

ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL AND ENZYMATIC ACTIVITY OF SOME FUNGI ISOLATED FROM VARIOUS ENVIRONMENTAL CONDITIONS

**P. Omar
E. Yunusov
S. Veliyeva
Sh. Asadova**

Summary: As a result of the studies carried out, fungi that are common in the biotopes of Azerbaijan with different environmental conditions were isolated into a pure culture, and a collection of 101 strains was created. It was found that among the micro- and macromycetes included in the collection, mesophiles predominate, and thermotolerant species are also found among them. It was revealed that among fungal cultures there are cultures with both hydrolytic and oxidoreductase activity, some of them are promising due to a balanced enzyme system, and some — due to the activity of a particular enzyme.

Keywords: different ecological conditions, fungi, hydrolases, oxidoreductases, active producers.

Омар Парвин Мирдамет

Сотрудник,

Сумгаитский Государственный Университет

peri.omar87@gmail.com

Юнусов Эльшад Рустам

Диссертант (PhD), Институт Микробиологии МНО АР

elsadyunuslu@gmail.com

Велиева Сафура Сахиб

Преподаватель,

Бакинский Государственный Университет

veliyeva.safura@mail.ru

Асадова Шабнам Фахраддин

Преподаватель,

Азербайджанский Государственный Университет

bioloq82@mail.ru

Аннотация. В результате проведенных исследований выделены в чистую культуру грибы, распространенные в биотопах Азербайджана с различными экологическими условиями, и создана коллекция из 101 штамма. Обнаружено, что среди включенных в коллекцию микро- и макромицетов преобладают мезофилы, среди них встречаются и термотолерантные виды. Выявлено, что среди грибных культур присутствуют культуры как с гидролитической, так и с оксидоредуктазной активностью, некоторые из них перспективны за счет сбалансированной ферментной системы, а некоторые — за счет активности конкретного фермента.

Ключевые слова: различные экологические условия, грибы, гидролазы, оксидоредуктазы, активные продуценты.

Увеличение численности населения земного шара на стабильной территории Земли создает для различных областей ощутимые трудности в удовлетворении потребности в энергии, продовольствии и сырье за счет имеющихся ресурсов и возможностей [13]. Стоит помнить еще об одном факте, что, согласно некоторым прогнозам, потребность населения мира в продуктах вырастет с 2010 по 2050 год на 45–56 %, а число населения, рискующего стать голодающим, будет варьироваться в пределах 8 % до 91 % [18]. Поэтому решение этих вопросов, придание управляемости возникшим, в связи с этим проблемам и обеспечение устойчивого развития общества являются одними из основных задач, стоящих перед современной наукой, прежде всего, современной биологией.

В обеспечении потребностей людей в продуктах питания, энергии и сырье различных отраслей промышленности роль растений и животных всегда традиционно была ведущей и этот статус они сохраняют до сегодняшнего дня [16]. Еще с древних времен определенную роль

в удовлетворении пищевых потребностей людей играли и микроорганизмы [14]. В соответствии с уровнем развития науки и техники возможности использования микроорганизмов расширялись и продолжают расширяться. Основная причина этого заключается в том, что микроорганизмы и образующиеся в результате их жизнедеятельности метаболиты с точки зрения удовлетворения спроса людей в получении пищи, энергии являются благоприятными и рентабельными. Так, к числу метаболитов, вырабатываемых микроорганизмами в результате их жизнедеятельности, относятся ферменты, полисахариды, антибиотики, витамины, органические кислоты и др. вещества [17], обладающие биологической, в том числе фармакологической активностью. Получение этих веществ выгодно как по экологическим, так и по экономическим и технологическим соображениям. Поскольку микроорганизмы положительно отличаются от растений и животных по скорости своего роста, они способны трансформировать образующихся в процессе роста самые разнообразные отходы растений в продукты богатые белком, сахаром, жиром и др., а технологии и ус-

ловия, необходимые для их культивирования в искусственных условиях для получения целевых продуктов, намного проще и дешевле применяемых к растениям и животным. В то же время микроорганизмы по сравнению с растениями и животными характеризуются превосходящими показателями по урожайности с единицы площади. Все это приводит к возрастающему из года в год интересу к микроорганизмам, в первую очередь, к бактериям и грибам, а также росту ассортимента и количества получаемой из них продукции.

На фоне вышеперечисленных проблем современная эпоха также характеризуется возникновением глобальных проблем (изменение климата, ухудшение экологической обстановки, утрата биоразнообразия, засоление, опустынивание и т.д.) в результате возрастающего антропогенного воздействия на окружающую среду. Это, в свою очередь, вызывает дополнительные эффекты в сторону ухудшения и без того непростой ситуации, изменяет характер и направленность отношений, сложившихся в экосистемах. Предотвращение их является первым шагом, который необходимо предпринять, изучая процессы, происходящие в этих экосистемах, представляющих собой экстремальные условия или состояния стресса. С другой стороны, изучение живых существ в таких условиях, прежде всего микроорганизмов, интересно и с практической точки зрения. Так, микроорганизмы, обитающие в биотопах с такими экстремальными условиями и обычно называемые экстремофилами, привлекают внимание как источники БАМ, в первую очередь ферментов, сохраняющих устойчивость в более широких и более высоких показателях температуры и pH [12]. Кроме того, возможность использования сохраняющих жизнеспособность в этих условиях микроорганизмов при очистке территорий, сильно загрязненных различными веществами (нефтью и нефтепродуктами, отходами различных производств и т.д.), а также как источников генов, позволяющих получать новых рекомбинантных суперпродуцентов с широким спектром возможностей, увеличенный спрос на более эффективные в биологическом контроле организмы и т.д. являются основными причинами роста интереса к таким микроорганизмам.

Как и во всем мире, в Азербайджанской Республике существуют ценозы, находящиеся в экстремальных условиях, к числу которых можно отнести нефтезагрязненные, сильнозасоленные почвы, источники термальных вод и т.д. [15]. В такого рода районах проводились определенные исследования [6–7, 10], но их результаты недостаточны для выяснения характера происходящих там процессов, равно как и для оценки биосинтетического потенциала обитающих в этих местах микроорганизмов, прежде всего микромицетов.

Поэтому целью представленной работы явилось выделение в условиях Азербайджана микромицетов

из разных по экологическим условиям и экстремальности источников, а также оценка их антибиотической и ферментативной активности.

Материал и методы

Образцы для исследования были взяты из нефтезагрязненных и сильнозасоленных почв Азербайджана, субтропических лесов с наибольшим количеством осадков в стране, термальных водных источников и с растений, выращенных в теплицах. Образцы нефтезагрязненных почв были взяты из Абшеронского полуострова, пробы почвы и воды, подвергшиеся засолению, взяты из озера Масазыр и его территории, образцы почв и растений территории с наибольшим количеством осадков взяты из субтропических лесов юга страны, а образцы субтропических и тропических растений взяты из оранжерей Центрального Ботанического сада. Для отбора образцов использовали известные в микробиологии и микологии методы [5, 8]. Для выделения микромицетов использовали стандартные питательные среды, а именно сусло-агар и агар Сабуро, чистоту полученной культуры контролировали микроскопически. При изучении ферментативной активности грибов использовали жидкую среду Чапека и условия глубинного культивирования. Исследование ферментативной активности проводили по таким ферментам, как эндоглюканаза, ксиланаза, амилаза, протеаза, липаза, пектиназа, лакказа и пероксидаза. Активность этих ферментов определяли с использованием специфических субстратов известными методами, т.е. эндоглюканазы [2] и пектиназы [4] — вискозиметрически, протеазы — методом Ансона, амилазы — колориметрически, ксиланазы — методом Шомоди-Нельсона [4], лакказы и пероксидазы — спектрофотометрически [9].

Антибиотическую активность в отношении стандартных тест-культур (кишечная палочка, синегнойная палочка, золотистый стафилококк и *Candida albicans*) определяли по следующей методике: тест-культуры переносили в пробирки, содержащие эндогенные (полученные из переработанной биомассы, измельченной в гомогенизаторе) и экзогенные (культуральная жидкость) метаболиты исследуемого гриба и после 30 и 60 мин хранения высевали на питательную среду. Антибиотическую активность оценивали по интенсивности роста. Антибиотическую активность культур, считающихся наиболее активными по этому методу, оценивали также на основе диско-диффузионного метода [1].

Определение биотехнологического потенциала микромицетов, выбранных в качестве активных продуцентов, проводили согласно [11] применяемым в настоящее время в биотехнологических исследованиях.

Для получения количественных результатов в исследованиях все эксперименты проводили не менее

чем в 4-х повторностях и полученные результаты подвергали статистической обработке на основе определения стандартного среднеквадратичного отклонения [3]. В диссертации использовались только данные, удовлетворяющие формуле $S/X_0 \leq 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение

Согласно цели работы были проведены исследования с выделением грибов из различных биотопов с разными условиями, и в результате анализа образцов, взятых на данном этапе, в чистую культуру было выделено 78 штаммов грибов. Распределение выделенных штаммов по территориям отбора проб приведено в таблице 1. Как видно, наибольшее число штаммов было выделено из образцов, отобранных из южных лесов, а наименьшее — из термальных источников.

Таблица 1.

Характеристика выделенных в чистую культуру штаммов по месту взятия образцов

№	Место взятия образца	Число выделенных штаммов(ед.)		Доля штаммов в общем числе(%)	
		I	II	I	II
1	Нефтезагрязненные почвы	21		20,8	
2	Озеро Масазыр	17		16,8	
3	Источники термальных вод	9		8,9	
4	Леса высокой влажности	29		28,7	
5	Теплицы	25		24,8	
Всего		101		100	

Необходимо отметить два момента, связанных с данными таблицы, первый из которых связан с присутствием в числе выделенных чистых культур макромицетов. Так, 12 выделенных в чистую культуру грибов, т.е. около 11,9 %, относятся к ксилотрофным макромицетам, все они были выделены из лесов южного региона с целью сравнения их с микромицетами. Цель данного сравнения была связано лишь с определением того, какие из выделенных штаммов перспективны для биоконверсии лигноцеллюлозных отходов растительного происхождения.

Второй момент заключается в том, чтобы охарактеризовать выделенные из образцов штаммы по их отношению к температуре. Так, хотя данные в таблице показывают общее количество зарегистрированных штаммов, при их выделении использовались два подхода, первый из которых включает классический, а второй — специфический подход. Так, по первому варианту проводят непосредственное выделение культур из образцов, а по второму — после выдержки образца при 50°C в течение 24 часов выделение в чистую культуру проводят соответственно первому варианту. При отдельной характе-

ристике штаммов на основе этих подходов выявлено, что большинство зарегистрированных штаммов относятся к мезофилам (табл. 2). Как видно, среди 89 выделенных штаммов микромицетов 80 % относятся к мезофильным, а 20 % можно отнести к термотолерантным. Так, при выдержке образцов при температуре выше 75°C в течение 24 часов не сохраняли свою жизнеспособность принадлежащие грибам какие-либо структурные элементы, а точнее ни одна из образующей колонию единиц.

Таблица 2.

Характеристика штаммов микромицетов относительно температуры

№	Место взятия образца	Число выделенных штаммов(ед.)		Доля штаммов в общем числе(%)	
		I	II	I	II
1	Нефтезагрязненные почвы	16	5	22,5	27,8
2	Озеро Масазыр	13	4	18,3	22,2
3	Источники термальных вод	6	3	8,5	16,7
4	Леса с высокой влажностью	13	4	18,3	22,2
5	Теплицы	23	2	32,4	11,1
Всего		71	18	100	100

В первую очередь проводилась оценка активности гидролаз и оксидаз штаммов, относящихся к микромицетам и макромицетам, и было выявлено, что они отличаются друг от друга по уровню синтеза того или иного фермента (табл. 3). Как видно, штаммы микромицетов характеризуются высокими показателями протеолитической активности и низкими — оксидазной активности. Так, из 64 штаммов микромицетов, выделенных в чистую культуру, 44 штамма обладают протеолитической, а 16 — пероксидазной активностью. Показатели для других штаммов занимают относительно данных среднее положение.

В таблице 4 приведены показатели ферментативной активности 89 микромицетов и 12 штаммов макромицетов. Как показывают результаты, ферментная система макромицетов сильнее, чем у микромицетов, и это проявляется в активности обеих оксидаз, эндоглюканазы и ксиланазы. Так, все макромицеты обладают способностью проявлять активность эндоглюканазы и ксиланазы, а 3/4 из них проявляют активность лакказы и пероксидазы. Количество штаммов микромицетов, проявляющих оксидазную активность, в 3 раза меньше, чем макромицетов. У штаммов, проявляющих активность эндоглюканазы и ксиланазы, ситуация складывается в пользу макромицетов. Так, все макромицеты обладают активностью обоих ферментов, тогда как количество микромицетов активных по данным ферментам находится в пределах 42,2–60,9 %. Таким образом, в результате предварительной оценки выявлено, что от 21,3 до 91,0 %

Таблица 3.

Первичная оценка выделенных микромицетов по активности ферментов

№	Ферменты	Число выделенных и проявивших активность штаммов (ед.)									
		НЗП		Озеро Масазыр		Источники термальных вод		Леса с высокой влажностью		Теплицы	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	Эндоглюканаза	16/11	5/3	13/9	4/2	6/3	3/2	13/7	4/2	23/20	2/2
2	Протеаза	16/13	5/4	13/10	4/3	6/3	3/2	13/9	4/3	23/21	2/2
3	Пектиназа	16/10	5/3	13/8	4/2	6/2	3/1	13/8	4/1	23/17	2/1
4	Амилаза	16/9	5/3	13/9	4/2	6/3	3/1	13/7	4/2	23/16	2/2
5	Ксиланаза	16/7	5/2	13/6	4/2	6/2	3/1	13/6	4/1	23/17	2/1
6	Липаза	16/8	5/3	13/7	4/2	6/3	3/2	13/8	4/2	23/14	2/1
7	Лакказа	16/4	5/2	13/4	4/1	6/2	3/1	13/4	4/1	23/4	2/0
8	Пероксидаза	16/3	5/1	13/4	4/1	6/2	3/1	13/3	4/1	23/3	2/0

Примечание: НЗП — нефтезагрязненные почвы

штаммов микромицетов обладают активностью того или иного фермента. Согласно полученным результатам, было сочтено целесообразным отобрать наиболее активные штаммы для второго этапа, и за основу отбора были взяты следующие показатели:

1. Способные синтезировать ферменты, катализирующие разложение сбалансированных полимеров, т.е. входящих в состав отходов целлюлоза, лигнин, гемицеллюлоза и др., что позволяет эффективно утилизировать отходы растительного происхождения, образующиеся ежегодно в больших количествах на различных производственных участках.
2. Имеющие наивысший уровень активности по конкретному ферменту, активность которого определяется.

Таблица 4.

Общая характеристика количества выделенных штаммов по активности ферментов

№	Место взятия образца	Число выделенных и проявивших активность штаммов (ед.)		Доля штаммов в общем числе (%)	
		Микромицеты	Макромицеты	Микромицеты	Макромицеты
1	Эндоглюканаза	89/59	12/12	66,3	100
2	Протеаза	89/81	12/10	91,0	83,3
3	Пектиназа	89/57	12/8	64,0	66,7
4	Амилаза	89/56	12/7	62,9	58,3
5	Ксиланаза	89/47	12/12	52,8	100
6	Липаза	89/45	12/3	50,6	25,0
7	Лакказа	89/23	12/9	25,8	75,0
8	Пероксидаза	89/19	12/9	21,3	75,0

На основании вышеизложенного для следующего этапа было отобрано 8 штаммов, из которых 2 относились к макромицетам и 6 — к микромицетам. В результате идентификации отобранных штаммов была определена их видовая принадлежность и цель, с которой они были отобраны (табл. 5). Было установлено, что 2 из отобранных штаммов принадлежат отделу *Mucormycota*, 2 — к *Basidiomycota* и 4 — к *Ascomycota*, и среди отобранных видов только гриб *Bjerkandera adusta* был выбран как продуцент со сбалансированной ферментной системой. Как продуцент оксидаз *Trametes hirsuta*, как продуцент эндоглюканазы *Trichoderma viride*, а остальные грибы как продуценты гидролаз представляет интерес с точки зрения практического использования в будущем.

Таблица 5.

Общая характеристика грибных штаммов, отобранных как активные продуценты

№	Название вида	Место выделения	Основополагающий показатель отбора
1	<i>Aspergillus candidus</i>	Озеро Масазыр	Гидролазы
2	<i>Chaetomium thermophile</i>	Источник термальных вод	Гидролазы
3	<i>Bjerkandera adusta</i>	Subtropik meşə	Сбалансированная ферментная система
4	<i>Humicola lanuginosa</i>	Источник термальных вод	Гидролазы
5	<i>Penicillium resticulosum</i>	Почва озера Масазыр	Гидролазы
6	<i>Mucor hiemalis</i>	Нефтезагрязненные почвы	Гидролазы
7	<i>Trametes hirsuta</i>	Субтропический лес	Оксидазы
8	<i>Trichoderma viride</i>	Субтропический лес	Эндоглюканазы

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено, что среди грибов, выделенных из районов Азербайджана с различными условиями, выделены

культуры с высокой ферментативной (гидролазной и оксидазной) активностью и определена их перспективность для практического использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова, Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Учебное пособие. 3-е издательство, с переработками и дополнениями / Н.С. Егорова, — М.: Изд-во МГУ, — 1995, — 224 с.
2. Клесов А.А., Рабинович М.Л., Сеницын А.П. и др. Ферментативный гидролиз целлюлозы: I. Активность и компонентный состав целлюлазных комплексов из различных источников. // Биоорганическая химия, 1980, т.6, с.1225–1241.
3. Кобзарь, А.И. Прикладная математическая статистика. — М.: ФИЗМАТЛИТ, — 2006, — 816 с.
4. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982, 240 с.
5. Методы экспериментальной микологии. / Под ред. Билай В.И. — Киев: Наукова думка, — 1982, — 500 с.
6. Мурадов П.З., Гахраманова Ф.Х., Ахундова С.М., Бакшиева Г.Р., Рзаева А.Л. Видовой состав грибов, распространенных на естественных и техногенно нарушенных ценозах. // Материалы международной научной конференции. Минск-Нарочь, 2014, с. 226–228.
7. Мурадов П.З., Сафаралиева Э.М., Гасанова Л.С., Юнусова Э.Р., Алиева Г.Р. Особенности микокомплекса техногенно загрязненных почв. // Успехи медицинский микологии, 2018, т.19, Глава 7, с. 35–38.
8. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии. / А.И.Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук [и др.]. М.: Издательский центр «Академия», — 2005, — 608 с.
9. Никитина О.В. Внеклеточные оксидоредуктазы лигнолитического комплекса базидиального гриба *Trametes pubescens* (Shumach.) Pilât.: автореф. на соискание канд. биол. наук. М., 2006, 26 с.
10. Сафаралиева Э.М., Алиева Г.Р., Рзаева А.Л., Мамедова Ф.Р., Бахшалиева К.Ф. Изменение видового состава грибов, распространенных на различных ценозах в условиях Азербайджана // Современная наука: Актуальные проблемы теории и практики, серия «Естественные и технические науки», 2020, №2, с. 52–55.
11. Depoorter E, Bull MJ, Peeters C, Coenye T, Vandamme P, Mahenthiralingam E. Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Jun;100(12):5215–29. doi: 10.1007/s00253-016-7520-x.
12. Durvasula, R.V. Extremophiles: From biology to biotechnology / R.V. Durvasula, D. V. S. Rao. — CRC Press, 2018. — 437 p.
13. FAO. The future of food and agriculture — Trends and challenges. Rome, 2017, 180 p.
14. Gholami-Shabani, M., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2023). Food Microbiology: Application of Microorganisms in Food Industry. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.109729.
15. <https://eco.gov.az>
16. Langyan S, Yadava P, Khan FN, Dar ZA, Singh R, Kumar A. Sustaining Protein Nutrition Through Plant-Based Foods. *Front Nutr.* 2022 Jan 18;8:772573. doi: 10.3389/fnut.2021.772573.]
17. Nagarajan, M., Rajasekaran, B. and Venkatachalam, K. Microbial metabolites in fermented food products and their potential benefits // *International Food Research Journal*, 2022, v.29(3), p.466–486.
18. Van Dijk, M., Morley, T., Rau, M.L. et al. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. // *Nat Food*, 2021, 2, p.494–501.

© Омар Парвин Мирдамет (peri.omar87@gmail.com); Юнусов Эльшад Рустам (elsadyunuslu@gmail.com);
 Велиева Сафура Сахиб (veliyeva.safura@mail.ru); Асадова Шабнам Фахраддин (bioloq82@mail.ru)
 Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»