

Институт Биохимии и Биотехнологии им. С. Дурмишидзе

на правах рукописи

Марина Ласхишвили

Галофильные микроскопические грибы распространенные в солончаках Грузии

03.00.07.-Микробиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

Диссертации, представленной на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Тбилиси
2006

Работа выполнена в Институте Биохимии и Биотехнологии им. С. Дурмишидзе

Научные руководители:

Георгий Квеситадзе,

Доктор биологических наук

Лали Кутателадзе

Кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Додо Патарая

Доктор биологических наук
03.00.07.

Земфира Алавидзе

Доктор медицинских наук
03.00.07.

Защита диссертации состоится «.....»2006 года в.....часов
на заседании диссертационного совета В 03.04 №1 Института биохимии и
биотехнологии им. С. Дурмишидзе

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Биохимии и
Биотехнологии им. С. Дурмишидзе

Адрес 0159, Тбилиси, аллея Давида Агмашенебели 10^{ий} км

Автореферат разослан «.....»..... 2006 года

Ученый секретарь диссертационного совета.
кандидат биологических наук

/Н Шенгелиа/

Актуальность проблемы:

Галофилы – древнейшие обитатели нашей планеты – являются «формами живущими на грани физиологической возможности». Благодаря сформировавшейся сильной антиоксидантной и высокоэффективной окислительной системам группа данных микроорганизмов приспособилась к существованию в крайне экстремальных условиях среды. Основанный на свойствах цитоплазматической мембраны сложный внутриклеточный механизм регуляции, позволяет галофилам быстро адаптироваться к изменениям солености среды: в природе они практически не имеют ни конкурента, ни антагониста, поскольку ни одна из иных жизненных форм не способна к существованию в условиях высокой концентрации солей. Устойчивость к повреждающим факторам, уникальный химический состав, богатый биопотенциал и непатогенность определяют перспективность включения галофилов в биотехнологический процесс (Владимиров Ю., 1998). Клетку солелюбивого организма можно рассматривать как «живую биологическую лабораторию», которая дает возможность получить одновременно несколько ценных коммерческих продуктов (нуклеиновые кислоты, витамины, белки, различные ферменты, каротины, липиды, глицерин и т.д.). Синтезированный галофилами бетаин и эктоин защищают живые клетки и биологические молекулы от агрессивного воздействия среды (обморожения-оттаивания, высыхания и т. д.). Эти соединения одновременно являются стабилизаторами целого ряда дорогостоящих ферментов (лактатдегидрогеназа, фосфофруктокиназа и др.).

Многие представители галофильных микроорганизмов проявляют способность к деградации различных токсических остатков нефтеперерабатывающей и химической промышленности, благодаря чему галофилы рассматриваются как потенциальные «санитары» среды, загрязненной антропогенными факторами (Nicholson C., Fathepur B., 2004). Минимальный риск загрязнения посторонней микрофлорой и низкая требовательность к пище делают возможность применения солелюбивых микроорганизмов в промышленных целях еще более перспективной.

Несмотря на свой богатый биопотенциал в настоящее время галофилы в недостаточной степени используются в биотехнологических процессах. В то же время, имеющиеся в мире коллекции галофильных микроорганизмов представлены в основном археями и бактериями. Исходя из вышесказанного, становится актуальным поиск галофилов среди других групп микроорганизмов, особенно среди микроскопических грибов, которые по сравнению с прокариотами характеризуются широким спектром генетической информации и способны к разнообразным микробным преобразованиям.

С точки зрения селекции галофильных микроскопических грибов, большой интерес вызывают засоленные почвы и озера Грузии, микрофлора которых до настоящего времени практически не изучена.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось создание коллекции галофильных микроскопических грибов, распространенных в соленых почвах и озерах Грузии.

Были намечены следующие задачи:

- выделение и идентификация микроскопических грибов, распространенных в соленых почвах равнин и озер Кахетии и Квемо Картли;
- изучение экологии отдельных родов идентифицированных микроскопических грибов;
- установление степени экстремофильности микроскопических грибов, распространенных в соленых почвах и озерах Грузии;
- создание коллекции галофильных микроскопических грибов;
- выявление в созданной коллекции экстремофилов высокой степени
- отбор активных продуцентов ферментов (целюлаза, ксиланаза, амилаза и протеаза);

- выявление в коллекции галофильных микроскопических грибов культур, способных к деградации органических токсикантов.

Научная новизна работы. Из засоленных почв и озер равнин Квемо Картли и Кахетии выделены и идентифицированы 96 различных видов галофильных микроскопических грибов. В данных регионах впервые выявлена закономерность распространения отдельных родов микроскопических грибов и определены характерные доминантные роды.

С целью установления степени экстремофильности выделенных микроскопических грибов, изучено влияние экстремальных факторов (устойчивость к различным концентрациям NaCl, крайним значениям pH и температуры среды) на интенсивность роста объекта исследования.

Для отдельных микроскопических грибов установлены жизненные границы устойчивости к концентрациям NaCl, крайним значениям pH и температуры и определены их оптимальные значения. Таким образом, на основе проведенной работы впервые была создана коллекция галофильных микроскопических грибов, распространенных на равнинах Кахетии и Квемо Картли.

В коллекции экстремофильных галофильных микроскопических грибов отобраны экстремофилы высокой степени (по устойчивости к высоким концентрациям NaCl и значениям pH и температуры); выявлены экстремофильные микроскопические грибы, активные продуценты различных ферментов (целюлаза, ксиланаза, амилаза и протеаза) и организмы, способные к деградации органических токсикантов.

Практическая ценность работы. Создание коллекции галофильных микроскопических грибов, в которой будет сконцентрирован генофонд микромицетов, характерных для соленых почв и озер Грузии, имеет большую практическую ценность с точки зрения науки и промышленности. В коллекции культур отобраны галофильные микроскопические грибы, растущие в экстремальных условиях, среди которых встречаются не только активные продуценты ферментов (целюлаза, ксиланаза, амилаза и протеаза), а также культуры, обладающие способностью к деградации различных органических токсикантов.

Включение в технологические процессы стабильных ферментов, действующих в экстремальном режиме, является предпосылкой для решения важнейшей проблемы современной биотехнологии.

Апробация работы

Диссертация апробирована на объединённом заседании лаборатории биотехнологии Института Биохимии и Биотехнологии им. Дурмишидзе.

Публикации.

По материалам диссертации опубликованы 3 научных трудов.

Объём и структура работы.

Диссертационная работа содержит введение, литературный обзор, экспериментальную часть, выводы и список цитированной литературы. Диссертация изложена на _____ страницах и иллюстрирована таблицами () и рисунками ().

Экспериментальная часть

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили микроскопические грибы, выделенные из различных соленых почв и озер Грузии.

Образцы почвы и воды были взяты из солончаков равнин Кахетии и Квемо Картли (Fomin, 2001). В частности:

1. На территориях, географически отдаленных от Алазанской долины (Кахетинская равнина) – из средней, возвышенной части равнины и прибрежной полосы реки Алазани (почвы сильной степени засоленности), и солончаков прилегающих к низине Чатма, Бадиаури, и Лакбе (почвы средней степени засоленности) и из периферической части засоленного массива равнины (слабая засоленность).

2. На территориях, географически отдаленных от засушливой долины равнины Квемо Картли – Соганлуги; села Красногорск Гардабанского района и соленого озера Кумиси; из прилегающих почв, прибрежной полосы, полупустыни, ризосферы водорослей, соленых холмов и донного осадка озер.

Перед посевом микробиологического материала образцы почв предварительно обрабатывались путем диспергирования агрегатов почвы, десорбции клеток микроорганизмов и разделения микроколоний на отдельные составляющие клетки (Звягинцев и др., 1980). Посев обработанных образцов почв осуществлялся методом разбавления почвы предложенного Ваксманом (Waksman, 1916) на питательных средах различного состава (г/л).

1. Универсальная среда – 0,5 л пивного суслу 7°В, 0,5 л водопроводной воды, 20,0 г агар-агара (рН-5,5-6,0).

2. Подкисленная среда Чапека (для подавления бактерий) – глюкоза - 20,0; NaNO_3 -9,1; KH_2PO_4 - 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,02; агар-агар - 20,0 (рН - 3,5-4,0).

3. Среда Чапека-Докса – сахароза - 30,0; NaNO_3 - 2,0; KH_2PO_4 - 1,0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,01; агар-агар - 20,0 (рН - 4,5-5,0).

4. Селективная питательная среда - NaNO_3 - 3,0; KH_2PO_4 - 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,02; дрожжевой экстракт - 1,0; микрокристаллическая целлюлоза - 1,0; агар-агар - 20,0 (рН - 5,5-6,0).

5. Питательная среда Гатчинсона и Клейтона для выделения микроскопических грибов разрушающих целлюлозу - KH_2PO_4 - 1,0; CaCl_2 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; NaCl - 0,1; FeCl_2 - 0,01; NaNO_3 - 2,5; агар-агар - 20,0 (рН - 5,5-6,0).

Режим стерилизации 0,5 атм., 30 мин., культивацию производили при температуре 28°-30°С на протяжении 10 дней.

При идентификации чистых культур полагались на различные определители микроскопических грибов (Пидопличко, Милько, 1971; Билай, Коваль, 1988; Литвинов, 1967; Malloch et al., 1981).

Образующая колонии единица выделенных микроскопических грибов, определялась путем пересчета на 1гр сухой почвы по формуле $A=abv/g$ (Дудко и др, 1982).

С целью выявления экстремофилов по температурному признаку микромицеты выращивали в широком диапазоне температур 5°С- 55°С, с интервалом 5°С, а для выявления алкалифилов и рН толерантов – в пределах кислотности от рН - 2,0 до рН - 10,0 с интервалом 0,5.

Для определения степени галофильности микроскопические грибы выращивались на питательной среде, содержащей различные концентрации NaCl (0,5М – 4,0М) в широком диапазоне температур.

Глубинное культивирование производилось в конусообразных колбах Эрленмейера объемом 750 мл, на термостатированной качалке (180-200 в/мин.), при температуре 30°С, на протяжении 72 часов.

Для отбора продуцентов амилазы культивирование протекало в жидкой среде следующего состава (%): крахмал - 6,0; NaNO_3 - 0,91; KH_2PO_4 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl - 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,0002; солод - 3,0 (рН - 5,0-5,5). Для выявления продуцентов целюлазы

культивирование производилось в среде следующего состава: микрокристаллическая целлюлоза – 0,1; NaNO_3 – 0,3; KH_2PO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05, экстракт кукурузы – 1,5; (pH - 5,0-5,5).

Глубинное культивирование для выявления продуцентов ксиланазы производилось в жидкой среде следующего состава (%): соевая мука 3,0; KH_2PO_4 – 1,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,2; KCl – 0,05; MgSO_4 -0,015.

Глубинное культивирование с целью выявления продуцентов протеазы протекало в жидкой среде следующего состава (%): KNO_3 – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,007; KCl – 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,005; дрожжевой экстракт – 0,5; казеин – 0,1; pH - 5,0.

Общая целюлазная активность определялась по фильтровальной бумаге (Ghose, 1987); редуцирующие сахара определяли по методу Сомоджи-Нельсона (Nelson, 1944; Somogyi, 1952).

α -амилазная активность определялась по интенсивности цветной реакции йода с крахмалом, полученным в результате ферментативной реакции (Рухлядева, Горячева, 1960).

Ксиланазная активность определялась по стандартным методом IUPAC.

Протеазная активность – по модифицированному методу Ансона (Anson N.Z., 1938).

С целью отбора культур способных к деградации органических токсикантов микроскопические грибы выращивались на питательной среде, в которую как единственный источник углерода вносились различные органические токсиканты. По способности к детоксикации судили по количеству ассимилированного органического вещества.

Результаты и их обсуждение

Выделение и идентификация галофильных микроскопических грибов распространённых в солончаках Грузии

Как известно, микроорганизмы, устойчивые к высокой концентрации соли в основном распространены в засоленных почвах и соленых озерах (Oren, A., 1990; Oren, A., 1999, Lizama et al., 2002). На основе литературных данных из 48 почвенных районов Грузии были подобраны две различные экологические ниши – солончаки равнин Кахетии и Квемо Картли, исходя из предположения, что микрофлора, выделенная из засоленных почв и озер будет представлена галофильными микроскопическими грибами. О количестве микроскопических грибов, распространённых в солончаках судили по величине единицы, образующей колонии. На основании полученных результатов было установлено, что в Гардабанском районе богатой микрофлорой характеризуются почвы прилегающие к Кумисскому озеру, а среди почв Алазанской долины сравнительно многочисленной микрофлорой выделяется периферическая часть равнины.

В результате эксперимента были выделены микроскопические грибы 96 различных видов, среди них 44 из солончаков равнин Кахетии и 52 - из солончаков равнин Квемо Картли. Из микромицетов Алазанской долины 20 были выделены из почв зоны сильной засоленности а по 12 из зоны средней и слабой засоленности. Из микромицетов, выделенных из солончаков Сигнахской долины 32 приходились на почвы прилегающие к соленому озеру Кумиси и 20 - на почвы прилегающие к соленому озеру села Красногорск.

После определения крупной таксономической единицы - класса была произведена идентификация родов с учетом морфологических и культуральных свойств микроскопических грибов. С этой целью использовалась схема, которая зависела от систематической позиции изучаемого вида. Полагаясь на выше перечисленные определители, микроскопические грибы выделенные из засоленных почвенных районов Грузии были отнесены к родам *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Allesheria*, *Trichoderma*.

Итак, в результате проведенного эксперимента создана коллекция микроскопических грибов, распространённых в солончаках равнин Кахетии и Квемо Картли, которая насчитывает 96 видов микромицетов. Создание коллекции объединяющей генофонд микроскопических

грибов распространенных в регионах Грузии характеризующихся солончаковыми почвами имеет большое практическое значение с точки зрения производства.

После идентификации микроскопических грибов, выделенных из засоленных районов Грузии стало возможным установление закономерностей распространения различных родов микросмицетов и выявление доминантных родов.

На Рис. 1 и 2 представлены роды и частоты встречаемости микроскопических грибов распространенных в засоленных почвах равнин Кахетии и Квемо Картли. Как видно по рисункам, доминантами первого ранга Алазанской долины являются роды *Aspergillus* и *Penicillium* класса *Ascomycetes*. В данном регионе редко встречались представители класса *Zygomycetes*. Единственный род - *Mucor* из этого класса был характерен для почв средней степени засоленности.

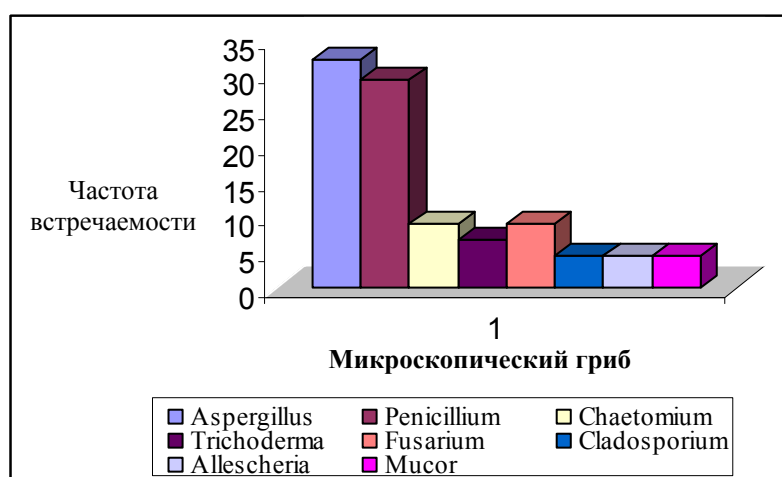


рис.1 Частота встречаемости родов микроскопических грибов солончаков Кахетинской долины.

Что касается частоты встречаемости микроскопических грибов, распространенных в солончаках равнины Квемо Картли - Соганлугской долины, как показано на Рис. 2, подобно микрофлоре Кахетинской равнины, в засоленных озерах Кумиси и села Красногорск доминируют роды *Aspergillus* и *Penicillium*. В почвах прилегающих к Кумисскому озеру не встречается род *Trichoderma*, который был характерен для засоленных почв озера села Красногорск. А для микрофлоры последнего не характерно присутствие родов *Chaetomium* и *Fusarium*, которые были типичными для засоленных почв Кумиси.

Частота
встречаемости

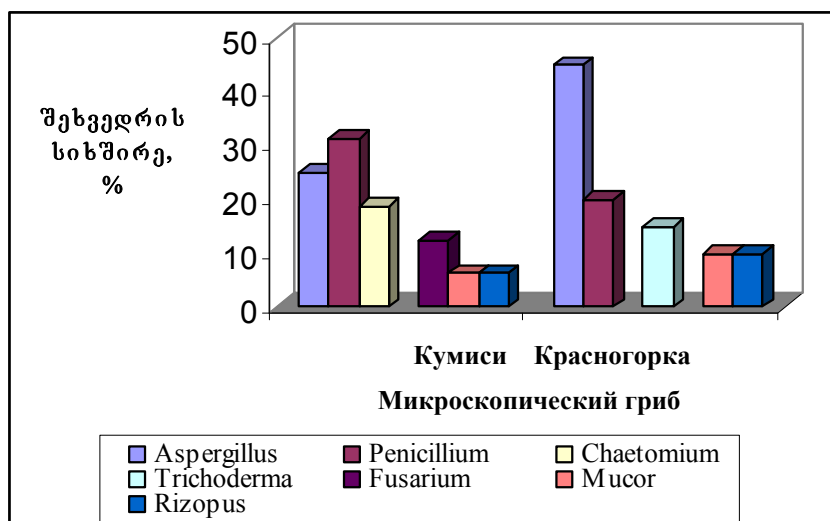
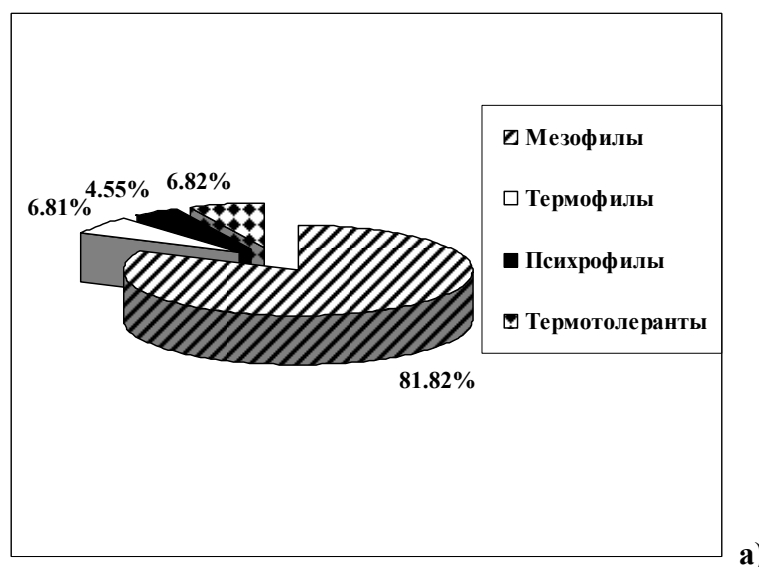


Рис.2 Частота встречаемости родов микроскопических грибов солончаков Квемо Картли

Установление степени экстремофильности микроскопических грибов, распространенных в солончаках Грузии

Целью нашей работы являлось установление степени экстремофильности отдельных штаммов коллекции по разным параметрам (температура, pH, концентрация NaCl). Для установления степени экстремофильности отдельных культур коллекции были определены границы жизненных температур и температурный оптимум. Для этой цели микроскопические грибы выращивали в широком диапазоне температур от 0 до 55°C, с интервалом 5°C на предварительно подобранных универсальных агаризованных питательных средах, содержащих 1 М NaCl.

Известно, что большинство существующих в природе микроорганизмов являются мезофилами (Билай, 1985), и в наших экспериментах 82% микрофлоры, выделенной из солончаков Грузии составили мезофильные культуры с оптимумом роста в диапазоне 28- 30°C (Рис. 3).



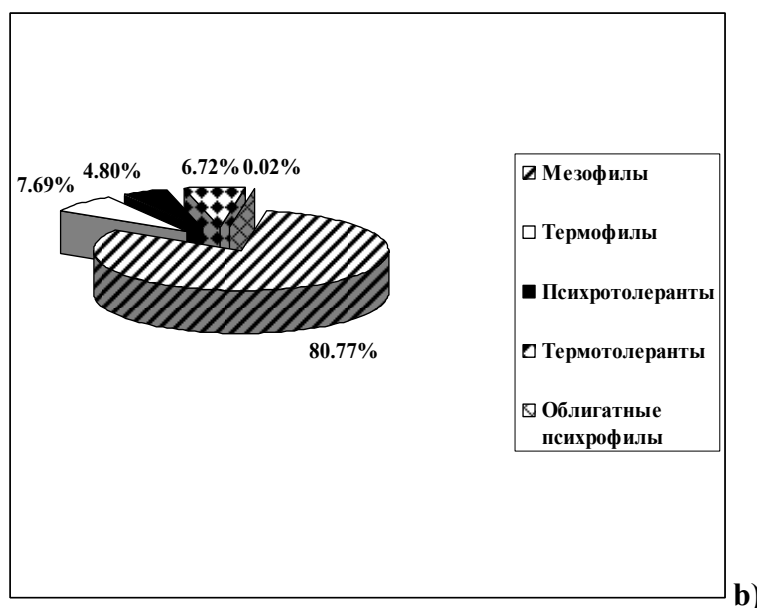


Рис. 3 Частота встречаемости микроскопических грибов солончаков Грузии по температуре культивирования

а) Кахетинская долина

в) Квемо Картли

На основе проведенных исследований среди микроскопических грибов, выделенных из солончаков Кахетинского региона, отобраны 8 экстремофильных видов по отношению к температуре (Таблица 1). Из Таблицы следует, что 3 культуры – *Aspergillus sp.* А-2, *Aspergillus sp.* А-26 и *Chaetomium sp.* А-36 представляют термофильные микроорганизмы, с температурным оптимумом в пределах 40-45°C, а жизненные границы находятся в пределах от 20°C до 55°C.

Таблица 1

**Экстремофильные по температуре виды микроскопических грибов
распространенных в соленых почвах и озерах Грузии**

Характеристика культуры	Название культуры	
	солончаки Кахетинской долины	солончаки долины Квемо Картли
Термофилы	<i>Aspergillus sp.</i> А-2 <i>Aspergillus sp.</i> А-26 <i>Chaetomium sp.</i> А-36	<i>Aspergillus sp.</i> К-1 <i>Aspergillus sp.</i> К-2 <i>Chaetomium sp.</i> КМ-13 <i>Trichoderma sp.</i> К2-6
Термотолеранты	<i>Trichoderma sp.</i> А-40 <i>Trichoderma sp.</i> А-41 <i>Trichoderma sp.</i> А-42	<i>Aspergillus niger</i> КМ2-2 <i>Aspergillus sp.</i> КМ-6 <i>Penicillium sp.</i> К-9
Психротолеранты	<i>Fusarium sp.</i> А-10 <i>Fusarium sp.</i> А-43	<i>Fusarium sp.</i> КМ3-1 <i>Fusarium sp.</i> КМ-18
Облигатные психрофилы	-	<i>Mucor sp.</i> КМ2-2

Из отобранных экстремофилов два микроскопических гриба *Fusarium* sp A-10 и *Fusarium* sp A-43 росли при низкой температуре 5°C и в то же время проявляли способность к росту и при температуре 40°C.

В микрофлоре солончаков Кахетинской равнины не были обнаружены облигатные психрофилы, предпочитающие для роста низкую температуру и неспособные расти при температуре выше 20°C.

По способности к росту и широком диапазоне температур от 5°C до 55°C все три культуры рода *Trichoderma* - *Trichoderma* sp A-40, *Trichoderma* sp A-41, *Trichoderma* sp A-42 мы объединили в группу термотолерантов.

По температурному признаку из микроскопических грибов выделенных из солончаков равнины Квемо Картли были отобраны 10 экстремофилов, среди них 4 термофила *Aspergillus* sp. K-1, *Aspergillus* sp. K-2, *Trichoderma* sp. K-2-6 и *Chaetomium* sp KM-13. Из них первые три культуры были выделены из солончаков села Красногорск, а *Chaetomium* sp. KM-13 из почв, прилегающих к соленому озеру Кумиси. *Aspergillus niger* KM -2-2, *Aspergillus niger* KM -6 и *Penicillium* sp K-9 отличались способностью к росту в широком диапазоне температур (от 5°C до 55°C), из-за чего упомянутые культуры были объединены в группу термотолерантов. Заметим, что термотолерантные грибы рода *Aspergillus* были изолированы из солончаков Кумиси, а *Penicillium* - из солончаков села Красногорск.

Среди грибов экстремофилов равнины Квемо Картли психрофилы были выявлены только в микрофлоре соленых почв. В частности, два микроскопических вида *Fusarium* sp. KM3-1 и *Fusarium* sp KM18 растущие в диапазоне температур от 5°C до 40°C, по температурному признаку были классифицированы как психротолеранты.

Среди микромицетов, выделенных из равнин данного региона единственная культура *Mucor* sp. KM-22 была адаптирована к низкой температуре и была неспособна к росту при температуре выше 20°C. По этим признакам упомянутый штамм был отнесен к группе облигатных психрофилов.

Итак, в результате проведенных экспериментов в коллекции микроскопических грибов выделенных из солончаков Грузии по температурному признаку было выявлено 18 экстремофилов, среди них 7 термофилов, 4 психротолерантов, 6 термотолерантов и 1 один облигатный психрофил.

Наблюдения за морфологическими признаками микроорганизмов выявили, что при приближении к критической температуре морфологические и культуральные свойства большинства исследуемых грибов резко менялись. При этом грибы различных родов по разному реагировали на изменчивость температуры. Например, в грибах некоторых видов рода *Fusarium* отмечалась дегенерация спор (*Fusarium* sp. A-7, *Fusarium* sp. A-9 и *Fusarium* sp A-43). Пушистый мицелий штамма *Mucor* sp. A-23 выше температуры 35°C менялся на кожистый; у *Aspergillus* sp.A-28, *Aspergillus* sp.A-3 и *Aspergillus* sp.A-4 слияние спор было ограничено а некоторые культуры данного рода (*Aspergillus* sp.A-30, *Aspergillus* sp.A-29) даже меняли окраску. Подобные морфологические изменения, вызванные варьированием температуры описывается множеством авторов (Williams C., 1959, Bonner R., Fegus Ch., 1960).

Установление степени галофильности микроскопических грибов, распространенных в солончаках Грузии

С целью выявить степень галофильности микроскопических грибов, распространенных в солончаках Грузии, на универсальной агаризованной питательной среде в широком диапазоне концентраций NaCl от 0 – до 4М была исследована устойчивость и потребность в соли штаммов коллекции в зависимости от температуры культивирования. Отмеченные параметры легли в основу классификации штаммов созданной коллекции на слабых, умеренных, галотолерантных и экстремальных галофилов. В частности, в группу умеренных галофилов были объединены те

культуры микроскопических грибов, которым для существования был необходим NaCl в концентрации 0,5 М, и которые были устойчивы к NaCl в концентрации 3М, а оптимальная концентрация NaCl составляла 2,5М.

Экстремальными галофилами были признаны культуры, которым для существования был необходим NaCl в концентрации 1М и которые были устойчивы к 4М концентрации NaCl, (оптимальная концентрация NaCl составляла 3М).

Галотолерантные микромицеты росли и при концентрации меньшей 0,5 М NaCl и в то же время были устойчивы к высоким концентрациям соли (выше 2,5М).

Предел устойчивости слабых галофилов не превышал 2М NaCl. Как и предполагалось на начальном этапе исследования солончаки равнин Квемо Картли и Кахетии и на самом деле оказались месторождением галофилов: из 96 культур созданной коллекции все оказались в той или иной степени галофилами (Рис. 4, 5).

В результате эксперимента среди галофильных микроскопических грибов, распространенных в солончаках Кахетинской равнины выявлено 4 экстремальных, 14 галотолерантных, 16 умеренных и 10 слабых галофилов. Следует отметить, что из экстремальных галофилов данного региона 3 принадлежали роду *Aspergillus* а 1 – роду *Chaetomium*. Группу галотолерантов составили культуры принадлежащие родам *Aspergillus*, *Fusarium*, *Allescheria* и *Penicillium*. Умеренные галофилы не встречались лишь в родах *Allescheria* и *Fusarium*.

По данным некоторых авторов (Ventosa A. et al., 1998) в солончаках галотолерантные формы количественно доминируют над слабыми и умеренными галофилами. И в наших экспериментах большинство микрофлоры распространенной на соленых почвах равнин Квемо Картли составляли галотолерантные микромицеты (Рис. 5).





В солончаках соленых озер Кумиси и Красногорск в результате эксперимента выявлено 25 галотолерантов, 7 экстремальных, 12 умеренных и 8 слабых галофилов. Во всех родах микроскопических грибов, идентифицированных из солончаков этого региона встречаются галотолерантные формы. С наибольшей частотой галотолерантные формы встречались в родах *Aspergillus* (9 культур) и *Penicillium* (7 культур). Экстремальные галофилы в основном являлись представителями микроскопических грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*. Умеренные галофилы не были характерны для родов *Fusarium* и *Rhizopus*, а слабые галофилы - только для рода *Fusarium*.

Таким образом, в результате проведенного эксперимента в микрофлоре солончаков равнин Квемо Картли и Кахетии идентифицировано 39 галотолерантов, 11 экстремальных, 28 умеренных и 18 слабых галофилов.

Определение степени экстремофильности микроскопических грибов распространенных в солончаках Грузии

Как известно, жизненные границы микроорганизмов определяет рН среды обитания. В природе более часто встречаются экосистемы нейтральной или средней кислотности, из-за чего большинство микроорганизмов адаптировано к выше упомянутым пределам рН, хотя существуют и микроорганизмы, способные к росту при рН среды, далекой от нейтральной (Горленко М. В., 1976; Chose Т. К., 1987).

Многие авторы подчеркивают факт наличия алкалифилов в солончаках. Исходя из этой информации можно было предполагать наличие в коллекции микроскопических грибов алкалифилов и рН- толерантов (Guiraud 1997, Razak et al 1999, К. Horikoshi 1999). В Таблицах 2 и 3 представлены микроскопические грибы-экстремофилы по отношению к рН среды. Как видно из Таблицы 2, из 44 штаммов коллекции микроскопических грибов выделенных из солончаков Кахетии 15 галофилов оказались экстремальными по отношению к кислотности среды – рН. Среди них преобладали алкалифилы (10 культур). Сравнительно реже встречались рН- толеранты (5 культур). Следует заметить, что почвы сильной степени засоленности характеризовались обилием микроорганизмов экстремофилов по отношению к рН (9 экстремофилов). Из зоны средней степени засоленности отобраны лишь два, а из зоны слабой засоленности – 4 экстремофильных микроорганизма.

Известно, что некоторые представители родов *Penicillium*, *Fusarium* и *Aspergillus* характеризуются способностью к росту в диапазоне pH- 2.0-10.0 (W.Kladwang 2002). Выявленные нами pH-толеранты принадлежали именно перечисленным выше родам. Алкалофилы не были выявлены лишь в родах *Allescheria* и *Cladosporium* (Таблица 2).

Таблица 2

Экстремофильные по pH микроскопические грибы распространенные в солончаках Кахетинской равнины

Микроскопический гриб	Место взятия пробы	Жизненный pH-диапазон культуры	Оптимальное значение pH	Характеристика культуры
1. <i>Aspergillus</i> sp. A25	Почвы сильной степени засоленности	5,0-10,0	9,0	алкалофил
2. <i>Aspergillus</i> sp. A26		5,0-10,0	9,0	алкалофил
3. <i>Aspergillus</i> sp. A29		2,5-10,0	4-8,0	pH- толерант
4. <i>Aspergillus</i> sp. A31		2,5-10,0	4-8,0	pH- толерант
5. <i>Penicillium</i> sp. A33		2,5-10,0	3,5-7,5	pH- толерант
6. <i>Penicillium</i> sp. A34		4,5-10,0	9,0	алкалофил
7. <i>Chaetomium</i> sp. A36		4,5-10,0	9,0	алкалофил
8. <i>Trichoderma</i> sp. A40		4,5-10,0	9,0	алкалофил
9. <i>Trichoderma</i> sp. A41		4,5-10,0	9,0	алкалофил
10. <i>Mucor</i> sp. A-23	Почвы средней степени засоленности	4,5-10,0	4,0	алкалофил
11. <i>Mucor</i> sp. A-24		4,5-10,0	5,5	алкалофил
12. <i>Aspergillus</i> sp. A2	Зона слабой степени засоленности	4,5-10,0	9,0	алкалофил
13. <i>Fusarium</i> sp. A7		2,5-10,0	4,5-8,0	pH- толерант
14. <i>Fusarium</i> sp. A8		2,5-10,0	4,5-8,0	pH- толерант
15. <i>Fusarium</i> sp. A10		4,5-10,0	9,0	алкалофил

Подобно микрофлоре солончаков Кахетинской равнины и в микрофлоре соленых почв Квемо Картли преобладали алкалофилы (11 культур) (Таблица 3). Выявлено 7 pH-толерантов со способностью к росту в широком диапазоне pH. Следует заметить, что кроме родов *Chaetomium* и *Mucor* алкалофилы встречались почти во всех родах микроскопических грибов, распространенных в солончаках равнины Квемо Картли, а pH-толерантные формы были характерны для культур микроскопических грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium* и *Fusarium*.

Таблица 3

Экстремофильные по pH микроскопические грибы распространенные в солончаках равнины Квемо Картли

Микроскопический гриб	Жизненный pH-диапазон культуры	Оптимальное значение pH	Характеристика культуры
1. <i>Aspergillus niger</i> K10-15	2,5-10,0	4,0-7,0	pH-толерант
2. <i>Aspergillus niger</i> K 2-1	4,0-10,0	9,0	алкалофил
3. <i>Aspergillus flavus</i> K2-8	4,0-10,0	9,0	алкалофил

4. <i>Aspergillus sp.</i> K-2	2,0-10,0	4,0-7,0	pH-толерант
5. <i>Aspergillus niger</i> KM2-5	4,0-10,0	9,0	алкалифил
6. <i>Aspergillus niger</i> K M2-2	4,0-10,0	9,0	алкалифил
7. <i>Penicillium sp.</i> KM-8	2,5-10,0	4,0-7,0	pH-толерант
8. <i>Penicillium sp.</i> K6-2	4,0-10,0	9,0	алкалифил
9. <i>Penicillium sp.</i> KM3-17	2,5-10,0	5,0-7,0	pH-толерант
10. <i>Penicillium sp.</i> KM6-3	4,0-10,0	9,0	алкалифил
11. <i>Penicillium sp.</i> KM-12	2,5-10,0	5,0-7,0	pH-толерант
12. <i>Trichoderma sp.</i> K2-3	5,0-10,0	9,0	алкалифил
13. <i>Trichoderma sp.</i> K2-6	4,0-10,0	9,0	алкалифил
14. <i>Trichoderma lignetum</i> K2-7	4,0-10,0	9,0	алкалифил
15. <i>Chaetomium sp.</i> KM-15	2,5-10,0	5,0-7,0	pH-толерант
16. <i>Fusarium sp.</i> KM3-1	2,5-10,0	5,0-7,0	pH-толерант
17. <i>Fusarium sp.</i> KM6-1	5,0-10,0	9,0	алкалифил
18. <i>Rhizopus sp.</i> K-24	4,0-10,0	9,0	алкалифил

Микромицеты-экстремофилы распространенные в солончаках Грузии по отношению кислотности среды оказались экстремофилы и по другим параметрам. В частности 5 алкалифильных микроскопических гриба из коллекции солончаков Кахетинской равнины были оценены как экстремофилы высокой степени (одновременно по трем параметрам устойчивости к – pH, температуре и NaCl (*Aspergillus sp.* A 26, *Chaetomium- sp.* A36, *Trichoderma sp.* A40, *Trichoderma sp.* A41, *Fusarium sp.* A10). а из микрофлоры солончаков равнины Квемо Картли экстремофилами высокой степени оказались 4 культуры (Таблица 4).

Разносторонне экстремофильные микроскопические грибы распространенные в солончаках Грузии

№	Зона	Название культуры	Характеристика культуры
1.	Регион Кахетии	<i>Aspergillus sp.</i> A 26	алкалофил, термофил, экстремальный галофил
2.		<i>Chaetomium- sp.</i> A36	алкалофил, термофил, галотолерант
3.		<i>Trichoderma sp.</i> A40	алкалофил, термотолерант, галотолерант
4.		<i>Trichoderma sp.</i> A41	алкалофил, термотолерант, умеренный галофил
5.		<i>Fusarium sp.</i> A10	алкалофил, психротолерант, галотолерант
6.	Регион Квемо Картли	<i>Aspergillus sp.</i> K2	pH-толерант, термофил, галотолерант
7.		<i>Aspergillus sp.</i> KM 2-2	алкалофил, термотолерант, галотолерант
8.		<i>Trichoderma sp.</i> K 2-6	алкалофил, термофил, умеренный галофил
9.		<i>Fusarium sp.</i> K 3-1	pH-толерант, психротолерант, галотолерант

Микроскопические грибы распространенные в солончаках Грузии – продуцирующие ферменты амилазу, целлюлазу, ксиланазу, протеазу

Получение стабильных ферментов является одним из важнейших проблем биотехнологии. Предположительно микроорганизм, адаптированные к экстремальным условиям среды представляют перспективные продуценты таких ферментов. Особое внимание вызывают галофильные микроскопические грибы, биологический потенциал которых в настоящее время слабо реализован.

С целью выявления активных продуцентов различных ферментов (амилаза, целлюлаза, ксиланаза, протеаза) был проведен скрининг выделенных 96 галофильных микроскопических грибов в оптимальных для культивирования условиях. Результаты эксперимента представлены в Таблицах 5 и 6.

Таблица 5

Продуцирующие различные ферменты галофильные микроскопические грибы распространенные в солончаках Кахетинской равнины

Микроскопический гриб	Целлюлаза, ед/мл	α- амилаза, ед/мл	глюко-амилаза, ед/мл	ксиланаза, ед/мл	протеаза, ед/мл
1. <i>Aspergillus sp.</i> A25					0,7
2. <i>Aspergillus sp.</i> A26	0,86	3,2			
3. <i>Aspergillus sp.</i> A29			24,5		
4. <i>Aspergillus sp.</i> A31		4,2			
5. <i>Penicillium sp.</i> A34	1,20				
6. <i>Penicillium sp.</i> A35				9,2	
7. <i>Chaetomium sp.</i> A36	0,50				
8. <i>Trichoderma sp.</i> A40			12,2		
9. <i>Penicillium sp.</i> A19	0,75			3,4	
10. <i>Mucor sp.</i> A23		3,7			
11. <i>Mucor sp.</i> A24			7,0		
12. <i>Aspergillus sp.</i> A2	1,0				
13. <i>Aspergillus sp.</i> A4		5,1			
14. <i>Fusarium sp.</i> A9			5,9		

15. <i>Fusarium sp.</i> A10		1,5		5,7	0,34
16. <i>Penicillium sp.</i> A16					

На основе проведенных исследований из коллекции микроскопических грибов солончаков Грузии отобрано 49 культур. Из них 12 продуценты целлюлазы, 22 - амилазы, 9 – ксиланазы и 6 – протеазы. Как и следовало ожидать, продуценты целлюлазы принадлежали родам *Aspergillus*, *Penicillium* и *Chaetomium*. Способность этих родов микроорганизмов к биосинтезу целлюлозы в условиях глубинного культивирования подтверждена и литературными данными. Среди продуцентов ксиланазы встречаются лишь культуры рода *Penicillium* (Chandi S., Rath, 1997, Romanelli R. et al., 1975, Mandels M., 1975).

Следует отметить, что из исследованных микроорганизмов способностью к синтезу одновременно трех ферментов - α -амилазы, целлюлазы и ксиланазы обладала мезофильная культура *Penicillium sp.* K6-2, а *Trichoderma sp.* K2-6 являлась продуцентом целлюлазы, α -амилазы, глюкоамилазы. Последняя оценена как разносторонний экстремофил высокой степени.

Для полного выявления биологического потенциала галофильных микроорганизмов созданной коллекции была изучена способность культур к биодegradации токсических веществ.

Таблица 6

Продуцирующие различные ферменты галофильные микроскопические грибы распространенные в солончаках равнины Квемо Картли

Микроскопический гриб	Целлюлаза, ед/мл	α -амилаза, ед/мл	глюкоамилаза, ед/мл	ксиланаза, ед/мл	протеаза, ед/мл
1. <i>Aspergillus niger</i> K 2-1		8,15			
2. <i>Aspergillus flavus</i> K2-8		3,5	11,4		
3. <i>Aspergillus sp.</i> K-1	1,15				
4. <i>Aspergillus sp.</i> K 2	0,82				
5. <i>Aspergillus niger</i> KM6-11			17,3		
6. <i>Aspergillus niger</i> K 2-1			23,9		
7. <i>Aspergillus niger</i> K 2-5					0,4
8. <i>Aspergillus niger</i> KM2-2		4,1			
9. <i>Penicillium sp.</i> K-9				8,5	
10. <i>Penicillium sp.</i> K6-2		3,7	7,8	9,8	
11. <i>Penicillium sp.</i> KM3-17				11,4	
12. <i>Penicillium sp.</i> KM4-4	0,95				0,8
13. <i>Penicillium sp.</i> KM6-3				7,7	
14. <i>Penicillium sp.</i> KM-10				5,0	
15. <i>Penicillium sp.</i> KM-12				5,7	
16. <i>Penicillium sp.</i> KM-27			8,0		
17. <i>Trichoderma sp.</i> K2-3	0,5				
18. <i>Trichoderma sp.</i> K2-6	0,3	4,3	5,75		
19. <i>Chaetomium sp.</i> KM4-2					0,6
20. <i>Chaetomium sp.</i> KM1-3	0,78				
21. <i>Fusarium sp.</i> KM3-1		5,8			
22. <i>Fusarium sp.</i> KM6-1	0,3				
23. <i>Mucor sp.</i> K-19					1,5
24. <i>Aspergillus niger</i> K 2-12		9,0			

Из литературных источников известно, что почвы, загрязненные токсическими веществами, особенно территории, прилегающие к химическим предприятиям, характеризуются высокой засоленностью. Исходя из этого определен интерес заслуживало выявление среди галофильных культур штаммов, способных к деградации токсических веществ. С этой целью галофильные культуры выращивали на питательных средах, где единственным источником углерода являлись такие канцерогенные вещества, как фенол, бензол и бензпирен. Результаты представлены в Таблице 7. Как видно из таблицы 8 микроскопических гриба из коллекции галофилов отличаются высокой способностью к биодegradации токсикантов. В частности 4 культуры характеризуются высокой степенью ассимиляции фенола, 2 – бензпирена и 2 – бензола.

Таблица 7

Ассимиляция органических токсикантов галофильными культурами

№	Культура	Остаточный субстрат, %		
		фенол	бензол	Бензпирен
1.	<i>Aspergillus sp.</i> К-2	5,5	6,7	56,7
2.	<i>Penicillium sp.</i> А 32	57,8	45,7	34,8
3.	<i>Fusarium sp.</i> А43	78,9	33,7	59,7
4.	<i>Trichoderma sp.</i> К2-3	2,7	6,7	35,7
5.	<i>Mucor sp.</i> К19	5,4	79,6	7,9
6.	<i>Mucor sp.</i> А23	67,9	67,9	77,3
7.	<i>Aspergillus sp.</i> КМ2-2	7,8	57,7	60,9
8.	<i>Trichoderma sp.</i> А 40	2,7	28,7	5,7

Итак, в результате проведенной работы создана коллекция галофильных микроскопических грибов, отобраны экстремофильные культуры, обладающие высоким биопотенциалом, которые можно с успехом использовать в различных технологических процессах.

Выводы:

1. Из соленых почв и солончаков двух различных зон Грузии – равнин Кахетии и Квемо Картли – изолированы 96 видов микроскопических грибов; 44 из них из соленых почв Кахетии и 52 – из соленых почв и озер Квемо Картли. Идентифицированы 9 родов: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Mucor* и *Rhizopus*.

2. Проанализированы частоты встречаемости отдельных родов микроскопических грибов в соленых почвах и озерах Грузии. Выявлены характерные для данных регионов доминантные роды и установлена закономерность их распространения, определенная экогеографическими факторами среды.

Роды *Aspergillus* и *Penicillium* класса Ascomycetes являются доминантами первого ранга соленых почв и озер равнин Кахетии и Квемо Картли.

3. Изучена степень экстремофильности культур коллекции. В частности, для микроскопических грибов установлены жизненные pH- и температурные диапазоны. Для отдельных культур установлены оптимальные условия культивирования (pH и температура). Выявлены 18 экстремофилов по отношению к температуре и 33 – по отношению к кислотности среды.

4. Изучены потребность и устойчивость отдельных галофильных культур к различным концентрациям NaCl.

Показано, что солончаки равнин Кахетии и Квемо Картли чрезвычайно богаты галофилами. Из 96 изолированных микроскопических грибов все являются галофилами той или иной степени: 39 – галотолерантны, 11 – экстремальны, 28 – умеренно галофильны и 18 слабо галофильны.

5. Из коллекции галофильных микроскопических грибов отобрано 9 экстремофилов высокой степени (экстремофилы по всем трем параметрам).

6. В коллекции галофильных микроскопических грибов отобраны новые активные продуценты ферментов целлюлазы, амилазы, ксиланазы и протеазы. Среди продуцентов ферментов выявлены 3 экстремофила высокой степени. Отобрано два галофильных микроскопических гриба *Penicillium* sp. K6-2 и *Trichoderma* sp. K2-6, способных одновременно синтезировать три фермента.

7. Показана возможность биодеградации токсических веществ галофильными культурами; отобрано 8 культур, обладающих высокой способностью к деградации токсических веществ.

Список использованных в диссертации опубликованных научных трудов:

1. Kvesitadze E., Kharebashvili M., Khokhashvili I., Kutateladze L., Sabashvili N
Laskhishvili M. - Microscopic Fungi Strains- the Producers of Proteolytic Enzymes - *Proceedings of the Georgian Academy of Sciences, Biological Series. 2005, V. 3, N 3, pp.56-60*
- 2 Laskhishvili M. Kutateladze L., Zakhariashvili N., Glonti N., Khokhashvili I., Jobava M.,
Isolation and Identification of Microscopic Fungi from Salty soils-*Proceedings of the Georgian Academy of Sciences, Biological Series. 2006, V. 3, N4, pp.55-59*
3. Laskhishvili M Kutateladze L., Zakhariashvili N., Aleksidze T., Daushvili L., KvesitadzeE-
Isolation and Identification of Microscopic Fungi from Salty soils of Kakheti (Alazani) Valley
Proceedings of the Georgian Academy of Sciences, Biological Series. 2006, V. 4, N1, pp.72-76