

УДК 579.226 (045)

АНАЛІЗ ПАТОГЕННОГО ВПЛИВУ ЦЕЛЮЛАЗ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM* НА ЦЕЛЮЛОЗОВМІСНІ МАТЕРІАЛИ

В. М. ВОСТРИКОВА

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Визначено діапазон температур, за якого целюлазна активність грибів роду *Fusarium* є мінімальною. На основі отриманих даних запропоновано здійснювати конкретні заходи для попередження біодеструкції целюлозовмісних матеріалів, які будуть інгібувати целюлази мікроскопічних патогенних грибів на стадії їх мінімальної активності.*

***Ключові слова:** мікроміцети, гриби роду *Fusarium*, фактори патогенності, целюлолітичні ферменти, целюлазна активність, відновлюючі цукри.*

Вступ. Патогенні гриби складають численну групу мікроорганізмів, їх описано понад 20 000 видів, різних за систематичним положенням, ступенем паразитизму та спеціалізації.

Патогенність як особлива властивість багатьох видів мікроскопічних грибів проявляється в «агресивній» та токсичній дії на різні живі та неживі об'єкти. Відомо, що факторами мікопошкоджень різноманітних матеріалів, є не стільки сам грибний міцелій, скільки «агресивні» продукти його метаболізму, до яких належать органічні кислоти, гідролітичні ферменти, пігменти і токсини.

Гриби роду *Fusarium* широко розповсюджені в природі. Мікроміцети цього роду, як і інші мікроскопічні гриби, беруть участь у загальному кругообігу речовин у природі [2].

Рід *Fusarium* в цілому представляє широку неоднорідну групу грибів. Серед них є і досить виражені паразити рослин, і групи напівпаразитів, які

здатні вражати лише ослаблені організми, і, нарешті, сапрофіти, які живуть на рослинних залишках, у ґрунті та на відмерлих частинах рослин.

Мікроміцети роду *Fusarium* як і всі інші мікроскопічні гриби мають здатність накопичувати та виділяти біологічно-активні речовини. Більшість з цих речовин є агресивними як для оточуючого середовища, так і для промислових матеріалів, які винайшла людина [3].

Середнє значення кількості агресивних метаболітів мікроскопічних грибів роду *Fusarium* наступне: 51 % припадає на токсини, 23 – на ферменти, 16,5 становлять пігменти, і, нарешті, 9,5 – органічні кислоти. Провідну роль в патогенезі грибів відіграють ферменти. До основних ферментів мікроскопічних грибів роду *Fusarium* належать: протеази, ксиланази, α -амілази, целюлази, пектинази, геміцелюлази [5].

Важливе місце в групі ферментів належить ферменту целюлазі. Саме завдяки целюлазі гриб може легко адсорбуватися та розвиватися на целюлозі (один з найпоширеніших полімерів на Землі) і таким чином руйнувати її. Тому важливим є питання вивчення механізму дії целюлаз та попередження негативного впливу даного ферменту на целюлозовмісну сировину.

З 60-х років ХХ століття науковці почали ретельно вивчати та досліджувати целюлазні комплекси мікроорганізмів. Про це свідчать роботи Білай В.І, Клесова А.А, Кретовича В.Л., Лізака В.І. В цих роботах представлена детальна характеристика будови та властивостей целюлаз мікроорганізмів (бактерій та пліснявих грибів) [2].

З 80-х років целюлозолітичні ферменти різноманітних мікроорганізмів почали використовувати у промисловості. Це призвело до пошуку штамів мікроорганізмів з найбільш високою целюлазною активністю. Результати такого пошуку представлені в працях Осадчої А.І., Рабіновича В.Л., Сініцина А.П, Терехова В.А., Білай В.І. [1].

Авторами встановлено механізм дії целюлаз мікроорганізмів на целюлозовмісні об'єкти [4]. Загальна схема, що відображає механізм

гідролізу целюлози поліферментним целюлазним комплексом, представлена на рис.1.

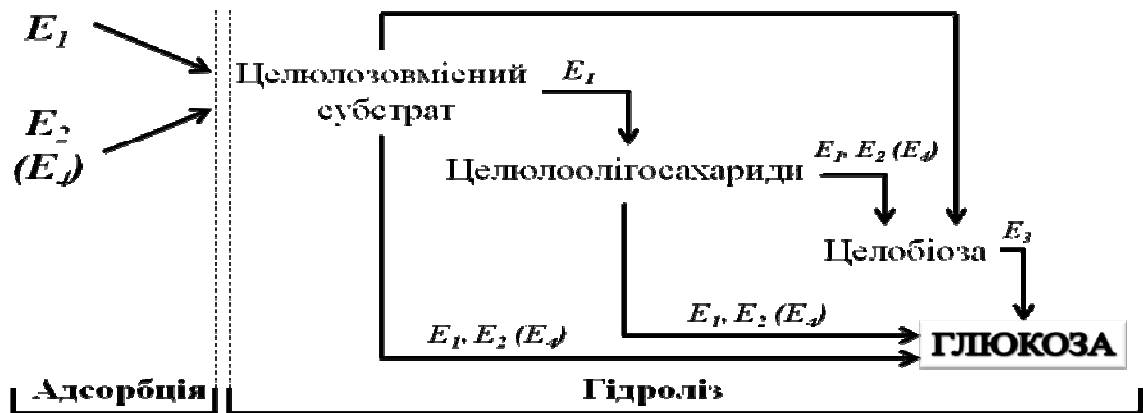


Рис.1. Механізм ферментативного гідролізу целюлози до глюкози, де E_1 – ендоглюконаза; E_2 – целобіогідролаза; E_3 – β -глюкозидаза (целобіаза); E_4 – екзоглюкозидаза

Практично відсутні роботи щодо вивчення негативного впливу целюлаз мікроскопічних грибів на рослини, деревні матеріали та паперову сировину. Спори гриба роду *Fusarium* в основному переносяться повітряними масами, водою, комахами, знаряддями праці, що призводить до його широкого розповсюдження в навколишньому середовищі. Завдяки целюлазі, яка здатна розкладати різну целюлозовмісну сировину, гриб може легко розвиватися на будь-яких матеріалах та об'єктах, які в своєму складі містять целюлозу. Тому постає проблема визначення ролі даного патогенного гриба в біодеструкції целюлозовмісних об'єктів.

Мета роботи – оцінка впливу температури на целюлазну активність грибів роду *Fusarium*.

Для досягнення мети необхідно було показати особливе місце целюлази в процесах біодеструкції целюлозовмісних матеріалів, визначити вплив температури на активність целюлазного комплексу грибів роду *Fusarium*, розробити рекомендації щодо оптимальних температур проведення заходів для захисту рослин та паперової сировини.

Матеріали та методи досліджень. Активність целюлазного комплексу грибів роду *Fusarium* визначали методом Шомоді-Нельсона [6], який є одним з найточніших методів визначення загальної целюлазної активності. Метод базується на реакції відновлення іонів двовалентної міді альдегідною групою цукрів у лужному середовищі до окису міді, яка потім кількісно відновлюється арсеномолібденовим реактивом (розчин Нельсона, рН = 1,7) до стійкості протягом тривалого часу молібденової «синьки». Чутливість методу знаходиться у межах 1 – 5 мкг цукрів. Різні цукри відновлюють мідь з різною швидкістю. Для відновлення глюкози необхідно кип'ятити пробу протягом 10 хв, галактози – 15 хв, манози – 30 хв. Для стандартизації методу обробку проби кип'ятінням здійснювали протягом 45 хв [7].

Об'єктом дослідження обрано гриби роду *Fusarium*, які належать до класу *Deuteromycetes* порядку *Hyphomycetales*.

Гриби культивували на поживному середовищі Чапека наступного складу (г/л): NaNO_3 – 3; K_2HPO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 [6].

Середовище готували в стерильних конічних колбах. В якості джерела вуглецю при культивуванні використовували карбоксиметилцелюлозу (0,5%). Готове середовище стерилізували в автоклаві за тиску 1 атм протягом 30 хв.

Культивування мікроміцетів проводили глибинним способом у флаконах на 200 мл з 50 мл поживного середовища. Культуру гриба вирощували за різних температур у діапазоні а саме: 15 – 35 °С. Термін культивування складав 10 діб. Дослід проводили в трьох повторностях.

Після культивування культуральну рідину відфільтровували та використовували для визначення целюлолітичної активності мікроскопічних грибів. Целюлолітична активність прямопропорційна концентрації глюкози в кожному фільтраті.

Визначення цукрів проводили на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм. Для визначення цукрів готували дослідний розчин. Для цього відбирали 1 см³ фільтрату кожної проби, додавали 1 см³ реактиву Шомоді та

кип'ятили 15 хв на водяній бані. Потім суміш швидко охолоджували на льодяній бані. До 2 см³ цієї суміші додавали 1 см³ реактиву Нельсона та доводили об'єм дистильованою водою до 10 см³, розчин добре перемішували. Контролем слугували дослідні зразки, де замість культуральної рідини додавали 1 см³ дистильованої води.

До 2 см³ суміші додавали 1 см³ реактиву Нельсона та доводили об'єм дистильованою водою до 10 см³. Розчин добре перемішували. На фотоеклектроколориметрі вимірювали оптичну густину кожного з отриманих розчинів тричі.

Кількість цукрів визначали за рівнянням калібрувальної кривої, побудованою за стандартними розчинами глюкози.

Результати та їх обговорення досліджень. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартні розчини глюкози наступних концентрацій 0,0025 – 0,1 % (рис. 2).

Синій колір стандартних розчинів глюкози свідчить про те, що пройшла потрібна реакція відновлення двовалентної міді альдегідною групою цукрів (глюкози), яка згодом кількісно відновлювала арсенмолібденовий реактив до молібденової «синьки».

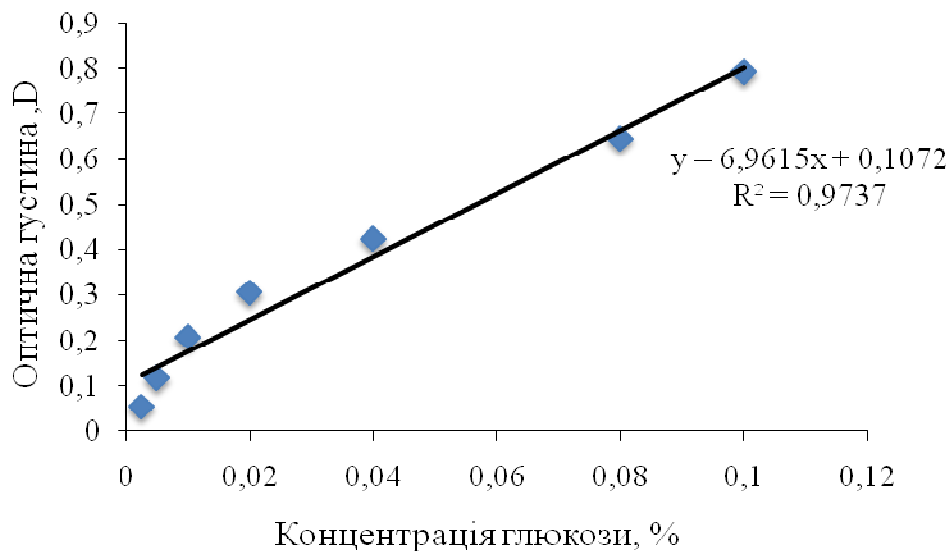


Рис. 2. Калібрувальний графік за стандартними розчинами глюкози

Отриманий калібрувальний графік показує чітку залежність між концентраціями стандартних розчинів глюкози та оптичною густиною.

На основі отриманих даних побудували лінію тренда та отримали відповідне рівняння:

$$D = 6,9615 \cdot C + 0,1072 \quad (1)$$

де D – оптична густина розчину,

C – концентрація глюкози в розчині.

За цим рівнянням знаходили невідомі концентрації глюкози в дослідних зразках фільтрату культуральної рідини. Отримані дані представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Залежність целюлазної активності мікроміцетів роду *Fusarium* від температури (за концентрацією глюкози)

Температура, °C	Концентрація глюкози, %
15	0,018±0,004
20	0,025±0,002
25	0,041±0,001
30	0,051±0,009
35	0,004±0,002

В результаті проведених досліджень нами визначено залежність целюлазної активності мікроскопічних грибів роду *Fusarium* від температури (рис. 3).

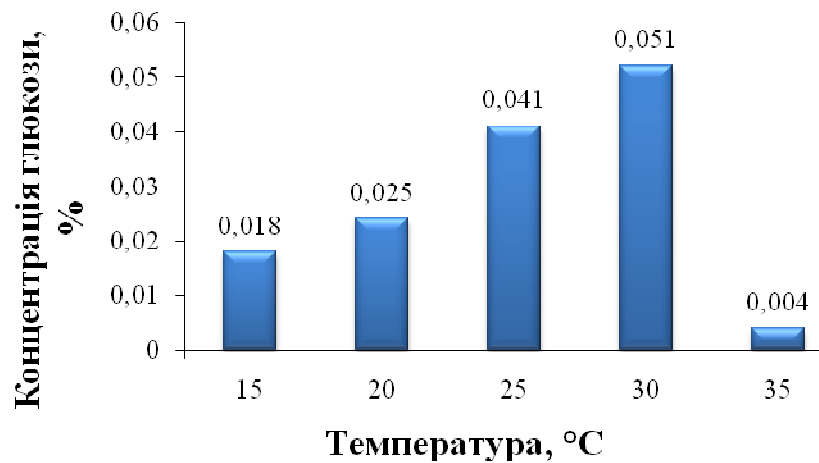


Рис. 3. Залежність целюлазної активності грибів роду *Fusarium* від температури

Узагальнюючи отримані результати, слід відзначити, що активність целюлазного комплексу мікроскопічних грибів роду *Fusarium* залежить від температури.

Нами встановлено, що найвища целюлазна активність простежується за температури 30 °C і становить за концентрацією глюкози 0,051 %. Найменша – при 35 °C і становить 0,0004 % за концентрацією глюкози. Целюлазна активність дещо близька за значеннями в діапазоні температур 15 – 20 °C (концентрація глюкози 0,018 – 0,025 %).

ВИСНОВКИ

1. Визначено вплив температури на активність целюлази грибів роду *Fusarium*. Встановлено, що максимальна активність ферменту проявляється за температури 30 °C, а мінімальна – при 15 – 20 °C.

2. На основі отриманих даних пропонується здійснювати заходи для попередження біодеструкції целюлозовмісних матеріалів у діапазоні температур від 15 – 20 °C, за яких активність ферментів є мінімальною. До таких заходів можна віднести:

- ✓ застосування біофунгіцидних препаратів в діапазоні температур від 15 до 20°C для попередження біодеструкції рослинних об'єктів;

- ✓ підтримка постійної температури (15 – 20 °С) в книгосховищах для мінімізації біопошкоджень паперової сировини целюлозами мікроскопічних грибів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Билай В. И. Целлюлолитические свойства плесневых грибов и принципы отбора активных продуцентов целлюлаз / Билай В. И. Пидопличко Н. М., Тарадий Г. В. // Ферментное расщепление целлюлозы. – М.: Наука, 1967. – С. 37–45.
2. Клесов А. А. Ферментативный гидролиз целлюлозы / Клесов А. А., Рабинович М. Л. // Биологическая химия. Итоги науки и техники. – М., 1982. – Т. 8, № 11. – С. 1490–1496.
3. Курченко І. М. Порівняльне вивчення целюлазної та ксиланазної активностей у фітопатогенних та ендofітних штамів грибів *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler / Курченко І. М., Соколова О. В., Жданова Н. М. // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 4. – С. 25–30.
4. Курченко І. М. Целюлазна та ксиланазна активності грибів роду *Fusarium* Lk : Fr., що належать до різних трофічних груп / Курченко І. М., Соколова О. В., Жданова Н. М. // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 5. – С. 27–35.
5. Новицкая А. В. Грибы как биодеструкторы библиотечного фонда и их влияние на здоровье человека / Новицкая А. В., Вьючнова Н. В., Липницкий А. В. // Успехи медицинской микологии. – М.: Нац. Акад. Микологии, 2007. – Т. 9. – С. 66–68.
6. Скрининг штаммов бактерий с высокой целлюлазной активностью / [Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М.] // Микробиол. журн. – 2009. – 77, № 5. – С. 41–48.
7. Сеницин А. П. Изучения синергизма в действии ферментов целлюлазного комплекса / Сеницин А. П., Митькевич О. В. // Биотехнология. – 1987. – №1. – С. 39–46.

***Анализ патогенного влияния целлюлаз грибов рода *Fusarium* на
целлюлозосодержащие материалы***

В. Н. ВОСТРИКОВА

Национальный авиационный университет, г. Киев

*Определен диапазон температур, при котором целлюлазная активность грибов рода *Fusarium* является минимальной. На основе полученных данных предложено осуществлять конкретные меры для предупреждения биодеструкции целлюлозосодержащих материалов, которые будут ингибировать целлюлазы микроскопических патогенных грибов на стадии их минимальной активности.*

Ключевые слова: *микровицеты, грибы рода *Fusarium*, факторы патогенности, целлюлолитические ферменты, целлюлазная активность, восстанавливающие сахара.*

***Analysis of pathogenic influence cellulases of fungi of *Fusarium* genus on
cellulose materials***

V. M. VOSTRIKOVA

National aviation university, Kyiv

*The range of temperatures, at which cellulase activity of fungi of *Fusarium* genus is minimum, is certain. On the basis of finding it is suggested to carry out concrete measures for warning of biodegradation of cellulose materials which will inhibit cellulases of pathogenic microfunguss on the stage of their minimum activity.*

Key words: *micromycetes, fungi of *Fusarium* genus, factors of pathogenicity, cellulolytic enzymes, cellulase activity, evocative sugar.*