

В.Н. Шевкопляс, Н.В. Вовк В, Т.В. Мезенцева, М.И. Бойко

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАЗИДИОМИЦЕТОВ – РАЗРУШИТЕЛЕЙ ХВОЙНОЙ ДРЕВЕСИНЫ

хвойные базидиомицеты, органическая добавка, физиологические особенности, лигнинолитическая активность

Актуальной проблемой прикладной микологии является поиск и выявление грибов, обладающих высокой физиологической активностью. Такие грибы в дальнейшем могут быть использованы в различных процессах биоконверсии для утилизации отходов сельского хозяйства или промышленного производства [12, 3]. При этом важная роль отводится разработке новых подходов и методов, с помощью которых можно быстро и качественно выявлять высокоэффективные грибы. Поэтому во многих странах мира микологами ведется целенаправленный скрининг дереворазрушающих базидиальных грибов, которые обладают высокими селективными свойствами по отношению к углеродному субстрату [1, 7, 10-11]. В связи с этим, целью нашей работы было определение физиологических особенностей базидиомицетов – разрушителей хвойной древесины и разработка методических приемов по определению лигнинолитической активности изученных грибов методом спектрофотометрии.

В качестве объектов исследования были взяты изоляты хвойных базидиомицетов, собранных в Донецкой области: *Peniophora gigantea*, штамм Д-1-85, *Heterobasidion annosum*, штамм НА-4-96, *Lentinus cyathiformis*, штамм IX, *Fomitopsis pinicola*, штамм III, *Fomitopsis pinicola*, штамм V и *Abortiporus biennis*, штамм I. Характеристика изученных культур приведена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика базидиальных грибов – разрушителей хвойной древесины

№	Вид, номер штамма	Происхождение образца	Природный субстрат	Время сбора, год	Окраска шляпки
1	<i>Peniophora gigantea</i> , Д-1-85	из коллекции ДонНУ	Сосна (пень)	1985	Светло-серая
2	<i>Heterobasidion annosum</i> , НА-4-96	из коллекции ДонНУ	Сосна (корень)	1996	Коричнево-бурая
3	<i>Abortiporus biennis</i> , I	с. Богородичное	Лесная подстилка	2001	Грязно-белая
4	<i>Fomitopsis pinicola</i> , III	с. Богородичное	Сосна (древесина)	2001	Светло-желтая
5	<i>Fomitopsis pinicola</i> , V	с. Богородичное	Сосна (древесина)	2001	Светло-желтая
6	<i>Lentinus cyathiformis</i> IX	Святогорское лесничество	Сосна (пень)	2001	Охристо-коричневая

Культивирование грибов осуществляли в колбах Эрленмейера (емкость 250 мл). Контролем являлась питательная среда, содержащая 50 мл минеральной среды Чапека (г/л): NaNO_3 - 3, KH_2PO_4 - 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl - 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01, глюкоза - 30.

Для установления влияния органической добавки на физиологические показатели базидиомицетов (накопление биомассы, продуцирование внеклеточного белка в среду культивирования, изменение pH), к минеральной среде Чапека (без глюкозы) добавляли таннин, галловую кислоту и гуamat калия в виде 0,1 %-ного раствора. Используемые органические добавки являлись источником углеродного питания для роста базидиомицетов. Приготовленные таким образом искусственные питательные среды и контрольную среду автоклавировали в течение 1 часа под давлением 1,2–1,4 атм. Затем проводили инокуляцию питательной среды культурами указанных базидиомицетов. Культивирование грибов осуществляли в термостате ТС-80М при температуре 26 °C в течение 30-ти суток.

По окончании эксперимента поверхностный мицелий отделяли от культуральной жидкости (КЖ), промывали его дистиллированной водой и помещали в предварительно взвешенные бюксы. Бюксы ставили в сушильный шкаф и высушивали при температуре 105 °C до постоянного веса. Затем определяли массу мицелия по формуле: $m = m_2 - m_1$, где m - масса мицелия (г), m_1 - масса бюкса (г), m_2 - масса бюкса с высушенным мицелием. Концентрацию водородных ионов в приготовленных питательных средах после автоклавирования и в КЖ по окончании эксперимента определяли потенциометрическим методом на приборе pH - 340.

Общее количество внеклеточного белка в КЖ определяли на спектрофотометре СФ - 26 по методике [5], которая основана на способности ароматических аминокислот (триптофан и тирозин) поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом поглощения при длине волны (λ) 260 и 280 нм.

Для выявления ферментов лигнинолитического комплекса за основу были взяты ранее предложенные методики [2, 4]. Данный подход в сочетании с методом спектрофотометрии использовали для определения пероксидазной активности у базидиомицетов при длине волны 405 нм [9]. В ходе эксперимента было показано, что наличие ферментов лигнинолитического комплекса можно определять и методом спектрофотометрии, при длине волны (λ) 380 и 440 нм, что существенно расширяет возможности метода [6]. Об лигнолитической активности изученных грибов судили по изменению оптической плотности (D) КЖ по окончании эксперимента - D_x (D_{380} и D_{440}). В качестве контроля - D_k (D_{380} и D_{440}) служили исходные питательные среды после автоклавирования и без инокуляции. Относительную лигнинолитическую активность (ОЛА), которая одновременно являлась и количественной величиной для изученных грибов, подсчитывали из соотношения: $\text{ОЛА} = \frac{D_x - D_k}{D_x} \cdot 100\%$. Так как исследуемые КЖ являлись высококонцентрированными растворами, то перед определением D_k (контроль) и D_x (экспериментальное) они были предварительно разбавлены в 6 раз. Повторность опытов была трехкратной. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью дисперсионного анализа и сравнения средних величин по критерию Дункана [8].

По результатам исследований, представленных в таблице 2, видно, что на контрольной среде Чапека наибольшей физиологической активностью обладал гриб *L. cyathiformis*, IX. Этот гриб способен накапливать 7,21 г/л грибной биомассы, а также продуцировать в среду культивирования и наибольшее количество внеклеточного белка (2,71 мг/мл). Самой низкой физиологической активностью на контрольной среде Чапека обладал гриб *F. pinicola*, III, который накапливал только 2,76 г/л грибной биомассы и продуцировал 0,70 мг/мл внеклеточного белка. Значение кислотности КЖ по окончании эксперимента у изученных культур варьировало в диапазоне 3,65-4,17 pH. Исключение составили гриб *P. gigantea*, Д-1-85, который наиболее сильно

Таблица 2. Влияние органической добавки (таннина, галловой кислоты и гумата калия) в питательной среде Чапека (глюкоза, 30 г/л) на физиологическую активность базидиомицетов (время опыта – 30 суток, t=26°C)

№	Культура (вид, штамм)	Добавка (0,1 % раствор)	Биомасса, г/л	Внеклеточный белок, мг/мл	рН среды	
			M±m		до	после
1	<i>Heterobasidion annosum</i> , HA-4-96	контроль	5,20±0,36	2,16±0,26	5,48	6,33
		таннин	0,43±0,03	0,33±0,02	5,63	5,78
		галловая кислота	0,43±0,03	0,36±0,01	5,15	5,36
		гумат калия	0,43±0,02	0,36±0,01	7,48	7,71
2	<i>Peniophora gigantea</i> , D-1-85	контроль	5,10±0,94	0,66±0,07	5,48	2,92
		таннин	0,42±0,03	0,31±0,02	5,63	5,91
		галловая кислота	0,42±0,04	0,29±0,03	5,15	5,33
		гумат калия	0,43±0,04	0,13±0,03	7,48	7,73
3	<i>Abortiporus biennis</i> , I	контроль	4,63±0,51	0,90±0,16	5,48	3,80
		таннин	0,42±0,03	0,26±0,02	5,63	5,80
		галловая кислота	0,43±0,04	0,13±0,02	5,15	5,92
		гумат калия	0,42±0,03	0,30±0,02	5,48	7,72
4	<i>Fomitopsis pinicola</i> , III	контроль	2,76±0,34	0,70±0,10	7,48	4,17
		таннин	0,43±0,00	0,35±0,01	5,63	5,56
		галловая кислота	0,43±0,03	0,36±0,02	5,15	5,27
		гумат калия	0,43±0,04	0,26±0,01	7,48	7,79
5	<i>Fomitopsis pinicola</i> , V	контроль	3,63±0,63	0,88±0,17	5,48	3,79
		таннин	0,43±0,02	0,32±0,03	5,63	6,09
		галловая кислота	0,42±0,04	0,29±0,03	5,15	5,27
		гумат калия	0,43±0,03	0,32±0,02	7,48	7,79
6	<i>Lentinus Cyathiformis</i> , IX	контроль	7,21±0,23	2,71±0,36	5,48	3,65
		таннин	0,43±0,02	0,18±0,03	5,63	5,79
		галловая кислота	0,42±0,02	0,15±0,02	5,15	5,35
		гумат калия		0,32±0,02	7,48	7,63

подкислял питательную среду до 2,92 рН и гриб *H. annosum*, HA-4-96, который подщелачивал среду до 6,33 рН по сравнению с начальными значениями рН.

При культивировании грибов на минеральной среде Чапека с органической добавкой способность грибов накапливать биомассу по сравнению с контролем, значительно снижалась. По-видимому, это связано с тем, что при данных условиях эксперимента грибы должны пройти стадию адаптации, чтобы создать соответствующие индуцибельные ферментные системы, обеспечивающие их жизнедеятельность. Это в первую очередь должны быть ферменты лигнинолитического комплекса, которые способны трансформировать органическую добавку. По своей способности накапливать биомассу на такой питательной среде изученные культуры грибов практически не отличались друг от друга (0,42-0,43 г/л). Однако при этом грибы обладали разной способностью продуцировать внеклеточный белок в среду культивирования (0,36-0,31 мг/мл), что, по-видимому, связано с видовой принадлежностью изученных грибов, а также может косвенно судить об их лигнинолитической активности. Величина рН КЖ по окончании эксперимента для всех грибов имела тенденцию к увеличению.

Таблица 3. Относительная лигнинолитическая активность (ОЛА, %) изученных базидиомицетов при культивировании на минеральной среде Чапека с органической добавкой (время опыта – 30 суток, t=26°C)

№	Культура (вид, штамм)	Таннин		Галловая кислота	
		D ₃₈₀	D ₄₄₀	D ₃₈₀	D ₄₄₀
1	<i>Heterobasidion annosum</i> , HA-4-96	63,93	77,14	80,60	83,72
2	<i>Peniophora gigantea</i> , D-1-85	48,84	63,64	60,61	61,11
3	<i>Abortiporus biennis</i> , I	47,62	61,90	59,38	63,16
4	<i>F. pinicola</i> , III	68,12	80,00	82,19	85,71
5	<i>F. pinicola</i> , V	67,65	79,49	76,36	80,80
6	<i>L. cyathiformis</i> , IX	24,14	38,46	58,06	61,11

Так, на минеральной среде Чапека с добавкой таннина наибольшей физиологической активностью обладал гриб *F. pinicola* III, который способен продуцировать в КЖ до 0,35 мг/мл внеклеточного белка. Наименьшее количество внеклеточного белка (0,18 мг/мл) продуцировал гриб *L. cyathiformis*, IX. Как видно, наибольшее значение 6,09 рН на среде с добавкой таннина наблюдалось у гриба *F. pinicola*, V. У остальных изученных культур величина рН на указанной среде изменялась в диапазоне 5,56-5,91 рН. А на минеральной среде Чапека с добавкой галловой кислоты наибольшая физиологическая активность была выявлена у гриба *F. pinicola*, III, который продуцировал в среду 0,36 мг/мл внеклеточного белка. Наименьшая физиологическая активность была отмечена у гриба *A. biennis*, I (0,13 мг/мл). Величина рН на данной среде для всех изученных культур, за исключением гриба *A. biennis* I (5,92 рН), достоверно не отличалась. Как видно из приведенной таблицы, добавление гумата калия в минеральную среду Чапека оказывает положительное влияние на способность всех базидиомицетов продуцировать внеклеточный белок в среду культивирования.

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что изменение величины рН КЖ по окончании эксперимента (во всех вариантах опыта) предполагает наличие в КЖ внеклеточных белков различной природы, в состав которых входят и ферменты лигнинолитического комплекса, способные трансформировать органическую добавку. По-видимому, изменение величины рН по окончании эксперимента также может свидетельствовать о наличии в КЖ продуктов-метаболитов, обладающих кислотными или щелочными свойствами.

Данные по лигнолитической активности изученных базидиомицетов представлены на рисунках 1 и 2 и в таблице 3. Выявлено, что по сравнению с контролем произошло увеличение *D* КЖ. Наибольшей лигнолитической активностью на минеральной среде Чапека с таннином обладали грибы *H. annosum*, HA-4-96, *F. pinicola*, III и *F. pinicola*, V. Из них максимальное значение имеет гриб *F. pinicola*, III ($D_{380} = 0,69$ и $D_{440} = 0,40$). Увеличение D_{380} КЖ по отношению к контролю составляет для вышеназванных грибов 2,8, 3,2 и 3,1 раза, а для D_{440} КЖ – 4,4, 5,0 и 4,8 раза, соответственно. Также видно, что грибы *H. annosum*, HA-4-96, *F. pinicola*, III и *F. pinicola*, V, культивированные на минеральной среде Чапека с галловой кислотой, также обладают наибольшей лигнолитической активностью. По сравнению с контролем *D* КЖ для данных грибов увеличивается в 5,2, 5,6 и 4,3 раза (D_{380}) и 6,2, 7,0 и 5,0 раза (D_{440}), соответственно.

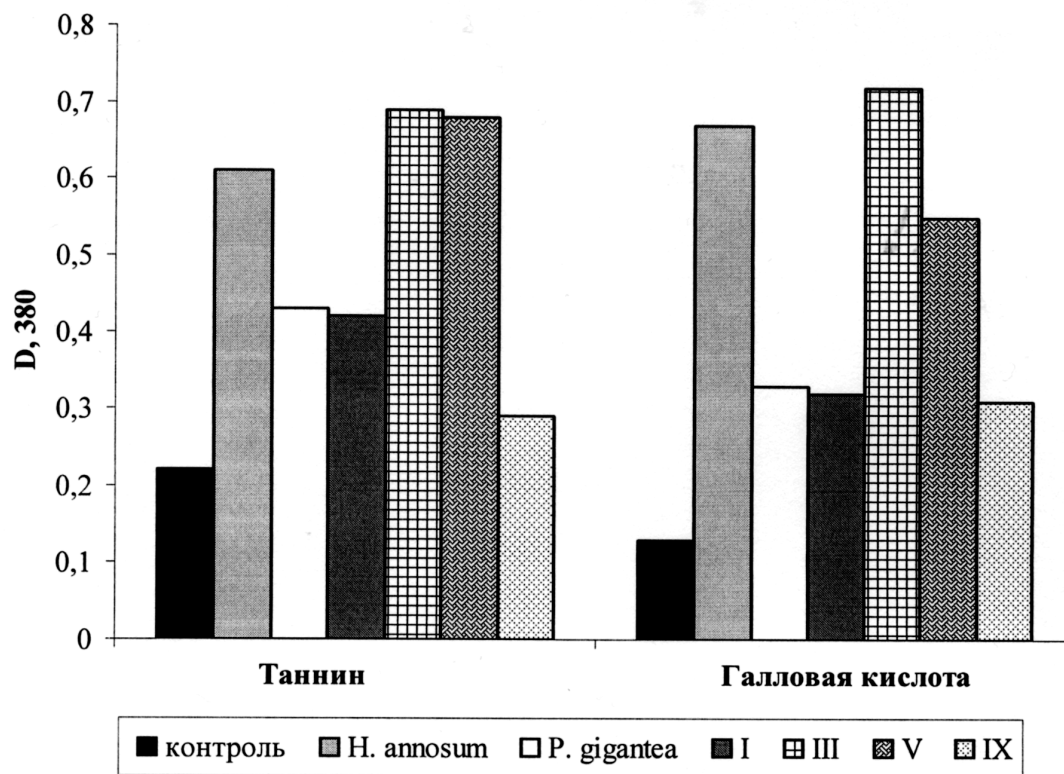


Рис. 1. Влияние добавки таннина или галловой кислоты в минеральной среде Чапека на лигнолитическую активность изученных базидиомицетов (D_{380})

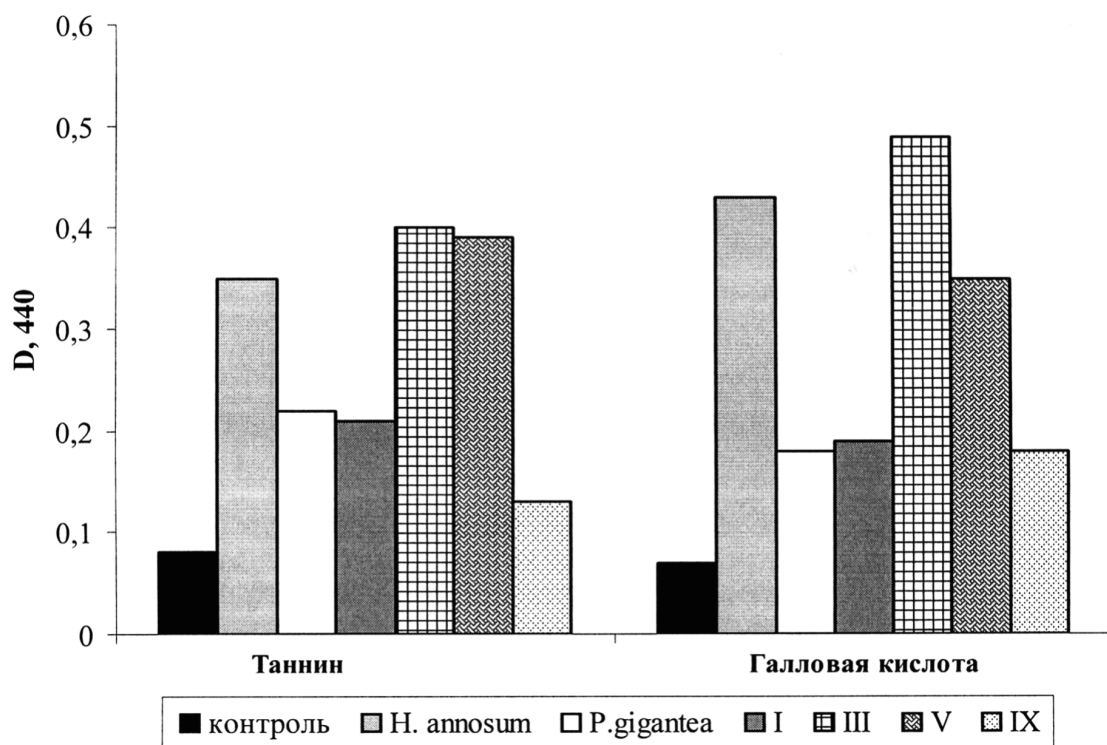


Рис. 2. Влияние добавки таннина или галловой кислоты в минеральной среде Чапека на лигнолитическую активность изученных базидиомицетов (D_{440})

Наименьшую лигнолитическую активность проявлял гриб *L. cyathiformis*, IX – с таннином: $D_{380} = 0,29$ и $D_{440} = 0,13$, а для галловой кислоты: $D_{380} = 0,31$ и $D_{440} = 0,18$. По сравнению с контролем увеличение D КЖ составляло только 1,3 и 1,7 раза, соответственно. Также можно отметить, что D КЖ после культивирования базидиомицетов на минеральной среде Чапека с таннином несколько отличается от D КЖ с галловой кислотой. По-видимому, лигнолитическая активность хвойных базидиомицетов определяется не только их видовой принадлежностью, но и зависит от природы органической добавки. Из этого следует, что все изученные хвойные базидиомицеты содержат ферменты лигнолитического комплекса. Однако, чем выше D КЖ, тем большую лигнолитическую активность проявляют базидиомицеты и, следовательно, они способны в большей степени окислять таннин или галловую кислоту.

Данные по относительной лигнинолитической активности (ОЛА), которые одновременно могут служить и количественной оценкой лигнинолитической активности у изученных базидиомицетов, представлены в таблице 3. Так, например, при длине волны 380 нм наибольшие значения ОЛА имеют грибы *F. pinicola*, III., *F. pinicola*, V и *H. annosum*, HA-4-96: 63,93, 68,12 и 67,65 % (таннин) и 80,60, 82,19 и 76,36 % (галловая кислота), соответственно. Наименьшие значения ОЛА – у гриба *L. cyathiformis* IX – 24,14 % (таннин) и 58,06 % (галловая кислота). Можно предположить, что расхождения по абсолютной величине ОЛА для таннина и галловой кислоты, в первую очередь, определяется способностью базидиомицетов продуцировать специфические ферменты лигнинолитического комплекса в среду культивирования.

Подсчитанный коэффициент корреляции (R) для значений D_{380}/D_{440} (таннин) и для D_{380}/D_{440} (галловая кислота) составил 0,9993 и 0,9982, соответственно, и это подтверждает мнение о том, что диапазон волн 380-440 нм можно использовать для выявления грибов, обладающих высокой лигнинолитической активностью.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. Использование питательной среды Чапека (глюкоза) для культивирования базидиомицетов позволяет выявить грибы, которые обладают наибольшей физиологической активностью (*L. cyathiformis*, IX). При использовании минеральной среды Чапека с органической добавкой (таннин, галловая кислота или гуamat калия) способность грибов накапливать биомассу снижается и колеблется в пределах 0,42-0,43 мг/мл. Однако изученные грибы обладали разной способностью продуцировать в среду культивирования внеклеточный белок, что, по-видимому, связано с таксономической принадлежностью гриба.

2. Показано, что применение метода спектрофотометрии в диапазоне волн 380-440 нм позволяет выявлять грибы, обладающие высокой лигнинолитической активностью (*F. pinicola*, III., *F. pinicola*, V и *H. annosum*, HA-4-96), и которые в дальнейшем могут быть использованы в экспериментах по биоконверсии хвойной древесины. Предложено соотношение:

$$\text{ОЛА} = \frac{D_{\text{э}} - D_{\text{к}}}{D_{\text{э}}} \cdot 100\%$$

с помощью которого можно количественно определять лигнинолитическую активность базидиомицетов.

1. Афанасьева М. М. Отбор и культивирование лигнинразрушающих грибов // Микол. и фитопатол. – 1984. – 18, № 3. – С. 210 – 215.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Мир, 1993. – 272 с.
3. Золотарев Ф. Н., Головина Г. И., Сивочуб О. А. Деградация лигнина базидиомицетами // Микол. и фитопатол. – 1990. – 24, № 1. – С. 38 – 44.
4. Коренман Я.И. Экстракция фенолов. – Горький: Волго-Вятское изд-во, 1973.– 216 с.
5. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высш. шк., 1980. – 272 с.
6. Мезенцева Т.В., Вовк Н.В., Шевкопляс В.Н. Физиологические особенности базидиомицетов-разрушителей хвойной древесины // Матер. юбил. научн. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых, посвящено 180-летию со дня рождения Л.С.Ценковского «Биоразнообразие. Экология. Адаптация» (28 марта–1 апреля). – Одесса: Б.и., 2003. – С.95.

7. *Методы экспериментальной микологии* / И.А.Дудка, С.П.Вассер, И.А.Элланская / Под ред. В.И.Билай. – Киев: Наук. думка, 1982.– 550 с.
8. *Приседський Ю. Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.
9. *Решетникова И.А., Тазарян И.Г., Вережкин А.Н.* и др. Поиск грибов-продуцентов пероксидазы // Микол. и фитопатол. – 1992. – 26, № 5.– С. 383–387.
10. *Свиридова О. В., Михалева Л. В., Воробьев Н. И.* и др. Разрушение коры хвойных деревьев грибами и бактериями // Микол. и фитопатол. – 2001. – 35, № 6. – С. 38 – 47.
11. *Элисашвили В. И.* Биоконверсия растительного сырья высшими базидиомицетами // Микол. и фитопатол. – 1993. – 27, № 6. – С. 83 – 90.
12. *Buswell J. A.* Degradation of lignin // Handbook of Appl. Mycol. V. 1. Soil and Plants. – New York, 1991. – P. 425 – 480.

Донецкий национальный университет

Получено 10.10.2003

УДК 582.287.23:577.158:634

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАЗИДИОМИЦЕТОВ - РАЗРУШИТЕЛЕЙ ХВОЙНОЙ ДРЕВЕСИНЫ
В.Н.Шевкопляс, Н.В.Вовк, Т.В.Мезенцева, М.И.Бойко
Донецкий национальный университет

В работе изучались физиологические особенности и лигнолитическая активность базидиомицетов – разрушителей хвойной древесины. Установлено, что в течение 30 дней роста на питательной среде Чапека (контроль) наибольшую физиологическую активность проявлял гриб *Lentinus cyathiformis*, штамм IX. Показано, что органическая добавка в минеральной среде Чапека снижает способность грибов накапливать биомассу (0,42-0,43 мг/мл). Все изученные грибы обладали разной способностью продуцировать внеклеточный белок в среду культивирования. Для определения лигнолитической активности изученных базидиомицетов был использован метод спектрофотометрии. Установлено, что увеличение оптической плотности (D_{380} и D_{440}) культуральной жидкости (КЖ), по сравнению с контролем, предполагает наличие в КЖ ферментов лигнолитического комплекса. При этом лигнолитическая активность хвойных базидиомицетов определяется не только их видовой принадлежностью, но также зависит и от природы органической добавки. Предложен новый подход для определения количественной характеристики лигнолитической активности базидиомицетов.

UDC 582.287.23:577.158:634

PHYSIOLOGIC PECULIARITIES OF BASIDIOMYCETES DESTROYING CONIFER SOFTWOOD
V.N. Shevkoplyas, N.V. Vovk, T.V. Mezentseva, M.I. Boyko
Donetsk National University

In this work the physiologic features and ligninolytic activity of the basidiomycetes that are the destroyers of the pinewoods have been studied. It is established that the fungi *L. cyathiformis* IX, when is grown for 30 days in the nutrient medium of Czapek's (control) has a most physiological activity. It is shown that the organic addition in the mineral nutrient medium of Czapek's decreases an ability of fungi to accumulate the biomass (0,43-0,42 mg/ml), but all fungi studied had different ability to produce extracellular proteins in the nutrient medium. The spectrophotometry method to define ligninolytic activity of the studied basidiomycetes has been used. It is shown that the increase of the optical density (D_{380} and D_{440}) in the cultural liquid against control nutrient medium presupposes that ligninolytic ferments in the CL are available. But the ligninolytic activity of conifer affecting is determined not only by their appertaining to certain species but also depends upon the nature of the organic addition. A new approach for determining quantitative characteristic of ligninolytic activity of basidiomycetes has been proposed.