

ГАЛОФИЛЬНОСТЬ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СОЛОНЧАКОВ ЮЖНОГО КАВКАЗА

Э. Квеситадзе

Грузинский технический университет, Тбилиси, Грузия

E-mail: blgeorgia@gmail.com

Получено 28.05.2015

Работа посвящена выделению, очистке, таксономической характеристике и оценке возможности практического использования в биотехнологических процессах сельского хозяйства культур галофильных микроскопических грибов из солончаков Восточной Грузии (средняя часть Южного Кавказа). Во всех почвенно-климатических зонах доминируют роды *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*, затем *Trichoderma* и *Mucor*, остальные — встречаются сравнительно редко. Род *Aspergillus* широко представлен в каштановой почве и черноземе. В серой лесной почве преобладает *Penicillium*. По результатам экспедиций в засоленных регионах создана коллекция галофильных микроорганизмов, насчитывающая 96 изолятов микроскопических грибов. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что в почвах с сильной засоленностью преобладают галотолеранты и экстремальные галофилы и практически не представлены слабые галофилы. В слабозасоленных почвах крайне редко встречаются экстремальные галофилы и доминируют слабогалофильные формы грибов.

Ключевые слова: галофилы, микроскопические грибы, экстремофилы, энзимы.

Экстремофилы являются уникальными формами микроорганизмов и благодаря своей устойчивости к критическим условиям имеют высокий биотехнологический потенциал. Интуитивное применение микроорганизмов берет начало с античных времен, когда их использовали для приготовления засоленных продуктов питания, в производстве хлеба, сыра, вина и др. В настоящее время микроорганизмы, действующие в обычных и экстремальных условиях (высокие концентрации соли, низкие и повышенные температуры, крайние значения кислотности среды и пр.), широко используют в различных отраслях промышленности, в медицине и особенно активно — в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. С учетом действия этих микроорганизмов разработаны биотехнологии, связанные с очисткой почвы и водоемов от токсических соединений. Использование препаратов энзимов в разных отраслях промышленности (при изготовлении моющих средств, в производстве этилового спирта и других органических растворителей, биоэтанола и др.) связано с энзимами, выделенными из экстремофильных микроорганизмов. Исследования экстремофилов особенно активизировались в последние 20 лет. Это, в частности, обусловлено новыми аспектами

практического применения галофильных микроорганизмов. В этой связи следует отметить галофильные консорциумы микроорганизмов, состоящие из бактерий, микроскопических грибов и актинобактерий, как саморазмножающиеся в солончаках формы микроорганизмов, часто изменяющие кислотность почв и способствующие существенному повышению урожайности риса, пшеницы, сои и других с/х культур [1–3].

В подавляющем большинстве в засоленных регионах соль глубоко проникает в почву и, как правило, ее удаление связано с серьезными проблемами. В необрабатываемых засоленных почвах устанавливается равновесие в диффузии соли между разными слоями почвы. В случае обильных осадков, способствующих вымыванию солей из верхних частей почвы, начинается диффузия соли из более глубоких слоев. И только благодаря продолжительным и систематическим осадкам проблема засоленности может быть решена естественным образом. В других случаях физические, химические и механические технологии, связанные со снижением концентрации соли в почвах, не дают желаемого результата, поскольку соль вновь диффундирует в верхние слои

почвы, и в течение непродолжительного времени высокая концентрация соли в этих слоях вновь восстанавливается. Как было неоднократно показано, использование галофильных микроорганизмов является эффективным средством обработки засоленных почв, поскольку, уменьшая концентрацию соли и изменяя кислотность почвы, галофильные микроорганизмы существенно повышают урожайность почв.

Цель настоящей работы — выделение и оценка использования в сельском хозяйстве и биотехнологических процессах культур галофильных микроскопических грибов из солончаков Восточной Грузии (средняя часть Южного Кавказа), где их существование наиболее предположительно.

Материалы и методы

Для выделения экстремофильных микроорганизмов были взяты пробы почв из разных экологических ниш Южнокавказского региона, в частности из альпийской зоны (гумусно-карбонатные почвы), субальпийской зоны (горно-луговые почвы), влажной субальпийской климатической зоны (болотные и подзолистые почвы низменности), степной зоны (чернозем и каштановая почва), полупустынной зоны (каштановая, засоленная почва и солончаки), сухой субтропической климатической зоны (коричневая почва, чернозем и аллювиальная почва), континентальной климатической зоны (серая лесная и подзолистые почвы, вулканические породы). С целью выделения и изучения галофильных микромицетов были взяты образцы почв и воды из солончаков и соленых озер Восточной Грузии (Квемо Картли, Кахетия), имеющих общую протяженность вдоль и поперек Кавказского хребта, превышающую по длине 300 км, в частности:

– территориально удаленных друг от друга местностей Алазанской долины (длина до 150 км, ширина в среднем 50 км), характеризующихся местами сильной, средней и слабой засоленности;

– территориально удаленных друг от друга озер (Кумиси, Красногорск) и почв центральной долины Квемо Картли длиной свыше 180 км.

Первоначально для выделения культур микроскопических грибов из вышеупомянутых зон брали по 10 усредненных проб [4]. Микробиологические посева проводили общепринятыми методами [5, 6].

Для выделения микроскопических грибов использовали синтетические питательные среды:

1. Универсальная среда следующего состава в пересчете на 1 л: 0,5 л пивное сусло 7 °В; 0,5 л водопроводной воды; агар — 20,0 г (рН 5,5–6,0).

2. Окисленная среда Чапека (для подавления роста бактерий) (%): глюкоза — 2,0; NaNO_3 — 0,91; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; KCl — 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,002, агар — 2,0 (рН 3,5–4,2).

3. Среда Чапека–Догса (%): сахароза — 3,0; NaNO_3 — 0,2; K_2HPO_4 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; KCl — 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,001; агар — 2,0 (рН 4,5–5,0).

Режим стерилизации — 0,5 атм в течение 30 мин. Культивирование грибов проводили в поверхностных и глубинных условиях при температурных режимах от 28 до 55 °С, в течение от 3 до 10 дней. Для выделенных культур грибов сначала определяли таксономическую принадлежность (класс, порядок), что устанавливалось оценкой особенностей репродуктивных органов. После первичного выделения микрофлоры из почв, из первичных посевов, путем многократных пересевов выделены чистые культуры галофильных микромицетов, для идентификации которых использовали специальные определители [7–9].

Колониеобразующие единицы (КОЕ) выделенных микроскопических грибов определяли с пересчетом на 1 г сухой почвы по формуле: $A = abv/g$ [10].

С целью установления степени экстремофильности выделенных культур микромицеты выращивали при температуре 5–55 °С, с интервалом 5 °С, при рН от 2,0 до 10,0, с интервалом 0,5. Для выявления галофильных культур в исходную питательную среду вносили NaCl в разных концентрациях — от 0,5 М до 4 М (соответственно 2,93%–23,2%). Галофильные микроорганизмы устойчивы к высокому осмотическому давлению. Экстремальные галофилы развиваются в жидких питательных средах, содержащих 25% NaCl , и вследствие приобретенных высоких адаптационных способностей даже не растут в отсутствие высоких концентраций соли [11, 12].

В солончаках Южного Кавказа, где 7–8 млн. лет тому назад в течение длительного периода было море и, следовательно, концентрация соли довольно высокая, для выделения культур и установления степени

галофильности почвенных микроорганизмов использовали агаризованную среду, содержащую от 0 до 4М NaCl, при разных значениях температуры. Это позволило не только выделить галофильные микроскопические грибы из засоленных почв, но и в зависимости от оптимальных для роста концентраций соли классифицировать их на слабые, умеренные, галотолерантные и экстремальные галофилы.

В частности, группу умеренных галофилов составили культуры микроскопических грибов, для существования которых нужна среда обитания с 0,5 М NaCl. Для культур умеренно галофильных микромицетов оптимальная для роста концентрация соли приблизительно такая же (0,5 М NaCl), но максимальная концентрация соли, при которой они способны существовать, составляла 3 М NaCl. К умеренным галофилам следует отнести культуры грибов с интенсивным ростом и при 1,5–2,0 М NaCl. Галотолерантные микроскопические грибы характеризуются оптимальным ростом в диапазоне концентрации соли, соответствующей 1,5–2,0 молярной концентрации NaCl. Экстремальным галофилам для инициации и нормального роста требуется концентрация соли не менее 1 М NaCl. Оптимальной концентрацией соли для роста экстремальных галофилов считается 2,5–3 М NaCl, хотя эти культуры выдерживают (сохраняют характерные признаки метаболизма) и при концентрации соли, равной 4 М NaCl.

Скрининг галофильных микромицетов — продуцентов гидролаз осуществляли при глубинном культивировании. Посевным материалом служила суспензия конидий 10-дневных культур. Глубинное культивирование отдельных штаммов микроскопических грибов проводили в 750 мл конических колбах Эрленмейера, на термостатической качалке (180–200 об/мин), при температуре 30 °С, в течение 72–120 ч.

Для выявления продуцентов целлюлаз проводили глубинное культивирование в жидкой питательной среде такого состава (%): микрокристаллическая целлюлоза — 0,1; NaNO₃ — 0,3; KН₂PO₄ — 0,2; MgSO₄ · 7H₂O — 0,05; экстракт кукурузы — 1,5; pH 5,0–5,5.

С целью выявления продуцентов ксиланаз глубинное культивирование проводили в жидкой среде, в состав которой входили (%): соевая мука — 3,0; Na₂HPO₄ — 1,5; (NH₄)₂SO₄ — 0,2; KCl — 0,05; MgSO₄ — 0,015; pH 4,2.

Для определения продуцентов амилаз глубинное культивирование осуществляли в жидкой среде такого состава (%): крахмал — 6,0; NaNO₃ — 0,91; KН₂PO₄ — 0,1; MgSO₄ · 7H₂O — 0,05; KCl — 0,05; FeSO₄ · H₂O — 0,0002; солодовые ростки — 3,0; pH 5,0–5,5.

Продуценты протеаз определяли в глубинных условиях на среде, в состав которой входили (%): KNO₃ — 0,1; KН₂PO₄ — 0,1; MgSO₄ · 7 H₂O — 0,007; KCl — 0,05; FeSO₄ · H₂O — 0,005; дрожжевой экстракт — 0,5; казеин — 0,1; pH 5,0.

Продуценты пектиназ выявляли глубинным культивированием в жидкой среде следующего состава (%): лактоза — 0,1; глюкоза — 0,1; KН₂PO₄ — 0,3; (NH₄)₂SO₄ — 0,5; MgSO₄ — 0,03; pH 5,0.

Активность энзимов определяли общепринятыми международными методами [13–19].

Результаты и обсуждение

В результате многочисленных экспедиций — с 1978 по 1994, а затем с 1996 по 2010 гг. — в разных регионах Грузии было выделено свыше 6 500 культур бактерий, микроскопических грибов и актинобактерий.

Проведенные нами исследования показали: микрофлора сухой субтропической и степной климатических зон многочисленна, но сравнительно однообразна. Это характерно и для континентальной климатической зоны. Микрофлора альпийской и субальпийской зон также разнообразна, но малочисленна. Микрофлора полупустынной зоны немногочисленна и весьма специфична.

Среди выделенных микроскопических грибов установлены доминантные роды. Следует отметить, что во всех почвенно-климатических зонах доминируют роды *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*, затем *Trichoderma* и *Mucor*. Остальные роды встречаются сравнительно редко. Род *Aspergillus* также широко представлен в каштановой почве и черноземе, а в серой лесной почве преобладает род *Penicillium* (рис. 1).

Полученные результаты показали, что во всех почвенно-климатических зонах Восточной Грузии определяются микроскопические грибы как доминантный таксономический вид микроорганизмов, которые по-разному реагируют на температуру. Среди микроскопических

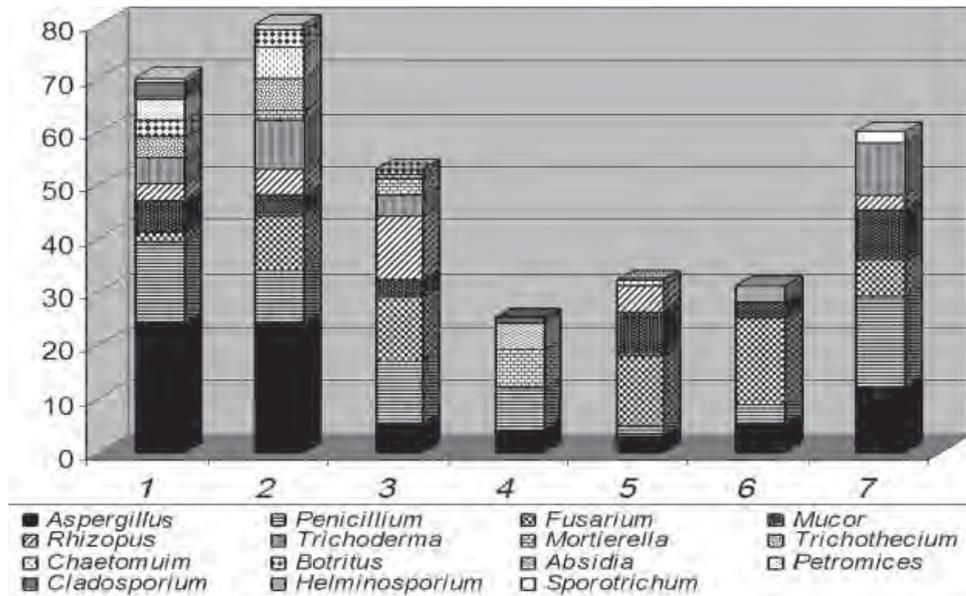


Рис. 1. Частота встречаемости родов микроскопических грибов в разных почвах Южного Кавказа

грибов, выделенных из почв наиболее жаркого региона (Сигнаги), преобладают термофилы и термотолеранты. Среди микромицетов, выделенных из кислой и щелочной почв, чаще встречаются ацидо- и алкалофилы. Большинство галофильных штаммов выделены из сильно засоленных почв и солончаков и растут в основном в широком диапазоне рН. Особую группу составляют галоалкалофилы, растущие при высоких концентрациях соды и сочетающие свойства галофилов и алкалофилов. Таким образом, на основе проведенных селекционных работ создана коллекция экстремофильных (термо-, ацидо-, алкало- и галофильных) микроскопических грибов, насчитывающая 234 культуры. С целью более детальной качественной оценки галофильных микроскопических грибов выбраны два региона Восточной Грузии — равнинные солончаки Кахетии и Квемо Картли, характеризующиеся особенно высокой концентрацией соли, где, по имеющимся данным, могли концентрироваться галофильные микромицеты [20].

Установлено, что наиболее многочисленной и разнообразной галофильной микрофлорой, включая микроскопические грибы, характеризуются почвы в непосредственной близости от соленого озера Кумиси (Картли) и периферийных частей Алазанской долины, расположенных вдоль Кавказского хребта (Кахетия).

Выбранные для селекции галофильных микромицетов регионы действительно

оказались местами интенсивного обитания галофилов. Всего в результате экспедиций по солончакам Восточной Грузии выделено 196 галофильных культур микроскопических грибов, из них 94 — из засоленных почв Кахетинского региона и 102 — из солончаков Квемо Картли. Другая серия галофильных микроскопических грибов выделена из сильно засоленных озер в административном центре Сигнаги (поселок Красногорск) — 20 культур. Данные опытов приведены в табл. 1 и 2.

В результате опытов по анализу и селекции галофилов, встречаемых в солончаках Кахетинской равнины, выделены 4 культуры экстремально галофильных микромицетов, 14 галотолерантных, 16 умеренных и 10 слабогалофильных штаммов. После определения видовой принадлежности установлено, что из 4 экстремально галофильных культур 3 — представители рода *Aspergillus*. Группу галотолерантов составили культуры, относящиеся к родам *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alleheria* и *Penicillium*. Умеренные галофилы были представлены практически всеми существующими в регионе родами микроскопических грибов.

По некоторым данным [21], в солончаковых почвах галотолерантные формы микроорганизмов, занимающие усредненное положение по степени галофильности, количественно доминируют не только над негалофильными микроорганизмами, но и над другими формами галофилов той же таксономической группы. По результатам наших

Таблица 1. Культуры галофильных микроскопических грибов, выделенных в Восточной Грузии (Кахетия)

№	Микроскопический гриб	Среда выделения культур	Отношение к концентрации NaCl (М)	Оптимальная концентрация роста NaCl (М)	Степень галофильности
1	<i>Aspergillus</i> sp. A 25	Сильнозасоленная зона	1М–4М	3М	Экстремальный галофил
2	<i>Aspergillus</i> sp. A 26		1М–4М	3М	Экстремальный галофил
3	<i>Aspergillus</i> sp. A 27		0,2М–3М	2,5М	Галотолерант
4	<i>Aspergillus</i> sp. A28		0,5М–3М	2,5М	Галотолерант
5	<i>Aspergillus</i> sp. A29		1М–4М	3М	Экстремальный галофил
6	<i>Aspergillus</i> sp. A30		0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил
7	<i>Aspergillus</i> sp. A31		0,2М–3М	3М	Галотолерант
8	<i>Penicillium</i> sp. A32		0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил
9	<i>Penicillium</i> sp. A33		0,2М–3,5М	2,5М	Галотолерант
10	<i>Penicillium</i> sp. A34		0,2М–3,5М	3М	Галотолерант
11	<i>Penicillium</i> sp. A35		0,2М–4М	3М	Галотолерант
12	<i>Chaetomium</i> sp. A 37		0,2 М –3,5М	3М	Галотолерант
13	<i>Chaetomium</i> sp. A36		0,2 М –3,5М	3М	Галотолерант
14	<i>Chaetomium</i> sp. A38		0,2 М –3,5М	2,5М	Галотолерант
15	<i>Chaetomium</i> sp. A39		0,5 М –3М	3М	Умеренный галофил
16	<i>Fusarium</i> sp. A 43		1 М – 4М	3М	Экстремальный галофил
17	<i>Fusarium</i> sp. A44		0,2М–3М	3М	Галотолерант
18	<i>Trichoderma</i> sp. A 40		0,2М–3М	3М	Галотолерант
19	<i>Trichoderma</i> sp. A 41		0,2М–3М	2,5М	Галотолерант
20	<i>Trichoderma</i> sp. A 42		0,5М–3,5М	3М	Умеренный галофил
21	<i>Aspergillus</i> sp. A13	Среднезасоленная зона	0,5М–3М	3М	Умеренный галофил
22	<i>Aspergillus</i> sp. A14		0,5М–3М	3М	Умеренный галофил
23	<i>Penicillium</i> sp. A15		0,2М–3М	3М	Галотолерант
24	<i>Penicillium</i> sp. A16		0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил
25	<i>Penicillium</i> sp. A17		0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил
26	<i>Penicillium</i> sp. A18		0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил
27	<i>Penicillium</i> sp. A19		0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил
28	<i>Penicillium</i> sp. A20		0,2М–3,5М	2,5М	Галотолерант
29	<i>Cladosporium</i> sp. A21		0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил
30	<i>Cladosporium</i> sp. A22		0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил
31	<i>Mucor</i> sp. A23	0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил	
32	<i>Mucor</i> sp. A24	0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил	
33	<i>Aspergillus</i> sp. A1	Слабозасоленная зона	0,2М–2М	1,5М	Слабый галофил
34	<i>Aspergillus</i> sp. A2		0,2М–2М	1,5М	Слабый галофил
35	<i>Aspergillus</i> sp. A3		0,1М–2М	1,5М	Слабый галофил
36	<i>Aspergillus</i> sp. A4		0,1М–2М	1,5М	Слабый галофил
37	<i>Penicillium</i> sp. A5		0,2–2,5М	1,5М	Слабый галофил
38	<i>Penicillium</i> sp. A6		0,5М–3М	2,5М	Умеренный галофил
39	<i>Aspergillus</i> sp. A11		0,2–2,5М	1,5М	Слабый галофил
40	<i>Aspergillus</i> sp. A12		0,1–2М	1,5М	Слабый галофил
41	<i>Fusarium</i> sp. A7		0,15–0,2М	1,5М	Слабый галофил
42	<i>Fusarium</i> sp. A8		0,1–2,5М	1,5М	Слабый галофил
43	<i>Fusarium</i> sp. A9		0,1–2,5М	1,5М	Слабый галофил
44	<i>Fusarium</i> sp. A10		0,2–3М	2М	Галотолерант

Таблица 2. Культуры галофильных микроскопических грибов, выделенных в Восточной Грузии (Картли)

№	Микроскопический гриб	Отношение к концентрации NaCl (М)	Оптимальная концентрация роста NaCl (М)	Степень галофильности
	1	2	3	4
1	<i>Aspergillus niger</i> K10-15	0,2 М–3М	3М	Галотолерант
2	<i>A. niger</i> K 2-12	0,2 М–3М	2,5М	Галотолерант
3	<i>A. niger</i> K 8-16	0,2 М–3,5М	2,5М	Галотолерант
4	<i>A. niger</i> K 2-1	1 М–4М	3М	Экстремальный галофил
5	<i>Aspergillus flavus</i> K2-8	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
6	<i>Aspergillus</i> sp. K-1	1 М–4М	3М	Экстремальный галофил
7	<i>Aspergillus</i> sp. K-2	0,2М–4М	3М	Галотолерант
8	<i>Aspergillus</i> sp. K-3	0,2 М–2,0М	1М	Слабый галофил
9	<i>Aspergillus</i> sp. K-4	0,5 М–3,5М	2,5М	Галотолерант
10	<i>A. niger</i> K M6-11	0,5 М–2М	1М	Слабый галофил
11	<i>A. niger</i> K M11-18	1 М–4М	3М	Экстремальный галофил
12	<i>A. niger</i> KM2-5	0,3 М–2,0М	1М	Слабый галофил
13	<i>A. niger</i> K M2-2	0,2 М–2,5М	2М	Галотолерант
14	<i>Penicillium</i> sp. KM-5	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
15	<i>Penicillium</i> sp. KM-6	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
16	<i>Penicillium</i> sp. KM-7	0,2 М–3М	2,5М	Галотолерант
17	<i>Penicillium</i> sp. KM-8	0,2 М–3М	3М	Галотолерант
18	<i>Penicillium</i> sp. K-5-13	0,2 М–4М	2,5М	Галотолерант
19	<i>Penicillium</i> sp. K-9	1 М–4М	3М	Экстремальный галофил
20	<i>Penicillium</i> sp. K3-3	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
21	<i>Penicillium</i> sp. K6-2	0,2М–3М	2,5М	Галотолерант
22	<i>Penicillium</i> sp. KM-19	0,2 М–2,0М	1М	Слабый галофил
23	<i>Penicillium</i> sp. KM3-17	0,2 М–4М	2,5М	Галотолерант
24	<i>Penicillium</i> sp. KM4-4	1 М–4М	3М	Экстремальный галофил
25	<i>Penicillium</i> sp. KM6-3	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
26	<i>Penicillium</i> sp. KM6-1	0,2 М–3М	2,5М	Галотолерант
27	<i>Penicillium</i> sp. KM-10	1 М–4М	3М	Экстремальный галофил
28	<i>Penicillium</i> sp. K-12	0,2М–3М	2,5М	Галотолерант
29	<i>Penicillium</i> sp. KM-11	0,2 М–3М	2,5М	Галотолерант
30	<i>Penicillium</i> sp. KM-27	0,2 М–4М	2,5М	Галотолерант
31	<i>Penicillium</i> sp. KM-28	0,2 М–4М	2,5М	Галотолерант
32	<i>Trichoderma</i> sp. K2-3	0,2 М–3М	2,5М	Галотолерант
33	<i>Trichoderma</i> sp. K2-6	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
34	<i>T. lignrtum</i> K2-7	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
35	<i>Chaetomium</i> sp. KM4-2	0,2 М–3,5М	2,5М	Галотолерант
36	<i>Chaetomim</i> sp. KM1-3	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
37	<i>Chaetomium</i> sp. KM-14	0,5 М–3М	2 М	Слабый галофил
38	<i>Chaetomium</i> sp. KM-15	0,5 М–3М	2,5 М	Умеренный галофил
39	<i>Chaetomium</i> sp. KM-16	0,5 М–3М	0,5–3 М	Умеренный галофил
40	<i>Chaetomium</i> sp. KM-17	0,2 М–3М	2,5 М	Галотолерант

1	2	3	4	5
41	<i>Fusarium</i> sp. КМ3-1	0,2 М–4М	3М	Галотолерант
42	<i>Fusarium</i> sp. КМ3-5	1 М–4М	3М	Экстремальный галофил
43	<i>Fusarium</i> sp. КМ6-1	0,2 М–3М	2,5М	Галотолерант
44	<i>Fusarium</i> sp. КМ-18	0,2 М–3М	2,5М	Галотолерант
45	<i>Mucor</i> sp. К-19	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
46	<i>Mucor</i> sp. К-20	0,5 М–3М	2,5М	Умеренный галофил
47	<i>Mucor</i> sp. К-21	0,5 М–3М	2,5М	Галотолерант
48	<i>Mucor</i> sp. К-22	0,2 М–2,0М	1,5М	Слабый галофил
49	<i>Rhizopus</i> sp. К-23	0,2 М–3М	2,5М	Галотолерант
50	<i>Rhizopus</i> sp. К-24	0,2 М–2М	1М	Слабый галофил
51	<i>Rhizopus</i> sp. К-25	0,2 М–3М	2,5М	Галотолерант
52	<i>Rhizopus</i> sp. К-26	0,2 М–2М	1М	Слабый галофил

исследований большинство микрофлоры в солончаках равнин Квемо Картли составили галотолерантные формы микромицетов (рис. 2).

В солончаках соленых озер Кумиси и Красногорска установлено наличие 25 галотолерантных штаммов, 7 культур отнесены к экстремальным, 12 — к умеренным и 8 — к слабым галофилам. Следует отметить, что во всех родах микроскопических грибов, идентифицированных в солончаках этого региона, встречаются преимущественно галотолерантные формы микромицетов. Жизненный pH-диапазон подавляющего большинства галофильных культур колеблется в пределах кислотности от pH 3,0–4,0 до 8,0–10,0. Как показывают наши экспериментальные данные, для галоалкалифилов pH-диапазон роста и метаболической активности сдвинут в щелочную сторону — до pH 12,5. Несомненно, существование галоалкалифилов в средах обитания галофильных микроорганизмов — важный и интересный факт, поскольку щелочные среды в солончаках Восточной Грузии встречаются довольно часто и развиваться там могут только галотолерантные формы микроскопических грибов и бактерий.

Таким образом, по результатам экспедиций в засоленных регионах создана коллекция галофильных микроорганизмов, в которой содержится 96 культур микроскопических грибов. Проведенные исследования свидетельствуют, что в большинстве случаев, например в почвах с сильной засоленностью, преобладают галотолеранты и экстремальные галофилы и практически не встречаются слабые галофилы. В свою очередь, в слабоза-

соленных объектах крайне редко встречаются экстремальные галлофилы и доминируют слабогалофильные формы грибов (рис. 3).

Следует отметить, что созданная нами коллекция экстремофильных (галофильных) микроскопических грибов, насчитывающая более 300 культур, является одной из нескольких во всей Европе. Коллекция объединяет культуры галофилов, галоалкалифилов, галотермофилов, термофилов, алкалифилов, алкалитермофилов, ацидофилов и ацидотермофилов.

Определение степени экстремофильности микроскопических грибов в солончаках Грузии

Известно, что жизненные границы микроорганизмов определяет pH среды обитания. В природе чаще встречаются экосистемы с нейтральной или средней кислотностью, вследствие чего большинство микроорганизмов адаптировано к существованию в условиях умеренной концентрации водородных ионов (околонейтральной pH); однако существуют микроорганизмы, способные к росту при pH среды, существенно удаленной от нейтральной. Наглядным примером является наличие галоалкалифилов в солончаках. Базируясь на этой информации, можно было предположить наличие галоалкалифилов в созданной нами коллекции галофильных микроскопических грибов [22].

В табл. 3 и 4 представлены галофильные культуры грибов, проявляющие экстремальность по отношению к pH среды. Как видно из табл. 3, из 44 штаммов микроскопических

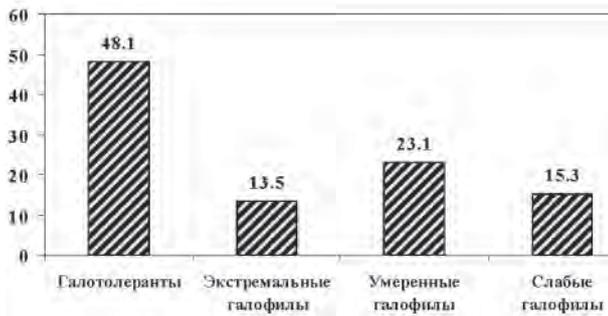


Рис. 2. Частота встречаемости родов микроскопических грибов, распространенных в солончаках равнины Квемо Картли

грибов, выделенных из солончаков Кахетии, 15 галофилов оказались экстремальными относительно кислотности среды. Среди них преобладали алкалофилы (10 культур). Сравнительно реже встречались рН-толеранты (5 культур). Почвы сильной степени засоленности также характеризовались обилием экстремофильных по отношению к рН микроорганизмов (9 экстремофилов). Из зоны средней степени засоленности отобраны лишь 2, а из зоны слабой засоленности — 4 экстремофильных гриба.

Известно, что некоторые представители родов *Penicillium*, *Fusarium* и *Aspergillus* способны к росту в диапазоне рН 2,0–10,0 [23]. Выявлены галофильные грибы, характеризующиеся рН-толерантностью и принадлежащие именно к этим родам. Наличие галоалкалофилов не установлено лишь в родах *Allesheria* и *Cladosporium* (табл. 3).



Рис. 3. Частота встречаемости галофильных микроскопических грибов в соленых почвах Кахетинской равнины

Подобно микрофлоре солончаков Кахетинской равнины, в выделенной микрофлоре засоленных почв Квемо Картли определялись алкалофильные штаммы (11 культур) (табл. 4). Кроме родов *Chaetomium* и *Mucor*, алкалофилы встречались почти среди всех родов микроскопических грибов, распространенных в солончаках равнины Квемо Картли, а рН-толерантные формы были характерны только для культур микроскопических грибов родов *Aspergillus*, *Chaetomium* и *Fusarium*.

Пять культур алкалофильных микроскопических грибов из коллекции солончаков Кахетинской равнины были оценены как экстремофилы одновременно по трем параметрам устойчивости — к рН, температуре и концентрации NaCl (*Aspergillus* sp. A 25, *Chaetomium* sp. A 36, *Trichoderma* sp. A40, *Trichoderma* sp. A41, *Fusarium* sp.

Таблица 3. Экстремофильные по рН микроскопические грибы, распространенные в солончаках Кахетинской равнины

№	Микроскопический гриб	Место взятия пробы	Жизненный рН-диапазон культуры	Оптимальное значение рН	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	рН-толерант
4	<i>Aspergillus</i> sp. A31		2,5–10,0	4–8,0	рН-толерант
5	<i>Penicillium</i> sp. A33		2,5–10,0	3,5–7,5	рН-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	рН-толерант
14	<i>Fusarium</i> sp. A8		2,5–10,0	4,5–8,0	рН-толерант
15	<i>Fusarium</i> sp. A10		4,5–10,0	9,0	Алкалофил

Таблица 4. Экстремофильные по pH микроскопические грибы, распространенные в солончаках равнины Квемо Картли

№	Микроскопический гриб	Жизненный pH-диапазон культуры	Оптимальное значение pH	Экстремофильность 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	Алкалифил
3	<i>Aspergillus niger</i> K2-8	4,0–10,0	9,0	Алкалифил
4	<i>Aspergillus niger</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> KM2-2	4,0–10,0	9,0	Алкалифил
7	<i>Penicillium</i> sp. KM-8	2,5–10,0	4,0–7,0	pH-толерант
8	<i>Penicillium</i> sp. K6-2	4,0–10,0	9,0	Алкалифил
9	<i>Penicillium</i> sp. KM3-17	2,5–10,0	5,0–7,0	pH-толерант
10	<i>Penicillium</i> sp. KM6-3	4,0–10,0	9,0	Алкалифил
11	<i>Penicillium</i> sp. KM-12	2,5–10,0	5,0–7,0	pH-толерант
12	<i>Trichoderma</i> sp. K2-6	5,0–10,0	9,0	Алкалифил
13	<i>Trichoderma</i> sp. 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</i> sp. KM-15	2,5–10,0	5,0–7,0	pH-толерант
16	<i>Fusarium</i> sp. KM3-1	2,5–10,0	5,0–7,0	pH-толерант
17	<i>Fusarium</i> sp. KM6-1	5,0–10,0	9,0	Алкалифил
18	<i>Rhizopus</i> sp. K-24	4,0–10,0	9,0	Алкалифил

A10), а из микрофлоры солончаков равнины Квемо Картли экстремофильными оказались 4 культуры (табл. 5).

С целью характеристики выделенных из разных экологических ниш Кавказа экстремофильных культур микроскопических грибов проведен скрининг продуцентов энзимов (α -амилаза, глюкоамилаза, целлюлаза, ксиланаза, протеиназа и пектиназа) в условиях глубинного культивирования [24].

В результате выявлены 27 штаммов-продуцентов α -амилазы, 43 — глюкоамилазы, 42 — целлюлазы, 16 — ксиланазы, 4 — протеиназы и 2 — пектиназы (опыты продолжаются). Из них 17 культур характеризуются способностью продуцирования двух энзимов, а 25 культур-продуцентов энзимов являются экстремофилами по двум признакам.

Наиболее активные продуценты α -амилаз — черные и зеленовато-желтые аспергиллы-галофилы. Среди продуцентов целлюлаз преобладают роды *Aspergillus*, *Chaetomium* и *Penicillium* [25].

Метаболическую активность галофильных/галоалкалифильных микроскопиче-

ских грибов оценивали и по их способности осуществлять детоксикацию контаминантов разной химической структуры. С этой целью грибы-галофилы инкубировали с токсическими соединениями как в поверхностных, так и в погруженных (глубинных) условиях культивирования. В частности, в питательную среду вносили бензол, тринитротолуол (ТНТ) и углеводороды нефти (в отдельных опытах радиоактивные по углеродному атому).

Рассматриваемый вопрос может стать предметом отдельного патента или объемной публикации, а здесь отметим, что некоторые грибы галофилы являются активными деструкторами всех вышеуказанных токсических соединений, существенно понижая их концентрации, а в ряде случаев полностью метаболически трансформируя углеродный скелет токсикантов (окислительная деградация) до уровня обычных клеточных метаболитов. Несомненно, детоксикационная активность галофильных микроскопических грибов дают основание по-новому оценить их экологический потенциал.

Таблица 5. Разносторонние экстремофильные микроскопические грибы, распространенные в солончаках Грузии

Зона	Название культуры	Характеристика культуры
Регион Кахети	<i>Aspergillus</i> sp. A26	Алкалифил, термофил, экстремальный галофил
	<i>Chaetomium</i> sp. A36	Алкалифил, термофил, галотолерант
	<i>Trichoderma</i> sp. A40	Алкалифил, термотолерант, галотолерант
	<i>Trichoderma</i> sp. A41	Алкалифил, термотолерант, умеренный галофил
	<i>Fusarium</i> sp. A10	Алкалифил, психротолерант, галотолерант
Регион Квемо Картли	<i>Aspergillus</i> sp. К2	pH-толерант, термофил, галотолерант
	<i>Aspergillus</i> sp. КМ 2-2	Алкалифил, термотолерант, галотолерант
	<i>Trichoderma</i> sp. К 2-6	Алкалифил, термофил, умеренный галофил
	<i>Fusarium</i> sp. К 3-1	pH-толерант, психротолерант, галотолерант

REFERENCES

- Oren A. Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999, 63 (2), 334–348.
- Rengpipat S., Lowe S., Zeikus J. Effect of Extreme Salt Concentration on the Physiology and Biochemistry of Halobacterioides acetoethylicus. *J. Bacteriol.* 1988, 3 (65), 3071.
- Rothschild L. J., Giver L. J., White M. R., Mancinelli R. L. Metabolic activity of microorganisms in evaporates. *J. Mycol.* 1994, V. 30, P. 431–438.
- Fomin G. S., Fomin A. G. Soil. Monitoring on quality and ecologic safety in accordance with international standards. *Moscow (VNI standard)*. 2001, P. 86.
- Zviagintsev D. G. Methods of Soil Microbiology and Biochemistry. *Moscow State University*. 1980, P. 12–19.
- Waksman S. A. Soil fungi and their activities. *Soil. Sci.* 1916, 2 (1), 103–105.
- Litvinov M. A. Determinates of microscopic soil fungi. *Leningrad*. 1967, 280 p.
- Malloch D. Moulds, Their Isolation, Cultivation, and Identification. *University of Toronto Press. Toronto–Buffalo–London*. 1981, 114 p.
- Frank M. Dugan. The Identification of Fungi. The American Phytopathological Society. *St. Paul, Minnesota U S A*. 2006, 134 p.
- Dudka N. A. The methods of experimental mycology. Kiev. 1982, 439 p. (In Russian).
- Ventosa A., Nieto J. J., Oren A. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Microorganisms. *MMBR*. 1998, V. 62, P. 504–544.
- Demirjian D. C., Moris-varas F., Cassidy C. S. Enzymes from extremophiles. *Cur. Op. Chem. Biol.* 2001, V. 5 (2), 144–151.
- Rukhlyadea A. P., Goryacheva M. T. Determination of enzymes amyolytic activity. *Enzymes and alcohol industry*. 1960, V. 1, P. 9.
- Dahlgvist A. J. Determination of glucoamylase activity. *Biochem.* 1961, V. 80, P. 547.
- Ghose T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 1987, V. 59, P. 257–268.
- Somogyi M. Determination of reducing sugars. *J. Biol. Chem.* 1952, V. 195, P. 199–228.
- Nelson N. A. Protometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 1944, P. 153–157.
- Anson M. Z. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cothepsin with hemoglobin. *Gen. Physiol.* 1938, 22 (1), 79–83.
- Kvesitadze E., Adeishvili E., Gomarteli M., Kvachadze L., Kvesitadze G. Cellulase and xylanase activity of fungi in a collection isolated from the southern Caucasus. *Intern. Biodeter. Biodegr.* 1999, V. 43, P. 189–196.
- Lizama C., Monteoliva-Sánchez M., Suárez-García A., Roselló-Mora R., Aguilera M., Campos V., Ramos-Cormenzana A. Halorubrum tebenquichense sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from the Atacama Saltern, Chile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002, V. 52, P. 149–155.
- Hildebrandt U., Janetta K., Ouziad F., Renne B., Nawrath K., Bothe H. Arbuscular micorrhizal colonization of halophytes in central European salt marshes. *Micorrhiza*. 2001, V. 10, P. 175–183.
- Razak A. A., Bachmann G., Ali Th. M., Farag R. Activities of microflora in soils of upper and lower Egypt. *African J. Mycol. Biotech.* 1999, 7 (1), 1–19.
- Kvesitadze G. I. Enzymes of Microorganisms Living under Extreme Conditions. Ed.

- W. Kretovich. *Moskva: Nauka*. 1990, 52 p. (In Russian).
24. Kvesitadze G. I., Kvachadze L. L., Kvesitadze E. G. Selection of thermophilic cellulase-producing micromycetes. *Appl. Biochem. Microbiol.* 1997, V. 33, P. 132–137.
25. Kvesitadze E. G., Nizharadze D. N., Buachidze T. Sh., Kvesitadze G. I. Thermostability and physical-chemical properties of endo- and exoglucanases of thermophilic microscopic fungi. *Biochemistry.* 1997, V. 62, P. 176–183.
-
-

ГАЛОФІЛЬНІСТЬ МІЦЕЛІАЛЬНИХ ГРИБІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ СОЛОНЧАКІВ ПІВДЕННОГО КАВКАЗУ

E. Kvesitadze

Грузинський технічний університет,
Тбілісі, Грузія

E-mail: blgeorgia@gmail.com

Роботу присвячено виділенню, очищенню, таксономічній характеристиці та оцінюванню можливості практичного використання в біотехнологічних процесах сільського господарства культур галофільних мікроскопічних грибів із солончаків Східної Грузії (середня частина Південного Кавказу). В усіх ґрунтово-кліматичних зонах домінують роди *Aspergillus*, *Penicillium* і *Fusarium*, далі *Trichoderma* та *Mucor*, решта — трапляються порівняно рідко. Рід *Aspergillus* широко представлений у каштановому ґрунті й чорноземі. У сірому лісовому ґрунті переважає *Penicillium*. За результатами експедицій у засолених регіонах створено колекцію галофільних мікроорганізмів, що налічує 96 ізолятів мікроскопічних грибів. Проведені дослідження свідчать про те, що в ґрунтах із сильною засоленістю переважають галотолеранти та екстремальні галофіли і практично відсутні слабкі галофіли. У слабозасолених ґрунтах вкрай рідко трапляються екстремальні галофіли, а домінують слабогалофільні форми грибів.

Ключові слова: галофіли, мікроскопічні гриби, екстремофіли, ензими.

THE HALOPHILICITY OF FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM SALINE SOILS OF SOUTH CAUCASUS

E. Kvesitadze

Georgian Technical University,
Tbilisi, Georgia

E-mail: blgeorgia@gmail.com

The work is devoted to the isolation, purification, determination of taxonomical characteristics and application in soil improvement and other biotechnological processes halophilic microscopic fungi strains isolated from saline soils of Eastern Georgia (middle part of South Caucasus), where their existence is maximally supposed. In all soil-climatic zones the dominate forms of spread fungi are genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, followed by *Trichoderma* and *Mucor*. Other genera are met less intensively. The genera *Aspergillus* is widely spread in chestnut soils and in black soil, in green forest soils the genera *Penicillium* is prevailing. According to the results of our expeditions to the regions with high salinity, the collection of 96 halophilic microscopic fungi has been created. The investigations showed that halotolerants and extreme halophiles dominated in highly saline soils, while weak halophiles were practically absent. In the soils with weak salinity weak halophiles prevailed.

Key words: halophiles, microscopic fungi, extremophiles, enzymes.