

## ГИФОМИЦЕТЫ ЛЕСНОЙ ПОДСТИЛКИ В ЧИСТЫХ БЕРЕЗОВЫХ НАСАЖДЕНИЯХ И ИХ ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ.

Негребецкая Э.Н.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина*

Пероксидаза [КФ 1.11.1.7] играет большую роль в окислительно-восстановительных процессах самых различных биологических систем, а также находит применение в аналитической химии, в пищевой, химической и легкой промышленности, в медицине – для проведения анализов, лечения проказы [1-5,10]. Однако широкое ее использование ограничивается все еще высокой стоимостью очищенных препаратов. Микроскопические грибы как продуценты пероксидазы (П) изучены недостаточно. Но именно они являются максимально пригодными для использования в ферментном производстве, ибо уже зарекомендовали себя как надежные и экономически выгодные продуценты многих биологически активных веществ, и ферментов в частности. По данным литературы, в равнинных лесах, лесах Карпат и Крыма опавшие листья и хвоя создают максимально благоприятные условия для развития П-образующих грибов. Причем на опавших листьях процент П-образующих штаммов постоянно выше, чем на хвое. Известно также, что общая ферментативная активность темноцветных гифомицетов, выделенных с опавших листьев и хвои значительно выше, чем светлоокрашенных [6-8,13]. Задачей исследований было изучение гифомицетов свежего опада лесной подстилки в чистых березовых насаждениях (ЧБН) и проведение первичного отбора активных продуцентов фермента пероксидазы.

### **Материалы и методы:**

Объектами исследования служили опавшие листья березы (*Betula verrucosa* Ehrh) лесной подстилки ЧБН. Пробы отбирали в XI мес. (свежий опад) в Хотовском лесничестве Боярской ЛОС, где влияние антропогенного фактора минимально, по горизонтам L, F и H (по Гессельману) на различной глубине от поверхности. Для выделения специфической микрофлоры использовался метод накопительной культуры [9], все образцы подвергали трехкратному мезоскопическому анализу. Гифомицеты выделяли непосредственно с субстрата с последующей их очисткой и идентификацией. Препараты для микроскопии готовили стандартным методом. Для определения пероксидазной активности чистые культуры микромицетов высевались на модифицированную морковную среду. Активность фермента в культуральной жидкости определяли в динамике с 5 по 25 день культивирования с интервалами в 5 дней *o*-толидиновым методом Лукомской И.С., Городецкого В.К. в модификации [12]. Для характеристики микрофлоры березового опада использованы индексы количественного учета микромицетов: ОВ – общая встречаемость и КОЗ – коэффициент общего заселения подстилки [8, 11].

### Результаты и обсуждение.

Идентификация выделенных культур гифомицетов позволила отнести их в основном к 13 родам класса *Hyphomycetes* подотдела *Deuteromycotina* (по Ainsworth, 1971). Большинство из них принадлежали к родам *Acremonium*, *Alternaria*, *Arthrobotrys*, *Candelabrella*, *Chalara*, *Cladosporium*, *Dactillela*, *Penicillium*, *Ramichloridium*, *Spadicesporium*, *Sphaeridium* – пор. *Moniliales*, *Fungi imperfecti*. Исключение составляют выделенные с этого же субстрата грибы рода *Mortierella*, принадлежащие к пор. *Mucorales*, кл. *Phycomycetes*. Для сравнительной оценки исследуемой подстилки с другими субстратами была выделена флористически характерная комбинация гифомицетов из 12 родов, наиболее распространенных в данном экотопе. Наиболее представленный род *Cladosporium* также имел свою флористическую характеристику (данные не приводятся). Общая заселенность подстилки грибами характеризовалась КОЗ(%), полученные результаты представлены на рис.1.

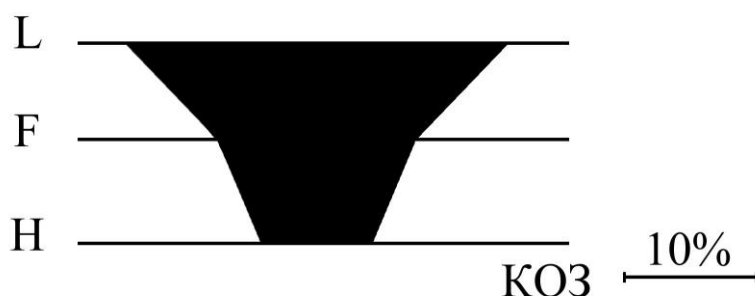


Рис.1. Общая заселенность гифомицетами лесной подстилки в чистых березовых насаждениях.

Верхний горизонт подстилки L был наиболее заселенным грибами (КОЗ(%)=26,1). По мере удаления от поверхности показатели уменьшались (КОЗ(%)=15,3 для горизонта F), доходя до минимальных значений в горизонте H (КОЗ(%)=7,7). Большинство из выделенных нами гифомицетов были темноцветными – 68,8%. Среди них преобладали грибы рода *Cladosporium* и *Alternaria*, которые можно считать наиболее характерными представителями грибной флоры березового опада. Эти результаты подтверждаются данными литературы. Наблюдается также приуроченность микромицетов этих двух родов к верхним горизонтам подстилки. Представленность темноцветных гифомицетов в горизонте H была минимальной. При переходе от одного горизонта к другому наблюдалось не только количественное изменение численности грибов, но и качественное изменение грибных ассоциаций, населяющих березовую подстилку. Определив величину встречаемости для каждого из вышеназванных родов гифомицетов, наблюдали их сукцессию по горизонтам подстилки L, F и H (рис.2).

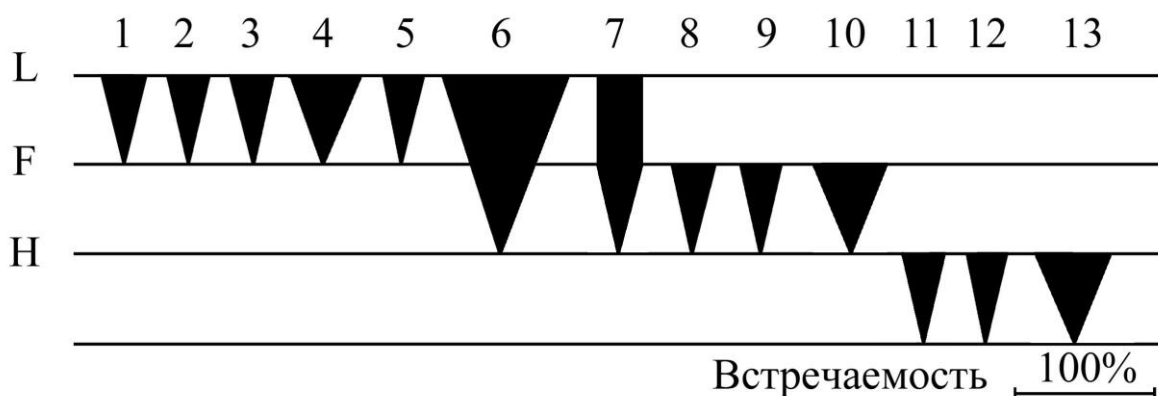


Рис.2. Сукцессиональные структуры гифомицетов лесной подстилки в чистых березовых насаждениях.

1 – *Ramichloridium*, 2 – *Spadicesporium*, 3 – *Sphaeridium*, 4 – Sp. (нет спороношения), 5 – *Chalara*, 6 – *Cladicesporium*, 7 – *Alternaria*, 8 – *Arthrobotrys*, 9 – *Dactillela*, 10 – *Mortierella*, 11 – *Acremonium*, 12 – *Candelabrella*, 13 – *Penicillium*

Для каждого горизонта была характерна своя специфическая микофлора. Так, если грибы родов *Cladosporium* и *Alternaria* встречались в двух верхних горизонтах подстилки – L и F, то другие выделенные гифомицеты встречались только в одном из трех горизонтов. Например, грибы родов: *Ramichloridium*, *Spadicesporium*, *Sphaeridium*, *Chalara* и род Sp. были отмечены только в горизонте L, а грибы родов: *Penicillium*, *Acremonium* и *Candelabrella* – только в H-горизонте. В опыт по изучению П-образующей активности были взяты выделенные из субстрата гифомицеты – и темноцветные, и светлоокрашенные. П-образующие штаммы составляли 46,9% испытанных культур. Ферментативно активных культур было больше среди темноцветных гифомицетов, чем среди светлоокрашенных, что не противоречит литературным данным [13]. В наших исследованиях у представителей родов *Cladosporium* и *Alternaria* было отмечено ферментативно активных штаммов 43,8% и 9,9% соответственно. Впервые нами была показана П-образующая активность у грибов *Chalara cylindrospermum* и *Sphaeridium* sp., выделенных из свежего опада в ЧБН. По литературным данным, эти П-образующие грибы были выделены из свежего опада (L гор., XI мес.) соответственно: первый штамм – в Карпатах, ель; второй – окрестности Киева, сосна [8]. Величина П-активности гифомицетов изменялась в зависимости от горизонта подстилки. От 52,6% в горизонте L она уменьшалась в 2,4 раза в F – и практически отсутствовала в H-горизонте. Сопоставляя и интегрируя показатели, полученные в тестах общей заселенности, сукцессиональных структур и ферментативной активности гифомицетов, выявленные тенденции по П-образованию в ЧБН можно объяснить тем, что свежее опадавшие листья содержат многие токсические вещества (таннин, полифенолы и тп), и, таким образом, не доступны для банальной микрофлоры. Вследствии этого на таком субстрате первыми развиваются преимущественно организмы с сильным ферментативным аппаратом, в том числе, П-образующие грибы. По мере разложения подстилки и превращения веществ в ней содержащихся, происходит

уменьшение токсичности субстрата. Он становится доступным широкому кругу микроорганизмов, количество же П-образующих грибов в этот период уменьшается. Полученные результаты не противоречат данным литературы. Однако при констатации падения КОЗ лесной подстилки ЧБН, нами опытным путем не была подтверждена обратная зависимость между общим количеством выделенных грибов и числом активных штаммов, наблюдаемая другими авторами для лесной подстилки других видов [12,13]. Для этого потребуется проведение дополнительных исследований, которыми бы был охвачен весь процесс разложения подстилки ЧБН в целом (ноябрь – апрель – июль).

#### **Выводы.**

1. Для каждого горизонта березовой подстилки была характерна своя специфическая микофлора. Максимальная встречаемость грибов родов *Cladosporium* и *Alternaria* является характерной чертой данного экотопа.
2. Для верхнего горизонта L подстилки в ЧБН была отмечена наибольшая заселенность и максимум П-образующей активности микромицетов, большинство из которых были темноцветными.
3. Больше количество продуцентов П было обнаружено среди темноцветных гифомицетов. Наиболее активными продуцентами были представители родов: *Alternaria*, *Chalara*, *Cladosporium*, *Ramichloridium*, *Sphaeridium* и род *Sp.* Из них отобраны штаммы – активные продуценты П для дальнейших исследований.

#### **Литература.**

1. Blinkovsky A.M., Mceldoon J.P., Arnold I.M. et al. Peroxidase-catalysed polymerization and depolymerization of coal in organic solvents. // *Appl. Biochem. and Biotechnol. A* – 1994. – 49,N2. – P. 153 – 164.
2. Weright J.D., Rawson K.M., Ho W.O. et al. Specific binding assay for biotin based on enzyme channeling with direct electron transfer electrochemical detection using horse-radish peroxidase // *Biosens. and Bioelectron.* – 1995. – 10,N5. – P. 495 – 500.
3. New enzymes for vine production (Review) // *Applied Genetics News* – 1994. – 14,N8.
4. Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Белкова Н.В. и др. Тест-метод определения ртути на уровне ПДК и использованием пероксидазы, иммобилизированной на бумаге. // *Ж. Аналит. Химии.* – 1995. – 50,№5. – С. 538 – 542.
5. II International Chemical Summit. Moscow, April 2005.
6. Борисова В.Н. Сукцессии гифомицетов в лесной подстилке и их значение в процессах деструкции. // В кн: *Разложение растительных остатков в почве.* М.:Наука, 1985.- С. 74 – 90.
7. Микромицеты почв (под ред. Билай В.И.). К.:Наук. думка, 1984. – С.155 – 180.

8. Борисова В.Н. Гифомицеты лесной подстилки в различных экосистемах. К.:Наук. думка, 1968. – 252 с.
9. Пидопличко Н.М. Грибная флора грубых кормов. К.:изд-во АН УССР, 1953. – 485 с.
- 10.Гудкова Л.В., Дегтярь Р.Т. Метод определения активности пероксидазы. // В кн. Ферменты в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. К.:Наук. думка, 1968. – С. 172 – 173.
- 11.Методы экспериментальной микологии. К.:Наук. думка, 1982. – 550 с.
- 12.Пидопличко Н.М., Борисова В.Н., Элланская И.А. О пероксидазе у микромицетов. // В кн: Экспериментальная микология. – К.:Наук. думка, 1968. – С. 56 – 64.
- 13.Борисова В.Н.,Двойнос Л.М., Лизак Ю.В. Пероксидазная и целлюлазная активность микрофлоры опавших листьев и хвои в лесах СССР. // В кн. Биологические повреждения строительных и промышленных материалов. – К.:Наук. думка, 1978. – С. 202 – 204.