

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ ЗОНЫ ГАРАДАГСКОГО ЦЕМЕНТНОГО ЗАВОДА «HOLCIM»

ENZYME ACTIVITY OF MICROMYCETES ISOLATED FROM SOILS IN THE ZONE OF “HOLCIM” GARADAGH CEMENT PLANT

S. Kasumova
I. Babayeva
L. Aliyeva
V. Isayeva

Summary. A quantitative composition of microorganisms in the soil of “Holcim” Garadagh Cement plant (CP), which is located on Absheron peninsula, was studied. It was found that while the number of bacteria decreases, the number of fungi as well as actinomycetes increases, when the distance to CP lessens. Among the isolated micromycetes from 12 genera — *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Mycella*, *Alternaria*, *Mortirella*, *Acremonium* — toxigenic and allergenic species were detected. Isolated micromycete cultures were tested for ability to show the activity of 8 enzymes: protease, gelatinase, urease, phospholipase C, lipase, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase. The percentage of positive tests results on the enzyme activity has shown a growth, depending on increasing distance to CP.

Keywords: soil, microorganisms, micromycetes, enzymes, ecology.

Касумова Светлана Юсиф кызы

Институт Микробиологии НАН Азербайджана
г. Баку

kasumova-kasumova@mail.ru

Бабаева Ирада Халид кызы

В.н.с., Институт Микробиологии НАН Азербайджана
г. Баку

babayevairada@mail.ru

Алиева Лала Ариф кызы

С.н.с., Институт Микробиологии НАН Азербайджана,
г. Баку

lalaaliev@mail.ru

Исаева Вусаля Камаледдин кызы

М.н.с., Институт Микробиологии НАН
Азербайджана, г. Баку

isayevavusale33@gmail.com

Аннотация. Изучен количественный состав микроорганизмов почв Гарадагского цементного завода (ЦЗ) «Holcim» Апшеронского полуострова и обнаружено, что по мере приближения к ЦЗ наблюдается уменьшение численности бактерий и увеличение количества грибов и актиномицетов. Среди выделенных микромицетов из 12 родов — *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Mycella*, *Alternaria*, *Mortirella*, *Acremonium* — обнаружены токсигенные и аллергенные виды. Выделенные культуры микромицетов были испытаны на способность проявлять активность 8 ферментов: протеаза, желатиназа, уреазы, фосфолипаза С, липаза, каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза. Процент положительных результатов теста на активность ферментов показал его увеличение по мере удаления от цементного завода.

Ключевые слова: почва, микроорганизмы, микромицеты, ферменты, экология.

Введение

В настоящее время загрязнение окружающей природными и техногенными поллютантами остаётся серьёзной проблемой. На сельскохозяйственные территории попадают такие опасные загрязнители почвы как нефть, отходы и выбросы химических предприятий, включая металлургические, цементные и многие другие. Кроме того, отходы этих предприятий оказыва-

ют значительное воздействие на состав и свойства почв, что в свою очередь отражается на здоровье населения близлежащих населённых пунктов. Растущее число новых ксенобиотиков не всегда позволяет провести объективную оценку их воздействия на среду обитания и на почву, в частности. Поэтому, растёт интерес к микроорганизмам — биоиндикаторам, с помощью которых можно оценить воздействие токсикантов на окружающую среду.

Таблица 1. Численность микроорганизмов в исследуемых почвах

Удаленность опытных участков от цементного завода	Численность микроорганизмов		
	Бактерии (10 ⁷ КОЕ/г)	Грибы (10 ⁴ КОЕ/г)	Актиномицеты (10 ⁴ КОЕ/г)
1	80	308	268
2	104	278	236
3	115	258	224
4	120	210	206
контроль	142	170	193

Примечание: 1–100 м от, 2–500 м, 3–1500 м, 4–2500 м, контроль –5000 м

Как известно, микроскопические грибы являются одним из важных компонентов почвенного биогеоценоза и осуществляют в нем редукцию органического вещества. Из всех групп микроорганизмов именно микромицеты наиболее устойчивы к техногенному загрязнению, так как обладают мощной ферментативной системой и обильным спорообразованием [10,11,15]. В связи с этим, в последнее время многими исследователями микромицеты и их ферменты активно изучаются в качестве возможных биоиндикаторов различных типов техногенного воздействия, таких как, нефтяное загрязнение [3,10,15], отходов металлургических производств [1], выбросов цементных заводов [5,6,12,13,16], лигниновых шламоотвалов [9] и др.

Учитывая вышесказанное, целью нашей работы было изучение микромицетов почвы в зоне действия выбросов Гарадагского ЦЗ «Holcim» Апшеронского полуострова.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования служили образцы серо-бурых почв Апшерона, которые отбирали с опытных участков, расположенных на расстоянии 100, 500, 1500 и 5000 м от Гарадагского ЦЗ «Holcim». Выделение и определение общего количества микроорганизмов из почв осуществлялось общепринятыми методами [4]. Полученные чистые культуры микромицетов идентифицировали классическими методами почвенной микробиологии путем проведения культурально-морфологических и физиолого-биохимических тестов [2,4]. Идентификацию культур проводили, руководствуясь определителями [7, 17]. Для определения пероксидазной и фенолоксидазной активности на поверхности мицелиальной

колонии с помощью цветowych химических реакций применяли следующие тесты: для определения пероксидазы — с пирогаллолом и H₂O₂, для полифенолоксидазы — с танином (тест Бавендамма) [2]. Протеолитическую активность штаммов визуально определяли по образованию просветленных зон или зон разжижения на чашках Петри с МПА и молоком; желатиназную активность на мясо-пептонной желатине [2]. Каталазную активность определяли методом перманганатометрического титрования [2]. Для изучения лецитиназы (фосфолипазы С -ФЛС) использовали твердые и жидкие питательные среды с добавлением яичного желтка по положительной лецитин-вителлиновой реакции [8]. Для определения активности фермента уреазы проводили посев штаммов на твердую агаризованную среду с 10 г/л мочевины и 2 мг/л 1,6% спиртового раствора крезолового красного [1]. Долю разных видов ферментативной активности рассчитывали по формуле: $E=A/B$, где А — количество баллов (положительных результатов теста), В — количество видов активности [1].

Результаты и их обсуждение

При исследовании количественного состава микроорганизмов в почвах в районе цементного завода почвенные суспензии высевались на селективные среды. Выросшие колонии плесневых и дрожжевых грибов, актиномицетов, бактерий оценивались по культурно-морфологическим особенностям. Результаты исследований показали, что в изученных образцах почв больше 50% выделенных бактерий относятся к роду *Bacillus*, 30% — к роду *Pseudomonas*. Остальные бактерии были представлены кокками. Результаты микробиологического анализа (таб.1) показали, что численность микроорганизмов различных таксономических групп в почвенных образцах варьирует в зависимости от места их взятия.

Таблица 2. Ферментативная активность выделенных почвенных микромицетов

Название вида	Ферментативная активность							
	протеаза	желатиназа	уреаза	фосфолипаза С	липаза	каталаза	пероксидаза	полифенол-оксидаза
<i>Asperillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>A.fumigatus</i>	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>A.niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>A.terreus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>A.terricola</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>A.versicolor</i>	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>A. ochraceus</i>	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>A. ruber</i>	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>A. sydowii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium cyclopium</i>	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>P. chrysogenum</i>	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>P. granulatum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. spinulosum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. ochraceum</i>	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>P. funiculosum</i>	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>P. lanosum</i>	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>P. notatum</i>	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Fuzarium moniliforme</i>	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>F. solani</i>	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>Trichoderma viride</i>	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>Cladosporium herbarum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. brevicompactum</i>	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Chaetomium globosum</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Rhizopus nigricans</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>R. stolonifer</i>	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Mucor hiemalis</i>	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>M. griseo-cyanus</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Mycella sterilla</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mortirella ramanniana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acremonium strictum</i>	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	+	+	+	+	+	-	-

Примечание: (+),(±) — наличие активности; (-)- отсутствие



Рис 1. Эколого-трофическая характеристика грибов, выделенных из почв территории Гарадагского ЦЗ

Так, во всех образцах почв наблюдается изменение состава и уменьшение численности бактерий, которое значительно проявляется в образцах почв № 1 и № 2. В количественном содержании грибов и актиномицетов во всех образцах почв наблюдается тенденция к увеличению их числа по мере приближения к ЦЗ, что совпадает с данными работы Казаковой А. Н. по изучению почв в зоне Ульяновского ЦЗ [5].

Выделенные из исследованных почв штаммы микромицетов включали 33 вида грибов, относящихся к 12 родам — *Aspergillus* (9), *Penicillium* (9), *Fusarium* (3), *Trichoderma*, *Cladosporium* (2), *Chaetomium*, *Rhizopus* (2), *Mucor* (2), *Mycella*, *Alternaria*, *Mortirella*, *Acremonium* — по одному виду. Как видно, подавляющее большинство выделенных грибов принадлежат родам *Penicillium* и *Aspergillus*.

Известно, что грибы в том или ином биотопе характеризуются эколого-трофическими взаимоотношениями, а также токсигенностью и аллергенностью, и выяснение этого вопроса важно для понимания природы выполняемых грибами функций. По этой причине было сочтено целесообразным охарактеризовать в этом аспекте результаты, полученные в ходе данных исследований. Результаты исследования отражены в диаграмме (рис.) Все выделенные культуры микромицетов были испытаны на способность проявлять активность следующих 8 ферментов: протеаза, желатиназа, уреазы, фосфолипаза С, липаза, каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза.

Все выделенные культуры микромицетов были испытаны на способность проявлять активность следующих 8 ферментов: протеаза, желатиназа, уреазы, фосфолипаза С, липаза, каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза. Как видно из таблицы № 2, протеолитическая активность на молочном агаре отмечается у большинства штаммов, что составляет 78,7% от общего количества всех испытанных культур. Процент культур, разжижающих желатин составил 39,3%, фосфолипазы — у 42,2%, липолитические ферменты были обнаружены у 33,35%, каталазную активность проявляли 60,6% испытанных культур. Самый низкий процент отмечен в отношении уреазной активности — у 27,2%. Активность фермента пероксидазы и полифенолоксидазы проявляли лишь единичные штаммы микромицетов — 6 и 4 соответственно.

Долевое соотношение разных видов ферментативной активности, рассчитанное по формуле, предложенной Берсеновой О. А. [1] показало, что процент положительных результатов теста увеличивается по мере удаления от цементного завода. Так, на расстоянии 100 м от завода доля разных видов активности составляла 29,25%, 500 м — 30,5%, 1500 м — 33,4%, 2500 м — 38%, 5000 м — 45,15%.

Таким образом, обнаружение токсигенных и аллергенных видов среди выделенных грибов, а также результаты изучения их ферментативной активности в исследуемых почвах могут быть использованы для биоиндикации и диагностики при оценке экологического состояния почв и их загрязнения техногенными поллютантами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берсенова О. А. Ферментативная активность микробиоты как интегральный показатель экологического состояния почв в зоне влияния металлургических производств // Биологические науки, 2015, № 2, с. 164–171.
2. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии. К.: Наук. Думка, 1982, 550 с.
3. Водянова М. А., Тарасова Ж. Е. Микроскопические почвенные грибы-организмы — биоиндикаторы нефтезагрязненных почв // Hygiene and Sanitation, 2016, 95(9), с. 891–894.
4. Егоров Н. С. Практикум по микробиологии. М., 1976, 307 с.
5. Казакова Н. А. Изменение микробного состава и токсичности почв в зоне влияния выбросов цементного производства // Современные концепции научных исследований: Сборник научных работ IV Международной научно-практической конференции, Москва, 2014, № 4, ч. 3, с. 71–72.
6. Казакова Н. А. Экологическая роль почвы в условиях техногенной нагрузки цементного производства // Наука и современность: Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции, Киев, 2013, вып. 3, с. 14–15.
7. Литвинов М. А. Определитель микроскопических грибов. Л.: Наука, 1967, 303 с.
8. Полховский В. А. Лецитиназная активность штаммов *V. cereus*, выделенных из различных природных источников // Микробиология, 1970, т. 39, вып. 4, с. 567–573.
9. Синцов К. Н., Старкова Е. В., Мартинсон Е. А., Литвинцев С. Г. Микромицеты лигниновых шламоотвалов // Материалы докладов на XVIII Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека», 2013, с. 1961–1964.
10. Турковская О. В., Дубровская Е. В., Гринев В. С. Деструктивная активность и продукция внеклеточных пероксидаз у микромицетов с различной экологической стратегией // Сельскохозяйственная биология, 2019, том 54, № 1, с. 65–75.
11. Bilen S. Effect of cement dust pollution on microbial properties and enzyme activities in cultivated and no-till soils // African J. Microbiology Research, 2010, 4(22), p. 2418–2425.
12. Bijik H., Imali A., Atalan E., Tufenkci S. et al. Diversity of Microfungi in Soil Polluted by Cement Factory // Fresenius Environmental Bulletin, 2005, 14(15), p. 130–137.

13. H.O. Odu, N.N. & Immanuel O. M., Stanley H. O. Impact of cement dust pollution on physicochemical and microbiological properties of soil around lafarge cement WAPCO, Ewekoro, Southwestern Nigeria // J.A.B.R, 2014, vol. 4(4), p.400–404.
14. Hemida S. K. Fungal and Bacterial Populations in Cement-Incorporated Soil // International Journal of Agriculture & Biology, 2005, 7 (2), 158–161.
15. Kadri T., Rouissi T., Brar S. K., Cledon M. et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal enzymes: A review.// J. Environ. Sci., 2017, 51(1), p. 52–74.
16. Addo M.A., Darko E. O., Gordon C., Nyarko B. J.B. Contamination of soils and loss of productivity of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) caused by cement dust pollution. International Journal of Research in Chemistry and Environment, 2013, 3(1), p. 272–282.
17. Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species. Florida, 2000, p. 411–415.

© Касумова Светлана Юсиф кызы (kasumova-kasumova@mail.ru), Бабаева Ирада Халид кызы (babayevairada@mail.ru),
Алиева Лала Ариф кызы (lalaalieva@mail.ru), Исаева Вусаля Камаледдин кызы (isayevavusale33@gmail.com).
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Баку