicin	E3 Sedoheptulosan	E4 D-Sorbitol	E5 L-Sorbose	E6 Stachyose	E7 Sucrose	E8 D-Tagatose	E9 D-Trehalose	E10 Turannose	E11 Xylitol	E12 D-Xylose

F1	$\gamma$ -Amino-butyric Acid	G1	D-Saccharic Acid	H1	Glycyl-L-Glutamic Acid
F2	Bromosuccinic Acid	G2	Sebacic Acid	H2	L-Ornithine
F3	Fumaric Acid	G3	Succinamic Acid	H3	L-Phenylalanine
F4	$\beta$ -Hydroxy-butyric Acid	G4	Succinic Acid	H4	L-Proline
F5	$\gamma$ -Hydroxy-butyric Acid	G5	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	H5	L-Pyroglutamic Acid
F6	p-Hydroxy-phenylacetic Acid	G6	N-Acetyl-L-Glutamic Acid	H6	L-Serine
F7	$\alpha$ -Keto-glutaric Acid	G7	Alaninamide	H7	L-Threonine
F8	D-Lactic Acid Methyl Ester	G8	L-Alanine	H8	2-Amino Ethanol
F9	L-Lactic Acid	G9	L-Alanyl-Glycine	H9	Putrescine
F10	D-Malic Acid	G10	L-Asparagine	H10	Adenosine
F11	L-Malic Acid	G11	L-Aspartic Acid	H11	Uridine
F12	Quinic Acid	G12	L-Glutamic Acid	H12	Adenosine-5-Mono-phosphate

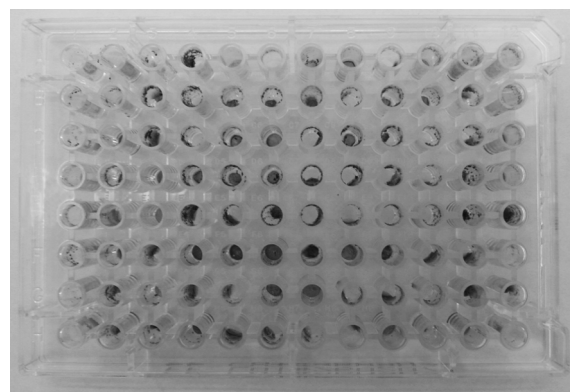


Рис. 1. Рост *Trichoderma asperellum* на микропланшете FF через 168 ч инкубирования при 28 °С.

На рис. 2 представлена сравнительная карта метаболических профилей видов *Trichoderma*, культивированных на микропланшетах FF. Переход от светлого к темному цвету указывает на увеличение интенсивности роста и потребления субстратов. Из карты видно, что каждый вид имеет строго специфичный профиль потребления субстратов. Так, для вида *T. asperellum* характерна пониженная метаболическая активность по сравнению с другими исследованными видами.

На рис. 3 представлена дендрограмма, отражающая взаимосвязь между метаболическими профилями исследованных видов после инкубации в течение 168 ч на микропланшетах FF. Из нее видно, что 7 исследованных видов по биохимической активности делятся на 2 кластера. В первый кластер попали 2 вида — *T. citrinoviride* и *T. longibrachiatum*, относящихся к одной секции *Longibrachiatum*, кладу *Longibrachiatum*. Второй кластер включает в себя 5 видов, которые внутри делятся еще на 4 подкластера. В первый подкластер попали виды *T. atroviride* и *T. hamatum*, относящиеся к одной секции *Trichoderma*, но к разным кладам *Viride* и *Pachybasium «A»* или *Hamatum* соответственно. Остальные виды (*T. asperellum*, *T. harzianum* и *T. viride*) составили три отдельных подкластера. Как показал кластерный анализ, наиболее различающимися по потреблению субстратов оказались виды *T. citrinoviride*/*T. longibrachiatum* и *T. viride*. *T. citrinoviride* и *T. longibrachiatum* в отличие от остальных исследованных видов менее интенсивно потребляют такие соединения, как N-ацетил-глюкозамин, L-арабиноза, D-ксилоза и D-галактоза. Только *T. longibrachiatum* из всех исследованных видов потребляет адонитол, входящий в состав клеточной стенки некоторых растений и грамположительных бактерий.

Таким образом, ранее выделенные секции имеют сходство не только на генетическом уровне, но и на метаболическом по интенсивности потребления субстратов. На основании полученных данных можно определить степень сходства и различия метаболических профилей различных видов *Trichoderma*, классифицировать штаммы. Биохимический анализ позволяет получить большой объем информации, который в дальнейшем можно использовать для оптимизации биотехнологических процессов, в частности подбора состава эффективных питательных сред, предсказания возможных причин сукцессионных изменений в структуре микромикробного сообщества.

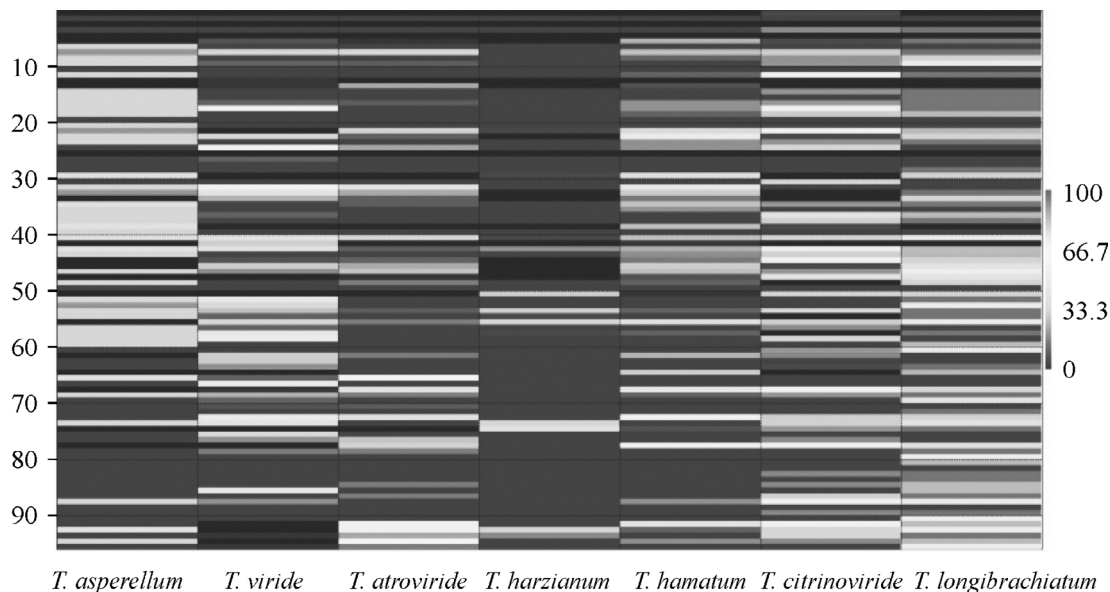


Рис. 2. Сравнительная карта метаболических профилей видов *Trichoderma*, инкубированных на микропланшетах FF. Переход от светлого к темному цвету указывает на увеличение интенсивности роста и потребления субстратов.

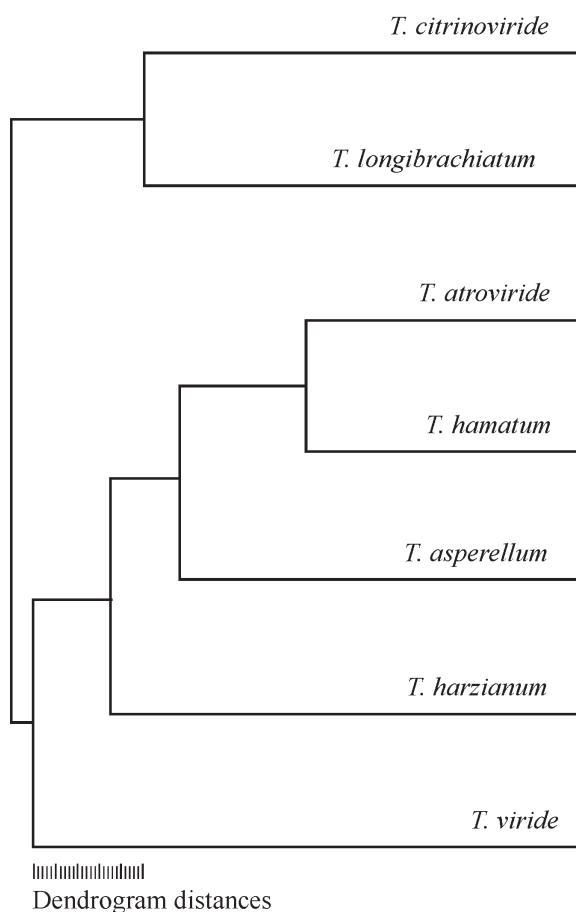


Рис. 3. Дендрограмма, показывающая взаимосвязь между метаболическими профилями исследованных видов после инкубации в течение 168 ч.

Дендрограмма была построена с помощью программы для кластерного анализа Biolog UPGMA.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

#### Список литературы

- Алимова Ф. К. 2006. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. Казань: УНИПРЕСС ДАС. 268 с. (Alimova F. K. 2006. Industrial application of the genus *Trichoderma*. Kazan: UNIPRESS DAS. 268 p.)
- Тухбатова Р. И. 2008. Микробиологическая характеристика археологических памятников на территории Республики Татарстан: Дис. ... канд. биол. наук. Казань. 172 с. (Tukhatova R. I. 2008. Microbiological characteristics of archaeological monuments in Tatarstan: Ph. D. thesis in field of biology. Kazan. 172 p.)
- Тухбатова Р. И., Рафаилова Э. А., Алимова Ф. К. 2010. Видовое разнообразие почвенных грибов рода *Trichoderma* из погребенных черноземов Республики Татарстан. Вестник биотехнол. и физ.-хим. биол. им. Ю. А. Овчинникова. 6 (1): 13—19. (Tukhatova R. I., Rafailova E. A., Alimova F. K. 2010. Biodiversity of soil fungi *Trichoderma* in paleosoils of the Republic of Tatarstan. Bulletin of biotechnology and physico-chemical biology named after Yu. A. Ovchinnikov. 6 (1): 13—19.)
- Druzhinina I., Kubicek C. P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? J. Zhejiang Univ. SCI. 6B (2): 100—112.
- Druzhinina I. S., Shelest E., Kubicek C. P. 2012. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. FEMS Microbiol. Lett. 337: 1—9.
- Garland J. L., Mills A. L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2351—2359.
- Verschuere L., Fievez V., Van Vooren L., Verstraete W. 1997. The contribution of individual populations to the Biolog pattern of model microbial communities. FEMS Microbiol. Ecol. 24: 353—362.

METABOLIC PROFILING FOR CHARACTERISTICS OF *TRICHODERMA* FROM BURIED SOILS

R. I. Tukhbatova, Yu. A. Morozova, F. K. Alimova

Kazan (Volga Region) Federal University;  
e-mail: resedushka@mail.com

Previously, 135 strains of *Trichoderma* isolated from buried soils of Tatarstan have been identified as *T. asperellum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. citrinoviride* and *T. longibrachiatum*. At this stage, the biochemical analysis of the strains was carried out using the Biolog system, which being a simple screening test enables rapid preparation of strains based on 95 substrates. We have revealed that each species has only a specific substrate utilisation profile. Biochemical analysis provides a large amount of information that can then be used for optimization of biotechnological processes, in particular, the selection of effective nutrient media.

Key words: *Trichoderma*, Biolog, metabolic profile.

---