

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

На правах рукописи

СВЕТЛАНА ЮСИФ КЫЗЫ КАСУМОВА

**«МИКРОМИЦЕТЫ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ
АЗЕРБАЙДЖАНА»**

2414.01. – «Микробиология»

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктор наук по биологии**

Б А К У – 2014

Работа выполнена в отделе микологии Института микробиологии НАН Азербайджане

Официальные оппоненты: д.б.н., проф. З.Ш.Ломтатидзе
д.б.н., проф. Х.Г.Ганбаров
д.б.н. Г.М.Шыхлинский

Ведущая организация: Азербайджанский Медицинский Университет, кафедра микробиологии и иммунологии

Защита состоится « 28 » февраля 2014 года в ___ часов на заседании Р/D.01.222 Диссертационного Совета при Институте Микробиологии НАН Азербайджана

Адрес: Az1073, г.Баку, ул. Патамдартское шоссе, 40
Fax: (99412) +5024470
Email: azmbi@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Микробиологии НАН Азербайджана

Автореферат разослан « ___ » января 2014 года

**Ученый секретарь,
Р/D.01.222. Диссертационного
совета, д.ф.п.б.,доц.**

Ф.Х.Гахраманова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Микроскопические грибы являются одним из основных компонентов почвенного биогеоценоза, выполняя в почве весьма разнообразные функции. Они участвуют в разложении растительных и животных остатков, т.е. осуществляют минерализацию разнообразных органических веществ. Наряду с простыми органическими соединениями грибы разрушают и сложные по химическому составу вещества, которые с трудом подвергаются распаду другими почвенными микроорганизмами (например, бактериями, актиномицетами). Микромицеты вызывают трансформацию целлюлозы, пектина, крахмала, лигнина, гемицеллюлозы, токсинов и многих других веществ в почве. Некоторые виды микромицетов, участвуя в образовании таких соединений, из которых синтезируется гумус, способствуют формированию плодородия почвы [Мирчинк Т.Г., 1988].

Как известно, нефть и нефтепродукты признаны приоритетными загрязнителями окружающей среды в связи со значительной интенсификацией добычи нефти и производства нефтепродуктов. Несмотря на современное достижение в области охраны окружающей среды, в процессе добычи, хранения и транспортировки нефти загрязнение почвы происходит довольно часто, что является нерешенной проблемой и в настоящее время. Большинство исследователей при оценке негативного влияния нефтяного загрязнения на почву и эффективности применяемых приемов рекультивации, основными учитываемыми параметрами считают содержание основных нефтепродуктов и общую микробиологическую активность почв [Исмаилов Н.М., 2003]. Изменение в антропогенных условиях бактериальной составляющей микробиоценозов привлекает внимание большей части исследователей. Гораздо меньше работ посвящено микроскопическим грибам - обитателям нефтезагрязненных почв. В то время как грибы играют немаловажную роль в процессах самоочищения почв от загрязнения нефтью и нефтяными углеводородами, способствуя разрушению нефтяных загрязнений и вовлекая продукты распада нефти в естественный круговорот углерода [Бакаева Н.Т., 2004]. В нефтезагрязненных почвах по

сравнению с природными аналогами возрастает численность грибов и их значение в обмене органического вещества [Киреева Н.А., 2004, 2006]. Они чувствительны к изменению свойств почвы под воздействием различных поллютантов, в том числе и нефти, и могут служить индикаторами ее состояния [Тарасенко Е. М., 2006]. В тоже время, по мнению многих авторов [Киреева Н.А. и др., 2000, Корнейкова М.В. и др., 2011] в антропогенно нарушенных почвах общая численность грибов – токсинообразователей зависит от перестроек в микробоценозе, которые вызваны воздействием загрязнителя. В результате этого, доминирующие позиции в нефтезагрязненных почвах занимают сильные токсинообразователи. Изменения в структуре комплекса микромицетов при нефтяном загрязнении могут влиять на микробоценоз в целом, а также оказывать негативное воздействие на макроорганизмы. Публикации последних лет указывают на высокую вероятность распространения в антропогенно нарушенных почвах патогенных для растений, животных и человека видов [Марфенина О.Е., 2006, Киреева Н.А., 2003, 2004].

В последнее время мицелиальные грибы вызывают особый интерес у исследователей процессов микробной трансформации углеводородов (УВ) нефти из-за их избирательной способности в утилизации различных нефтяных углеводородов [Салманов М.А. и др., 2008]. Как известно, в состав нафталановой нефти, в основном, входят нафтеновые углеводороды, являющиеся действующим лечебным фактором, ароматические углеводороды, так называемые гибридные циклические углеводороды, а также смолы [Аббасов В.М. и др., 2005]. Такой состав нафталановой нефти затрудняет её деградацию микроорганизмами. В связи с этим, поиск культур микроорганизмов, способных к избирательной деградации нафталановой нефти, представляет теоретический, а с точки зрения изучения продуктов метаболизма и возможного получения ценных метаболитов и практический интерес. Кроме того, большая часть циклических углеводородов является в биохимическом отношении весьма устойчивыми и оказывают ядовитое антисептическое действие на организмы вообще и на микроорганизмы в частности [Коронелли Т.В., 2003]. Поэтому поиск и изучение микроорганизмов, способных использовать данные нефтяные

углеводороды является чрезвычайно важным, так как изучение микроорганизмов, производящих эти процессы, условий, при которых эти процессы протекают, дают метод с помощью которого возможно решение вопроса об очистке почв и водоемов, загрязненных отбросами нефтяных и химических заводов. В связи с этим, актуальное значение имеет выделение из почв микроорганизмов, обладающих способностью избирательно использовать углеводороды нафталановой нефти, выявлению их способности к специфическому использованию этих углеводородов в зависимости от строения и структуры.

Кроме того, микромицеты являются продуцентами многочисленных биологически активных веществ (БАВ) – антибиотиков, ферментов, ростовых веществ и др. В связи с чем, в последние годы активно изучаются и разрабатываются новые биотехнологии получения БАВ из мицелиальных грибов [Феофилова Е.П., 2007]. Работы, посвященные выделению из нефтезагрязненных почв (НЗП) микромицетов - продуцентов БАВ в литературе единичны. Так, была обнаружена способность бактерий и микромицетов, выделенных из различных почв Азербайджана, в том числе и из НЗП к биосинтезу фитогормонов [Исаева К.Х., 2010]. Кроме того, потенциальная патогенность грибов определяется комплексом свойств адаптивного характера, позволяющих им противостоять защитным механизмам организма и осуществлять инвазию. Такими факторами вирулентности являются экстраклеточная секреция гидролитических ферментов – фосфолипаз и протеаз [Schaller et. al., 2005]. Учитывая выше сказанное, проведение поиска и выделения активных продуцентов БАВ (гидролитических ферментов, ростовых веществ в частности) из НЗП также представляет определенный научный и практический интерес.

Цель и задачи работы. В связи с изложенным, целью представленной работы является - изучение микромицетов различных НЗП Азербайджана, способных к деградации нефти, включая нафталановую нефть и различных нефтепродуктов, и отбор среди выделенных грибных штаммов активных продуцентов БАВ (гидролитических ферментов и ростовых веществ).

Для достижения поставленной цели намечены следующие **задачи**:

- выделение микромицетов, активно разлагающих нафталановую нефть, из нефтезагрязненных почв Апшерона, а также из почв месторождения нафталановой нефти;

- изучение влияния состава питательной среды и условий культивирования на рост и деградацию нафталановой нефти активными штаммами;

- исследование продуктов микробного воздействия и установление возможного маршрута окисления нафталановой нефти;

- изучение БАВ (протеолитических, липолитических ферментов, ростовых веществ) микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана;

- исследование протеолитической активности нематофаговых хищных грибов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана, а также хранящихся в коллекции культур микроорганизмов Института Микробиологии НАНА;

- оптимизация питательной среды и условий культивирования отобранных активных штаммов;

- разработка методики выделения ферментного комплекса протеаз, липаз и фосфолипазы С из выделенных активных штаммов микромицетов и изучение некоторых физико-химических свойств внеклеточных комплексов данных ферментов.

Научная новизна работы. Впервые проведена работа по изучению микромицетов нефтезагрязненных почв Азербайджана, в результате которой дана комплексная оценка выделенных культур микромицетов по способности деградировать различные виды нефти, включая и нафталановую нефть и нефтепродукты, а также по активности в отношении биосинтеза гидролитических ферментов и ростовых веществ.

Подобрана ассоциация бактериальных и грибных культур, позволяющей в лабораторных условиях достигать 70% очистки нефтезагрязненных почв, что позволяет её использовать в качестве биопрепарата. На примере четырёх активных грибных штаммов *Penicillium sp.3n*, *Fusarium sp.11a*, *Mucor sp.6n*, *Cephalosporium sp.45a* подобраны оптимальные условия культивирования и состав

питательной среды, обеспечивающей максимальный рост и деградацию нафталановой нефти.

Впервые исследованы конверсия нафталановой нефти и её фракций активными штаммами микромицетов и изучены продукты деградации нафталановой нефти. Результаты исследований методами ВЖХ (высокожидкостная хроматография) и ИКС (инфракрасная спектрофотометрия) состава нафталановой нефти и продуктов ее биodeградации дают основание предположить, что в данном случае происходит окисление в алкильном радикале в боковой цепи полициклических нафтеновых углеводородов.

Впервые исследована активность микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана к биосинтезу биологически активных веществ и штамм *Mucor hiemalis* (синтезирующий ренин), *Mucor racaemosus* (продуцирующий липазы), а также *Aspergillus niger* (синтезирующий фосфолипазы С) отобраны в качестве активного продуцента соответствующих ферментов.

Показано, что большая группа нематофаговых хищных грибов способны гидролизовать белки, в частности, фибрин. Физиолого-биохимическое изучение наиболее активного штамма *Arthrobotrys longa* позволило подобрать условия для максимального синтеза внеклеточных протеаз. Исследован протеолитический комплекс, выделенный из культуральной жидкости *Arthrobotrys longa*. Показано, что в его состав входят нейтральные и щелочные протеазы.

Практическое значение работы. Отобран активный штамм *Penicillium sp. Zn* способный осуществлять деградацию нафталановой нефти до 57%, а также ассоциация грибных и бактериальных культур микроорганизмов - до 70%. Результаты, полученные при проведении исследований, являются научным вкладом в Информационный банк данных по нефтеокисляющим культурам микроорганизмов.

В ходе работы отобраны и исследованы продуцент протеаз-*Mucor hiemalis*, который может быть использован в молочной промышленности, при получении сыров, *Mucor racaemosus* – продуцент липаз, *Aspergillus niger* – продуцент фосфолипазы С.

Полученный комплексный препарат липазы из данного штамма может быть использован в процессах гидролиза отходов масло-жир комбинатов и ряда растительных масел, равно как и в пищевой, так и в химической промышленности (производство моющих средств). Препарат фосфолипазы С может быть использован в лабораторной медицинской практике для изучения структуры природных липидов, в процессе синтеза биологически активных сложных эфиров с заранее заданными свойствами.

Штамм *Arthrobotrys longa* и рекомендации по его культивированию и поддержанию могут быть использованы при промышленном получении препаратов, обладающих фибринолитическим и тромболитическим действием.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на следующих конференциях: IV Бакинская международная Мамедалиевская нефтехимическая конференция (Баку, 2000), 61-ая научная конференция АГПУ (Баку, 2001), международный биологический конгресс (Малатя, 2002), международная научная конференция, посвященная 100-летию создания Азербайджанского научно-исследовательского Ветеринарного института (Баку, 2002), международная конференция «Экология и охрана жизнедеятельности (Сумгаит, 2002), международная научная конференция «Биология систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах» (Минск, 2004), международная научная конференция «Актуальные проблемы экологии» (Гродно, 2004), международная научная конференция «Физиолого-биохимические и экологические особенности микроорганизмов» (Баку, 2005), The Eight Baku International Congress «Energy, Ecology, Economy» (Баку, 2005), международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы экологии и природопользования в Казахстане и сопредельных территориях» (Казахстан, 2007), международная научная конференция «Биология: теория, практика, эксперимент» (Саранск, 2008), X международная научная конференция «Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря и водоёмов внутреннего стока Евразии» (Астрахань, 2008), международная научно-практическая конференция «Современные проблемы экологии и экологического образования» (Орехово-Зуево, 2009), IX международная научно-

практическая конференция «Наука и современность» (Новосибирск, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 49 научных работ.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследований (глава 2), изложения материала (глава 3,4,5,6), основных выводов и списка цитируемой литературы (357 наименований). Диссертация, включая 84 таблицы и 27 рисунков, состоит из 321 страниц.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Разные штаммы микроскопических грибов способны расти на нафталановой нефти, её фракциях и ряда углеводородных субстратах, среди которых наибольшую активность проявили штаммы *Cephalosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*.
- Степень эффективности деградации нафталановой нефти зависит от источника углерода, азота, pH среды, температуры выращивания, а также от возраста и количества вносимого посевного материала.
- Величина конверсии нафталановой нефти исследуемыми микромицетами зависит от места их выделения.
- При использовании активных микроорганизмов в качестве препарата, фактором, влияющим на эффективность процесса очистки нефтезагрязненных почв в лабораторных условиях является состав микроорганизмов, входящих в ассоциацию препарата
- Разные штаммы микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана, способны синтезировать протеолитические и липолитические ферменты, среди которых штамм *Mucor hiemalis* проявлял наибольшую протеолитическую, *Arthrobotrys longa* – фибринолитическую, *Mucor racaeomus* – липолитическую, *Aspergillus niger*- фосфолипазную активности.
- Представители хищных нематофаговых грибов, способны к биосинтезу протеолитических ферментов с широкой субстратной специфичностью; наибольшая активность отмечена у *Arthrobotrys longa*.

- Биосинтез ферментов зависит от источников углерода, азота, содержащихся в питательной среде культивирования, а также от рН среды и температуры культивирования.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили 218 штаммов грибов, 108 из которых выделены из нефтезагрязненных почв Азербайджана известными методами [Билай В.И., 1980], а 110 взяты из коллекции культур микроорганизмов Института Микробиологии НАНА. Последние выделены в чистую культуру из почв Азербайджана, подверженных естественному и техногенному воздействию.

Для культивирования грибов и определения их ферментативной активности использовали среду Чапека, Мейзе [Дорохов В.В., 1968; Билай В.И., 1980; Расизаде Т.Т., 1981], 5⁰Б сусло и различные синтетические среды. Температура культивирования составляла 25⁰-26⁰С. Как посевной материал использовали 5-и суточные культуры, выращенные на сусло. Ферментативная активность культуральной жидкости и биомассы определялась по известной методике. Для определения фибринолитической активности протеолитических ферментов использовали принятый в энзимологии модифицированный метод Ансона и визкозиметрический метод [Полыгалина Г.В. и др., 2003; Нетрусов А.И., 2005]. Липолитическую активность определяли титриметрическим методом [Рубан Е.Л., 1977]. Фосфолипазную активность определяли по кислоторастворимому фосфору [Полховский В.А., 1970], по разрушению тромбопластина [Герасимене Г.Б. и др., 1980]. Активность почвенных ферментов проводили по Хазиеву [Хазиев Ф.Х., 1990 г] и выражали активность протеазы в мг тирозина/г почвы, каталазы мл О₂/г почвы и дегидрогеназы мг формазона/ г почвы. Наличие гиббереллинов в культуральной жидкости выявляли биологическим методом замачивания семян растений по Красильникову [Методы изучения микроорганизмов и их метаболитов//Под редак. К.А. Красильникова, Москва, 1966]. Количественное определение гиббереллинов проводили колориметрическим методом по Муромцеву и Нестюк [Методы определения регуляторов роста и гербицидов. М.: Наука,

1966.]. Протеолитические ферменты из супернатанта культуральной жидкости получали традиционными методами-высаливанием белков сульфатом аммония, осаждением спиртом и ацетоном. Очистку препарата проводили путем гель-фильтрации. Изучение влияния специфических ингибиторов (натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, диизопропилфторфосфата, фенилметилсульфонилфторида) на активность протеаз проводили следующим образом: к 1 мл культуральной жидкости добавляли 0,1 мл раствор ингибитора различной концентрации, который выдерживали при комнатной температуре и постоянном помешивании в течении 20 минут. После этого определяли ферментативную активность препарата по указанным выше методам. Исследование влияния ионов NH_4^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+3} , K^+ , Na^+ , Cu^{+2} , Zn^{+2} на активность протеаз проводили диализом в растворе хлорида при температуре 4^0C в течение 48 ч.

Конверсию нафталановой нефти определяли весовым методом [Красильников Н.Р., Коронелли Т.В., 1974, Ягафарова Г.Г. и др., 2001]. Определение продуктов метаболизма проводили методом высокоэффективной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии на хроматографе фирмы “KOV0” (Чехия) [Гордон А., Форд Р.,1974]. Эмульгирующую активность определяли по методу Соорег [Соорег,1987], абсорбцию измеряли при 540 нм на приборе “Srescord Uv”.

Все эксперименты проводились в 4-6 кратной повторностях и полученные данные были статистически обработаны по Гаусу [Лакин Г.Ф., 1973; Плохинский,1998].

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Поиск и выделение микроорганизмов, активно разлагающих нефтяные углеводороды

Проведен поиск и выделение микроорганизмов, разлагающих нафталановую нефть, из почв месторождения и самой нафталановой нефти и из нефтезагрязненных почв Апшерона. Исследовано влияние состава питательной среды на рост микроорганизмов в питательной среде с нафталановой нефтью. Изучено влияние

способа культивирования нафталанокисляющих грибов при росте на нафталановой нефти. У выделенных штаммов грибов изучалась способность роста на нафталановой нефти, фракциях нафталановой нефти и различных углеводородах. Наиболее активными оказались штаммы *Fusarium* sp.11a, *Cephalosporium* sp.45a, *Penicillium* sp.3п, *Mucor* sp.6н(3), представленные в таблице №1.

Проведение скрининга, результатом которого являются отобранные активные штаммы, включает необходимый дальнейший этап – подбор питательных сред, обеспечивающих оптимальные условия для жизнедеятельности выделенных штаммов и максимальной деградации нефти. Поэтому целью наших дальнейших исследований было изучение влияния состава питательной среды на рост культур указанных микроорганизмов.

Изучение влияния различных концентраций аммонийных и нитратных источников азота при росте исследуемых штаммов на

Таблица 1.

Рост грибов на нафталановой нефти и некоторых углеводородных субстратах

Штаммы	НН	Фракция №				КН	ДТ	C ₁₆
		1	2	3	4			
<i>Penicillium</i> sp.3п	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++
<i>Mucor</i> sp.6н	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++
<i>Fusarium</i> sp.11a	+++	+	-	-	-	+	+	++
<i>Cephalosporium</i> sp.45a	+++	+	-	+	+	++	++	++

Примечание: НН- нафталановая нефть, КН – керосин, ДТ- дизельное топливо, фр.:1 –250-300⁰С, №2– 300-350⁰С, №3 – 350-400⁰С, №4 – 400-450⁰С(+++) – рост хороший, (++) – рост удовлетворительный, (+) – рост слабый, (-) – отсутствие роста;

нафталановой нефти показало, что оптимальная концентрация NaNO_3 в среде для *Fusarium* sp.11a и *Cephalosporium* sp.45a–0,24% по азоту, для *Penicillium* sp.3п–0,06% по азоту, для *Mucor* sp.6н–0,12% по азоту. В качестве органических источников азота было испытано

влияние мочевины и пептона на рост грибных штаммов, которые вносились в среду в количестве 0,5%. Как показали результаты опытов, мочевина оказывает угнетающее воздействие на рост штаммов, в то время как внесение 0,5% пептона оказывало положительное влияние на продукцию мицелия исследуемых штаммов. При исследовании влияния различных органических добавок таких как сахароза (в концентрации 0,5%) и дрожжевой экстракт (в концентрации 0,5%, 1%, 2%) установлено, что внесение сахарозы в качестве органической добавки оказалось более эффективным по сравнению с дрожжевым экстрактом, так как именно 0,5% концентрация сахарозы в питательной среде обеспечивала максимальный рост испытанных штаммов грибов.

Изучение способности роста исследуемых штаммов на нафталановой нефти, гексадекане, дизельном топливе с концентрацией в среде 0,5%, 1%, 2%, 3% показало, что повышение концентрации испытанных углеводородных субстратов в питательной среде от 0,5 до 1% приводило к увеличению продукции биомассы исследованных штаммов грибов, причем концентрация 2% в среде нафталановой нефти является оптимальной для всех штаммов. Повышение же концентрации всех 3-х углеводородных субстратов до 3% приводит к уменьшению выхода биомассы у всех испытанных штаммов. Нами также изучалась возможность роста и штаммов грибов в условиях поверхностного культивирования при добавлении в среду больших количеств (до 20%) нафталановой нефти.

Выявлено, что все испытанные штаммы способны расти в указанных пределах концентраций нафталановой нефти в среде. Однако, повышение концентрации нафталановой нефти до 10-20% вызывает значительное уменьшение продукции мицелия в среде (табл. 2).

Изучение влияния источника углерода на рост штаммов грибов проводили также с фракциями нафталановой нефти. С этой целью штаммы грибов выращивались на среде Чапека с 0,5% четырех различных фракций - №2, №3, №4, №5, полученных из нафталановой нефти, в качестве единственного источника углерода. Результаты показали, что штаммы грибов лучше развиваются при внесении в среду фракций №4 и №5.

Концентрация водородных ионов в среде является одним из регулирующих и лимитирующих факторов при культивировании микроорганизмов на средах с различными углеводородами. Неблагоприятное значение рН может оказывать на рост ингибирующее действие, а оптимальное – стимулирующее.

Таблица 2.
Рост грибных штаммов на различных концентрациях нафталановой нефти (биомасса, г/л)

Штаммы	Концентрация нафталановой нефти, %				
	1	3	5	10	20
<i>Fusarium</i> sp. 11a	0,396	0,581	0,312	0,304	0,113
<i>Cephalosporium</i> sp. 45a	1,263	0,568	0,406	0,210	-
<i>Mucor</i> sp. 6 н	1,950	1,803	1,121	0,601	0,310
<i>Penicillium</i> sp. 3 п	2,015	2,113	1,708	0,821	0,416

Исследование роста активных штаммов в зависимости от начального значения рН питательной среды проводилось нами на среде Чапека с нафталановой нефтью в качестве единственного источника углеводорода на примере четырех активных штаммов *Cephalosporium* sp.45a, *Fusarium* sp. 11a, *Penicillium* sp. 3п, *Mucor* sp. 6н. Значения концентраций рН составляли: 2,3; 3,1; 4,2; 5,2; 6,2; 7,2; 8,0; 9,0. Результаты исследований показали, что хотя все испытанные штаммы грибов в процессе роста при разных исходных концентрациях водородных ионов в среде в значительной мере выравнивали кислотность среды, начальная кислотность влияла на накопление биомассы. Оптимальным значением рН для двух штаммов *Cephalosporium* sp.45a и *Mucor* sp.6н является 7,2, а для штаммов *Fusarium* sp.11a и *Penicillium* sp.3п – 6,2.

Таким образом, значение рН среды для углеводородусваивающих мицелиальных грибов является строго специфичным и определяется в зависимости от штаммов, способа культивирования, компонентов среды и др.

Рост и ферментативная активность мицелиальных грибов зависят от посевной культуры, её возраста, плотности, способа выращивания [Никольская Е.А., 1970]. При культивировании мицелиальных грибов на средах с нефтяными субстратами роль посевной культуры (инокулюма) чрезвычайно велика, поскольку именно от этого зависит правильная оценка способности штамма расти на углеводородах нефти (Коваль Э.З., 1972). В связи с чем нами проводилось изучение роста 4-х активных штаммов *Fusarium* sp. 11a, *Mucor* sp.6н, *Penicillium* sp.3п, *Cephalosporium* sp.45a на средах с нафталановой нефтью в зависимости от возраста, плотности, способа выращивания и внесения посевного материала. Результаты проведенных опытов показали, что для каждого из изученных нами штаммов был свой оптимальный возраст посевного материала: для *Mucor* sp.6н, *Penicillium* sp.3п это десятидневная культура, для *Fusarium* sp.11a, *Cephalosporium* sp.45a – двухнедельная культура. Оптимальная плотность инокулюма для каждого штамма также индивидуальна: для *Penicillium* sp.3п, *Fusarium* sp.11a, *Cephalosporium* sp.45a она составляет $6 \times 10^4 - 6 \times 10^6$ конидий в 1мл, а для *Mucor* sp.6н необходима плотность суспензии спор $6 \times 10^6 - 6 \times 10^8$ в 1 мл.

Скорость и направленность биодеградации отдельных углеводородов нефти в большой степени зависит от температуры. Отсюда вытекает необходимость изучения оптимальных температур для роста испытуемых нами грибных штаммов. Так, оптимальные температуры, при которых отмечен наибольший рост, составили: для *Penicillium* sp.3п, *Mucor* sp.6н – 26°C, для *Cephalosporium* sp.45a, *Fusarium* sp.11a – 30°C.

Немаловажным фактором при культивировании микроорганизмов являются и его способы. Для изучения влияния способа культивирования на рост грибов на нафталановой нефти нами проводилось как стационарное, так и глубинное (качалка 120 об/мин) 4-х активных декструкторов нафталанской нефти: *Penicillium* sp.3п, *Cephalosporium* sp.45a, *Mucor* sp.6н, *Fusarium* sp.11a. Штаммы *Cephalosporium* sp.45a, *Penicillium* sp.3п росли одинаково независимо от способа культивирования, в то время как *Mucor* sp.6н, *Fusarium* sp.11a при глубинном выращивании росли значительно хуже, чем при стационарном.

2. Изучение конверсии нафталановой нефти грибными культурами

Конверсия нафталановой нефти культурами микроорганизмов и их метаболиты определялась на примере наиболее активных штаммов, выделенных из почв различных месторождений: *Penicillium* sp.3п, *Mucor* sp. бн, *Fusarium* sp.11a и *Cephalosporium* sp.45a. Проведенные исследования показали, что все исследуемые штаммы разлагают такой сложный субстрат как нафталановая нефть. Максимальная степень конверсии – 43,6% отмечена у *Penicillium* sp.3п, а минимальная у *Fusarium* sp.11a – 28%. В отношении же конверсии трех фракций нафталановой нефти (табл. 3) - фракция №2 явилась наиболее доступным источником углеводов, а максимальная степень её конверсии наблюдается также у *Penicillium* sp.3п. предположить, что в данном процессе

Таблица 3

Потребление нафталановой нефти нафталанокисляющими штаммами грибов

Название штаммов	Внесено нефти, гр.	Осталось нефти, гр.	Потреблено %	Выход биомассы, г/л
<i>Penicillium</i> sp. 3п	0,350	0,217	37,3	0,564
	0,310	0,163	42,4	0,677
	0,400	0,260	35,0	0,460
<i>Mucor</i> sp. бн	0,350	0,224	36,0	0,530
	0,510	0,168	41,0	0,614
	0,400	0,406	20,4	0,392
<i>Cephalosp.</i> sp. 45a	0,350	0,270	34,0	0,432
	0,310	0,173	38,6	0,594
	0,400	0,276	31,0	0,420
<i>Fusarium</i> sp. 11a	0,350	0,288	29,0	0,412
	0,400	0,198	38,2	0,570
	0,510	0,398	22,1	0,402

происходит окисление в алкильном радикале в боковой цепи полициклических нафтеновых углеводородов (рис.1). Можно

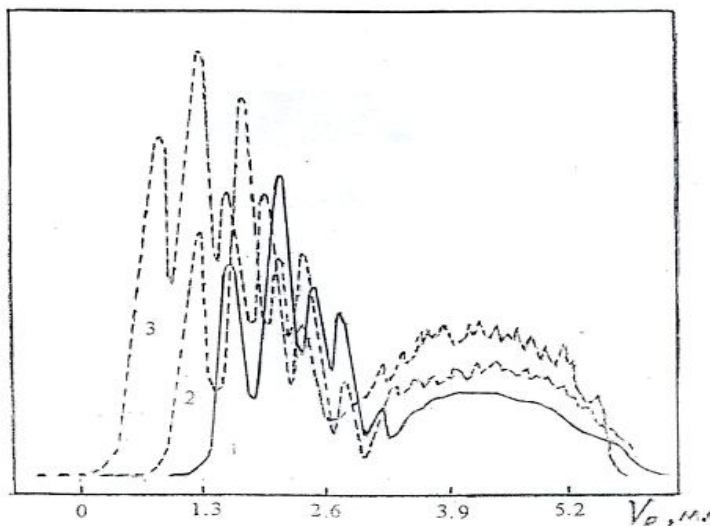


Рис. 1. Хроматографические кривые исходной нафталановой лечебной нефти (кривая 1) и продуктов ее биodeградации (кривые 2,3)

полагать, что частичное окисление определенных групп приводит к структурному изменению всей молекулы углеводородных компонентов нафталановой нефти, а это в свою очередь приведет к изменению лечебных свойств этой нефти. Изучение конверсии нафталановой нефти бактериальными культурами показали, что степень конверсии колеблется от 10% до 40%. В результате экспериментального скрининга отобраны наиболее активные деконструкторы нафталановой нефти- *Bacillus* sp. бп II', *Bacillus* sp. бп III, *Pseudomonas* sp. бп IV. Проблема очистки почв и воды, загрязненных нефтью и её персистентными компонентами, стоит очень остро.

В настоящее время нефть наряду с ксенобиотиками стала одним из самых распространенных загрязнителей окружающей среды [Молодова А.П., 1980]. Биологические методы очистки почвы

и воды от нефтяных загрязнений, получили сегодня широкое развитие и применение. Биодеградирующая способность

Таблица 4.
Разложение нафталановой нефти в присутствии различных ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов

Вариант	Содержание нефти, г/25г песка			Биодеструкция, %	
	нач.	28-е сут	42-е сут		
Контроль	0,40	0,40	0,37	0	0
Ассоциация №1	0,40	0,21	0,16	47,5	60
Ассоциация №2	0,40	0,15	0,14	62,5	65
Ассоциация №3	0,40	0,13	0,12	67,5	70

Примечание: Ассоциация №1 – смесь штаммов грибов - *Penicillium* sp. 3п, *Mucor* sp. 6н, *Fusarium* sp. 11а, *Cephalosporium* sp. 45а; ассоциация №2 – смесь бактериальных культур - *Bacillus* sp. 6пII', *Pseudomonas* sp. 6пIV; ассоциация №3 – смесь грибных и бактериальных культур

микроорганизмов-деструкторов нафталановой нефти изучалась в лабораторных sp. условиях. Поэтому изучение возможности использования штаммов-деструкторов нафталановой нефти для очистки почв, загрязненных нефтью проводили на примере четырех грибных - *Penicillium* sp. 3п, *Mucor* sp. 6н, *Fusarium* sp. 11а, *Cephalosporium* 45а; и двух бактериальных штаммов - *Pseudomonas* sp. 6п IV, *Bacillus* sp. 6п II', отобранных в результате скрининга. Проведенные опыты по разложению нефти активными деструкторами нафталановой нефти показали, что в вариантах с бактериальными культурами деструкция нефти была выше – 62-65%, причем более активным явился штамм *Bacillus* sp. 6пII'. Учитывая сложный многокомпонентный состав нефти, биодеградацию

осуществляли как чистыми культурами, так и ассоциациями культур.

Самое активное разложение нефти наблюдалось при использовании ассоциации бактериальных и грибных культур. Здесь количество нефти через 42 сут. уменьшалось от 0,40 до 0,12г, а деструкция нефти составляла 70%.

Таким образом, отобраны штаммы микроорганизмов и подобраны ассоциации, активно потребляющие компоненты нефти. Ассоциация грибных и бактериальных культур показала наилучшие результаты, что дает возможность использовать её в качестве биопрепарата для очистки почв, загрязненных нефтью.

3. Изучение гидролитической активности микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана

Изучение протеолитической активности 68 штаммов грибов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана показало, что наибольшей активностью протеолитического комплекса обладали представители рода *Mucor* - 7 из 8 испытанных штаммов проявляли высокую активность (таб.5) Представители 7 родов: *Chloridium*, *Mortirella*, *Macrosporium*, *Memnoniella*, *Monocillium*, *Dactilosporium*, *Micella*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Acladium*, *Dirchinocladium* не проявляли ПА (отсутствие зоны преципитации казеина при pH 5,2 размером не менее 23мм). Было проведено изучение желатиназной и сычужной (ренин) активностей. Результаты показали, что все испытанные микромицеты при всех значениях pH среды обладают желатиназной активностью и отличаются лишь количественными показателями активности. Эти различия характеризуются как различия штаммов. Однако, у штаммов рода *Mucor*, в частности у *Mucor* sp.30 желатиназная активность характеризуются высокими показателями. В отношении сычужной активности грибы различались не только уровнем активности, но и ее присутствием или отсутствием. Исключение составил род *Mucor*, все штаммы которого обладали сычужной активностью, наивысшее значение было у *Mucor* 10.

Таким образом, согласно результатам первичных экспериментов, было обнаружено, что ферментный комплекс

микромикетов нефтезагрязненных почв Азербайджана включает и протеолитические ферменты и это более выражено у рода *Mucor*.

Таблица 5
Сравнительная характеристика протеолитического ферментного комплекса с молокосвертывающей способностью у выделенных микромикетов

Род	Количество штаммов	Количество активных штаммов
<i>Acremonium</i> Link ex Fries	6	2
<i>Penicillium</i> Link ex Fries	14	3
<i>Cephalosporium</i> Corda	5	2
<i>Aspergillus</i> Micheli ex Fries	6	2
<i>Fusarium</i> Link ex Fries	2	1
<i>Chloridium</i> Link ex Wallroth	1	0
<i>Alternaria</i> Nees ex Wallroth	4	2
<i>Mortirella</i>	1	0
<i>Macrosporium</i> Fries	2	0
<i>Memmoniella</i> Hohnel	1	0
<i>Monocillium</i> Bonorden	1	0
<i>Dactylosporium</i> Harz	3	0
<i>Mucor</i>	8	7
<i>Micella</i> sterilla	1	0
<i>Paecilomyces</i> Bain	1	0
<i>Cladosporium</i> sp.	1	0
<i>Acladium</i> fambriatum	1	0
<i>Dirchinocladium</i> sp.	1	0

Интересно, что этот факт подтверждается в отношении всех трёх активностей при первичном отборе. Поэтому в дальнейших исследованиях как активные продуценты протеолитических ферментов были использованы штаммы именно этого рода.

При исследовании протеолитической активности (ПА) штаммов грибов рода *Mucor* как активных продуцентов при различных показателях pH среды, обнаружено, что синтезируемый ими протеолитический ферментный комплекс более активен в

диапазоне pH 3,3-3,4 (таб. 6) Изучение влияния белковых веществ на синтез протеазы грибом *Mucor sp.* 30 показало, что присутствие в среде кукурузной и соевой муки повышают ферментативную активность и выход биомассы, а максимальное значение проявляется при концентрации этих добавок 1,5-2,0%. В последующих исследованиях были идентифицированы штаммы *Mucor sp.* 10 и *Mucor sp.* 30 как

Таблица 6
Протеолитическая активность (ПА) муковокровых грибов при разных значениях pH

Штаммы	Изменение вязкости 5%-ного раствора желатинины, сек			ПА (по Ансону), мг тирозина на 1г воздушно-сухой культуры		
	3,3	4,5	7,4	2,5	3,1	4,1
1. <i>Mucor sp</i> 11b	35	34	32	15	18	10
2. <i>Mucor sp</i> 50	22,5	22	21	6,8	12	10
3. <i>Mucor sp</i> 27	22	21	20	7,0	11	9,1
4. <i>Mucor sp</i> 48	28	26,4	25	8,9	11	9
5. <i>Mucor sp</i> 7	31	30	30,1	10	10,5	8
6. <i>Mucor sp</i> 33	21	20	20,5	0	3,0	4,1
7. <i>Mucor sp</i> 30a	46	44	40	18	20	15
8. <i>Mucor sp</i> 10	48	38	29	20	21	12

M. hiemalis и *M. sinensis*. При изучении липолитической активности микромицетов НЗП Азербайджана был отобран штамм *Mucor racemosus*, как наиболее активный продуцент экзолипазы. В нашей работе изучались условия культивирования *Mucor racemosus*,

способные оптимизировать биосинтез экзолипазы этим грибом, включая аэрацию, pH среды, температуру, а также источники питания. В табл. №7 активность наблюдалась лишь на средах с маслами и соевой мукой. Было проверено индуцирующее действие различных жирных кислот и масел на синтез липазы *Mucor racemosus*. Было обнаружено, что жирные кислоты не являются индуктором биосинтеза липазы *Mucor racemosus*. Масла же индуцируют биосинтез фермента: оливковое, соевое и хлопковое лучше при концентрации 0,5%, а подсолнечное при 0,05%. Оптимальной температурой для биосинтеза липазы *Mucor racemosus* является

Таблица 7

Влияние состава сред на биосинтез экзолипазы *Mucor racemosus*.

Среда	Липолитическая активность (мл 0,05н NaOH/мл КЖ)
1. Чапека	0,6
2. С соевой мукой	9,7
3. Чапека+глюкоза	0,3
4. Чапека+оливковое масло	1,8
5. Чапека+глюкоза+оливковое масло	0,2
6. С соевой мукой+оливковое масло	5,5
7. Минеральная с глюкозой	0,5
8. Минеральная с пептоном	0,4
9. Сусло	1,2
10. Сусло+оливковое масло	3,8

26-28° и для биосинтеза липазы грибу нужна сильная аэрация. Максимальная ЛА обнаруживалась на 2,4-е или 5-е сутки развития. Гриб синтезирует преимущественно экзолипазу, эндолипазы накапливаются очень незначительное количество. Оптимальным значением pH для выявления липазной активности является

интервал от 7,0 до 8,0. При изучении субстратной специфичности липазы *Mucor racemosus*, в реакционную смесь вносили различные масла, эмульгированные различными веществами. Как видно из результатов, наилучшим субстратом для действия липазы *Mucor racemosus* является оливковое масло, эмульгированное с помощью поливинилового спирта. Гриб *Mucor racemosus*, как показали наши исследования, помимо высокой липазной активности обладает амилазной и протеазной активностями, что может быть использовано при получении комплексных ферментных препаратов для различных отраслей промышленности и сельского хозяйства.

Изучение фосфолипазной активности показало, что приблизительно 10% изученных штаммов грибов не содержали ни фосфолипазы С, ни фосфолипазы D. Подавляющее большинство испытанных штаммов оказались способными к синтезу ФЛС. Для дальнейших исследований был отобран *Aspergillus* sp. 26.15b, как наиболее активный и определенный как *Aspergillus niger*. В дальнейшем была испытана субстратная специфичность данного штамма по отношению к лецитину и тромбопластину. Как видно из таблицы 8, исследуемый гриб способен проявлять ферментативную активность не только на яично-желточной смеси, но также и на лецитине и тромбопластине. При

Таблица 8

Субстратная специфичность ФЛС культуральной жидкости
Aspergillus niger

Субстрат	Активность фермента	
	LW/мл	Ед./минхмл
Лецитин	16	-
Тромбопластин	-	85
Яично-желточная смесь	32	-

содержании в питательной среде около 100-150 мг % аминного азота, NaHCO_3 , равное 0,5-2% глюкозы наблюдается интенсивный рост гриба, сопровождающийся значительным выходом внеклеточной фосфолипазы. Исследуя динамику изменения фосфолипазной активности было показано, что быстрый рост биомассы гриба и накопление фосфолипазы происходит в логарифмической фазе роста. Наивысшая активность фосфолипазы наблюдается в стационарной фазе роста. На этом уровне фосфолипазы фосфолипазная активность сохраняется в течение 3 суток. После этого уровень фосфолипазы снижается. При перемешивании (т. е. аэрации жидкости) биосинтез фосфолипазы происходил интенсивнее. В опытах с перемешиванием на качалках было установлено, что биосинтез фосфолипазы происходил в зоне рН 6,0-8,0. Выше рН 8,0 наблюдалось снижение накопленной активности.

Данные по изучению способности синтезировать гиббереллин микромицетами НЗП Азербайджана представлены в таблице 9. Наиболее активными продуцентами были представители

Таблица 9

Характеристика образования гиббереллина штаммами грибов

Роды грибов	Общее число испытанных штаммов	Штаммы, образующие ГПВ
<i>Acremonium</i>	6	1
<i>Penicillium</i>	14	1
<i>Cephalosporium</i>	5	-
<i>Aspergillus</i>	6	-
<i>Fusarium</i>	6	2
<i>Alternaria</i>	4	-
<i>Mucor</i>	11	1

рода *Fusarium*. При культивировании штамма *Fusarium moniliforme* 31 в жидкой питательной среде оптимальным для накопления гиббереллина является концентрация сахарозы 10-15%, эффективный источник азота - $\text{NH}_4 \text{NO}_3$, оптимальная величина C : N колеблется от 60 до 80. Различные концентрации фосфора в среде не оказывали существенного влияния на рост гриба. На средах с содержанием K_2HPO_4 -5 г/л количество гибберелловой кислоты было выше, чем в контрольной среде (2 г/л). Более высокие концентрации фосфора ингибировали образование гибберелловой кислоты. Максимальный синтез гиббереллина совпадает по времени с 4-5 суток до 12 суток, что свидетельствует о том, что вторичные метаболиты-гиббереллины наиболее активно синтезируются зрелым, но не деградирующим мицелием. Получены неочищенные препараты гиббереллиноподобных веществ из бутанольных экстрактов культуральной жидкости *Fusarium moniliforme* 31 и *Fusarium moniliforme* 11a(3) и изучена их биологическая активность на проростках разных растений. Наибольшей ростовой реакцией обладал штамм *Fusarium moniliforme* 31 по отношению ко всем проросткам, которые использовались как биотесты. Проведено также изучение патогенности и фитотоксичности выделенных штаммов *Fusarium*.

Установлено, что большинство испытанных культур *Fusarium* угнетали рост проростков гороха, кукурузы и пшеницы при воздействии как культуральной жидкости, так и мицелием гриба. Ингибирующее действие культуральной жидкости проявляли штаммы фузариев, которые не синтезировали гибберелловую кислоту. Вероятно, токсичность культуральной жидкости этих штаммов фузариев связана с их способностью образовывать фузариевую кислоту.

4. Протеолитическая активность нематофаговых грибов

Для этого были использованы 110 нематофаговых штаммов грибов, выделенных из различных биотопов Азербайджана, подверженных естественному и техногенному воздействию. Полученные результаты свидетельствуют о том, что большинство штаммов обладают протеолитической активностью, особенно два

штамма рода *Dactylaria* (таб.№10). Все грибы характеризуются высокой желатиназной и низкой казеинолитической активностью. Изучение фибринолитической активности у исследуемых нематофаговых грибов выявило, что наиболее перспективными являются представители рода *Arthrobotrys*, наивысшая активность и выход биомассы наблюдаются при pH 5,2-8,0. Обнаружено, что фибринолитическая активность нематофаговых грибов характеризуется двумя максимумами- первый- на 4-й день, второй- на 10-11 дни культивирования. Тромболитическая же активность исследуемых нематофаговых грибов обнаруживается на 3-5 день культивирования, а наивысшая активность отмечена

Таблица 10

Протеолитическая активность нематофаговых грибов на различных субстратах

Роды грибов	Количество видов/штаммов	Субстраты		
		Желатина (мм)	Молоко (мин)	Казеинат натрия КЕ
<i>Arthrobotrys</i>	12/85	19-22	15-35	2-1
<i>Nematophagus</i>	3/6	8-12	60-70	2-4
<i>Candelabrella</i>	½	10-20	35-50	1-2
<i>Golovinia</i>	3/8	7-11	55-75	2-5
<i>Dactylariopsis</i>	2/5	9-16	60-90	3-5
<i>Dactylella</i>	½	9-11	50-85	2-4
<i>Dactylaria</i>	½	8-10	70-95	3-4
<i>Nematoctonus</i>	½	7-10	30-45	1-2

у двух видов рода *Arthrobotrys*- *A. longa* и *A. compacta*. Кроме того, у грибов с высокой тромболитической активностью не наблюдаются гемолитические свойства, что может говорить о перспективности этих продуцентов.

Поскольку в природных условиях нематофаговые грибы способны к образованию ловчих аппаратов, участвующих в питании, представляло интерес изучение взаимосвязи между активностью фибринолитических ферментов и образованием ловчих аппаратов. Оказалось, что, между образованием ловчих аппаратов и усилением

фибринолитической активности хищных грибов существует прямая корреляция.

Из изученных нематофаговых грибов активными продуцентами явились *A. longa* и *A. compacta*, поэтому проводилось дальнейшее исследование некоторых вопросов ферментного синтеза именно у этих грибов. Так, изучение влияния источников углерода на синтез протеолитических ферментов показало, что используемые все источники углерода реализуют синтез протеолитических ферментов. Однако, степень активности характеризуется различными показателями и нет чёткой связи между активностью и образуемой биомассой гриба. Действие же органических кислот (янтарная, пировиноградная, яблочная, уксусная, молочная, лимонная, муравьиная, пропионовая и др.) как источников углерода сопровождается синтезом протеолитических ферментов у *A. longa*, но снижение pH среды под действием органических кислот приводит к уменьшению роста и падению активности гриба. Добавление аминокислот в питательную среду вызывает уменьшение фибринолитической активности по сравнению с контролем, что связано с катаболической репрессией.

У нематофаговых грибов было также изучено влияние различных источников азота на синтез ими протеолитических ферментов. Было установлено, что использование источников азота сопровождается протеолитической активностью грибов, а концентрация 0,02 % KNO_3 как минерального источника азота наиболее эффективна. Добавление же в среду 0,3% пептона как органического источника азота заметно повышает активность фермента (1,5-2 раза).

Совместное культивирование продуцентов является одним из методов повышения выхода протеолитических ферментов. С этой целью нами проводилось культивирование 52 штаммов грибов в различных комбинациях. Обнаружено, что в процессе синтеза протеолитических ферментов происходит основательное изменение и в результате этого приостанавливается и повышается и понижается активность. Несмотря на это, совместное культивирование *A. longa* и *A. compacta* является оптимальным, и на этот процесс влияет возраст и количество посевного материала. Наблюдаемый синергизм этих двух грибов повышает активность до двух раз.

5. Получение препаратов протеолитических ферментов и их некоторые физико-химические свойства

Для получения ферментного препарата протеолитического действия были использованы культуральные жидкости грибов *Mucor* sp.30a и *A.longa* и осадители – этанол, изопропанол, ацетон и сульфат аммония. При получении ферментного препарата штамма *Mucor* sp.30a наметилась следующая последовательность: осаждение культуральной жидкости сульфатом аммония, диализ осадка против дистиллированной воды, отделение лишних белков из диализата (центрифугированием в теч. 5 мин. при 5000 об/мин и лиофильное высушивание диализата. Полученный при использовании органических растворителей препарат обладает различным спектром протеолитического действия, однако, выход фермента бывает несколько ниже. Н-р, при степени насыщенности сульфата аммония, равном 70 %, выход ренина составляет 98,5%. При использовании этанола, изопропанола, ацетона значения ренина выражается такими показателями как 51,0%, 83,3% и 50,1% соответственно. Использование ингибитора для определения типа протеолитического фермента, синтезируемого *Mucor* sp.30a показало, что этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) приводит к понижению активности фермента, что свойственно металлоэнзимам (металлопротеазы).

При получении препарата из культуральной жидкости гриба *A.longa* культивирование проводили при 28-30⁰С в течении 4 дней в стационарных условиях с использованием соответствующих осадителей ((NH₄)₂SO₄, спирт и ацетон). Но проведенные исследования показали, что высокие количественные показатели выхода фермента наблюдаются при использовании ацетона в соотношении 1:2. Получение ферментного препарата *A.longa* методом гель-фильтрации (G-100) приводит к образованию двух белковых фракций, одна из которой обладала протеолитической активностью (рис.2). Элюенты первого пика собирали и лиофилизировали, затем исследовали некоторые свойства полученных препаратов. Для начала были определены оптимумы рН и температуры синтезируемого грибом протеолитического фермента- рН 7,2и 9,5, температура 40⁰С и 55⁰С. Это позволяет

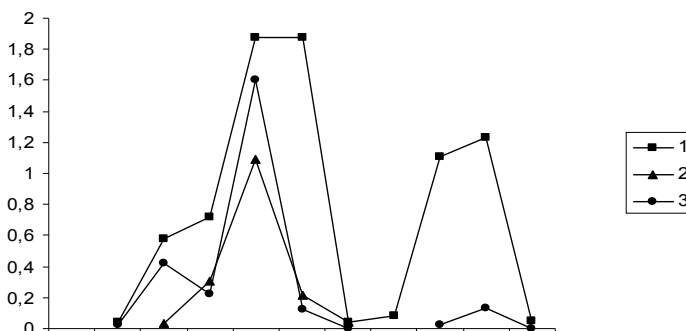


Рис.2 Очистка протеазы *A. longa* на колонке сефадекс G-100
 1-оптическая плотность элюатов при 280 мкм;
 2- протеолитическая активность;
 3-концентрация белка.

предположить, что в его протеолитическом комплексе существуют различные протеазы. Изучение стабильности протеолитических ферментов род влияния рН проводили в теч. 1 часа в интервале рН 2,5-9,5 и выяснено, что препарат стабилен в интервале рН 5,0-9,5, при рН ниже 5,0 стабильность н столь постоянна.

Термостабильность препарата проверялась в интервале 25-90⁰С. Установлено, что препарат теряет 50% активности при выдерживании в теч. 10 мин при t 65⁰С, и 100%- при 90⁰С. В ходе экспериментов по изучению влияния неорганических катионов (NH₄⁺, K⁺, Na⁺, Mg⁺², Mn⁺², Ca⁺², Cu⁺², Zn⁺², Fe⁺³) на протеазы препарата, полученного из *A.longa* стало известно, что характер влияния зависит от концентрации (10⁻⁴-10⁻²М). Так, при увеличении концентрации ионов NH₄⁺, Na⁺ увеличивается и протеолитическая активность. Концентрация ионов ж K⁺, Mg⁺², Zn⁺², Fe⁺³ в среде составляет при этом 10⁻⁴М. концентрация их при 10⁻³и 10⁻²М ингибирует активность. Для Mn⁺² и Cu⁺² это проявляется при всех исследованных концентрациях.

Исследование влияния плазмы крови на ФА препарата показало, что активность ингибируется плазмой крови и его степень зависит от количества белка.

Было также проведено изучение ферментативного комплекса

фибринолитического действия с широкой субстратной специфичностью и его роли в проявлении хищнической (нематоцидной) активности. Для этого препарат, содержащий 50 мкг/мл белка растворяли в 50 мл бидистиллята и по три капли наносили на часовые стекла, куда вносили по 15 почвенных нематод. Выдерживали в условиях термостата при 37°C (условия благоприятные для действия фибринолитического препарата). Наблюдения вели через каждый час; опыты проводили в пяти повторностях. Как показали результаты опыта гибель нематод наступала через 3-4 часа. Но при повторении опыта с лиофилизированным препаратом гибель нематод наступала через 48 часов, что мы приняли практически за отсутствие активности. Вероятно, что связано с неудовлетворяющим нас режимом лиофилизации.

Ферментные препараты. Из культуральной жидкости гриба *Mucor gaeamosus* осаждением сульфатом аммония с последующим диализом полученного белкового осадка был получен технический препарат липазы. Изучение физико-химических свойств препарата показало его высокую термо- и рН стабильность. Изучена также субстратная специфичность и влияние ионов металлов на ЛА *Mucor gaeamosus*.

В результате проведенных 3-х стадий очистки был получен препарат фосфолипазы С из гриба *Aspergillus niger*. На рис.3 представлена хроматография ФЛС на сефадексе G-100. Изучение субстратной специфичности фосфолипазы *Aspergillus niger* показало, что наиболее интенсивно расщепляется лецитин и липопротеиды яичного желтка. Интересно отметить, что гидролиз возможен лишь в присутствии в среде натриевой соли дезоксихолевой кислоты, для проявления максимальной фосфолипазной активности требуются ионы Ca^{2+} и Zn^{2+} в концентрации 6 мМ и 6 мкМ соответственно. Незначительное торможение активности наблюдается при инкубации фермента с ЭДТА в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М. Продолжение инкубации до 24 час. приводит к 30%-ной инактивации фосфолипазы.

Полученный препарат имел две области оптимальных значений – рН 7,0 и 10,5. Исследование температурной стабильности

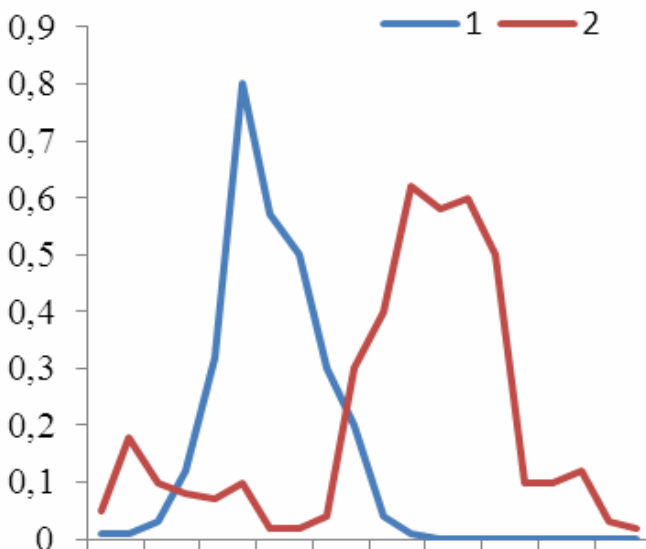


Рис. 3 Хроматография фосфолипазы *Aspergillus niger* через сефадекс G-100

1- время коагуляции, сек.; 2- абсорбция при 280 нм;

фосфолипазы *Aspergillus niger* показало, что фермент термостабилен.

ВЫВОДЫ

1. Из образцов нефтезагрязненных почв Апшерона и почв месторождения нафталановой нефти, а также самой нафталановой нефти выделено в чистую культуру в общей сложности 108 грибных штаммов, относящихся к 20 родам. Проведен скрининг выделенных штаммов в отношении деградации нафталановой нефти, её фракций и ряда углеводородных субстратов. Отобраны 4 наиболее активных грибных штамма, принадлежащих к родам: *Cephalosporium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*.
2. Установлены оптимальные условия для исследованных четырех активных штаммов культур, обеспечивающие максимальное накопление биомассы и наиболее полное

потребление нефтяного субстрата: 1) NaNO_3 от 0,06 до 0,2% по азоту, 0,5% пептона, 2% нафталановой нефти, сахарозы 0,05% в среде; 2) pH среды 6,2-7,2; 3) стационарные условия культивирования; 4) оптимальные температуры роста 26°C - 30°C ; 5) количество посевного материала составил 6×10^4 - 6×10^6 и 6×10^6 - 6×10^8 .

3. Показано, что максимальная степень конверсии нафталановой нефти у исследованных штаммов отмечается у *Penicillium sp. 3n* и составляет 43% на 20 сутки развития в стационарных условиях. Хроматографический анализ исходной нафталановой нефти и продуктов ее биodeградации подтверждает тот факт, что биodeградация сопровождается окислением в алкильном радикале боковой цепи полициклических нафтеновых углеводов.
4. Исследование биodeградирующей способности активных деструкторов нафталановой нефти в лабораторных условиях позволило установить, что наилучшие результаты в биodeградации нафталановой нефти (70%) отмечены у ассоциации, включающей смесь грибных и бактериальных культур, что позволяет использовать её в качестве биопрепарата для очистки нефтезагрязненных почв.
5. Исследование способности хищных грибов к биосинтезу протеолитических ферментов показало, что это свойство широко распространено у изученной группы грибов, среди которых штамм - *A. longa*, выделенный из НЗП, обладал повышенной фибринолитической активностью. Увеличение выхода фибринолитического фермента грибом *A. longa* отмечено при сочетании в питательной среде - лактат натрия 0,3% и сахароза 2%, 2% сахароза и 0,1%, глицерин, оптимальное соотношение С и N в среде - 1% сахарозы и 0,09% NaNO_3 .
6. Показано, что при совместном культивированию *A. longa*-гриба-продуцента внеклеточных протеолитических ферментов тромболитического действия и *A. oligospora*, неактивного в отношении синтеза названных ферментов, обнаружен факт стимуляция, в результате которого биосинтез экзопротеаз увеличивается более, чем в 2 раза.

7. Установлено, что определенные концентрации нитрата калия (0,2%-0,5%) оказывают стимулирующий эффект на процесс кольцообразования и одновременно способствуют повышению фибринолитической активности, что делает возможным использование его для повышения хищнической активности препаратов нематотрофных грибов, вносимых в почву для борьбы с фитонематодами.
8. Методом осаждения белка ацетоном и дальнейшей очистки на сефадексе G-100 получен ферментный препарат, обладающий значительной фибринолитической активностью и слабой казеинолитической. Препарат обладает двумя максимумами активности - при $\text{pH} = 7,2$ и $\text{pH} = 9,5$, температурах 40^0 и 55^0 С. Ионы NH_4^+ , Na^+ по мере возрастания концентрации увеличивают протеолитическую активность. Ионы K^+ , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+3} в концентрации 10^{-4} М повышают активность протеаз препарата, в концентрации 10^{-2} и 10^{-3} М ингибируют её. Ионы Mn^{+2} , Cu^{+2} при всех исследованных концентрациях угнетают протеолитическую активность.
9. Из фильтрата культуральной жидкости *Mucor hiemalis* высаливанием сульфатом аммония (0,7 от полного насыщения) выделен протеолитический препарат, обладающий высокой сычужной (ренин) активностью, который по типу относится к металлоэнзимам.
10. В результате исследования липолитической активности выделенных микромицетов отобран наиболее активный продуцент липаз – *Mucor racemosus*, проявляющий максимальную липолитическую активность на средах, содержащих соевую муку. Обнаружено, что максимальное накопление липазы в культуральной жидкости у *Mucor racemosus* происходит в период экспоненциальной фазе роста, что соответствует 2, 4-м или 5-м суткам развития в зависимости от состава среды. Для проявления максимальной активности липазы *Mucor racemosus* необходимым является температура 26-28°, сильная аэрация, интервал pH от 7,0 до 8,0.
11. Получен технический препарат липазы *Mucor racemosus*,

проявляющий высокую стабильность в зоне относительно высоких температур. Ионы Pb^{2+} , Ca^{2+} в больших концентрациях повышают активность на 6-8%. Ингибирующий эффект проявляют ионы Ba^{2+} и Zn^{2+} - 25% потери активности. Ртуть в концентрации 2×10^{-2} и 2×10^{-5} М снижала активность липазы на 78 и 40% соответственно.

12. Изучение фосфолипазной активности выявило, что среди выделенных микромицетов наиболее активным является - *Aspergillus niger*, для которого были подобраны оптимальная питательная среда и условия культивирования. Путем фракционирования сульфатом аммония, осаждения этиловым спиртом, обработки протаминсульфатом с последующей гельфильтрацией через сефадекс G-100 из культуральной жидкости *Aspergillus niger* получен препарат фосфолипазы С, который проявлял высокую термо- и рН стабильность с широкой субстратной специфичностью.
13. Проведение изучения способности микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв к образованию гиббереллина, показало, что его наиболее активно синтезирует грибы рода *Fusarium*. Было выявлено, что оптимальным содержанием в питательной среде является 8% сахарозы, 0,3% NH_4NO_3 , 5 г/л KH_2PO_4 и соотношение С : N – 60 : 1. Обнаружено, что максимальное накопление гиббереллина в культуральной жидкости гриба *Fusarium moniliforme* происходит в стационарной фазе роста. Исследование физиологической активности препаратов гиббереллина из разных штаммов по отношению к проросткам гороха, кукурузы, огурца, пшеницы выявило наибольшую ростовую реакцию у штамма *Fusarium moniliforme*.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Касумова С.Ю., Наджафова И.Х., Рустамова Н.Г. Рост грибов, выделенных из почв Апшерона на дизельном топливе и различных углеводородах. I Бакинская международная

- Мамедалиевская Нефтехимическая конференция, тезисы докладов,1998, с.377.
2. Касумова С.Ю., Наджафова И.Х., Рзаева Л.А. Рост грибов,выделенных их нефтезагрязненных почв Апшерона, на дизельном топливе и различных углеводородах. // «Известия» НАНА, серия биологических наук, 2001, № 4-6, с.145-149.
 3. Аббасова Т.Х., Наджафова И.Х., Касумова С.Ю. Влияние условий культивирования на рост грибов деградирующих нафталановую нефть. / Kimya-biologiya Elmləri və təhsilin aktual problemləri, Respublika elmi Konfransının materialları, 5-7 XI-2001 ADPU,s.36-37
 4. Qasımova S.Y., Nəcəfova İ.X., Naftalan petrolunun mikrobioloji parçalanması./ XVI Ulusal Biologi kongresi, Özetler, 4-7- XI, 2002, Malatya, s.190.
 5. Qasımova S.Y., Nəcəfova İ.X.,Abbasova T.X., Zeynalova E.N. Bəcərlmə şəraitin Naftalan neftinin deqradasiya edən göbələklərin böyüməsinə təsiri. / Azərbaycan elmi tədqiqat Baytarlıq İnstitutunun yaradılmasının 100-illik yubileyinə həsr edilmiş beynəlxalq elmi konfransın materialları, 2002, s.199-202.
 6. Касумова С.Ю., Наджафова И.Х., Аббасова Т.Х., Зейналова Э.Н..Влияние условий культивирования на рост грибов деградирующих нафталановую нефть./Материалы Международной конференции на тему «Экологии и его охрана». Сумгаит, 2002, IV т. с.130.
 7. Qasımova S.Y. Vəzi saprotrof torpaq və parazit nematod göbələklərində lesitinaza fermentinin aktivliyi. // Mikroorqanizmlərin fiziolojji-biokimyəvi və ekoloji xüsusiyyətləri, Bakı, 2003, s.48-51.
 8. Касумова С.Ю., Наджафова И.Х. Поиск и выделение активных микроорганизмов-деструкторов нафталановой нефти. // Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2003, с.139-143.
 9. Касумова С.Ю., Наджафова И.Х., Рзаева Л.А., Гасымова С.Г. Активность некоторых ферментов нефтезагрязненных почв Апшерона. // «Известия» НАНА, серия биологических наук, 2003, № 1-2, с.165-168.

10. Касумова С.Ю., Мамедъяров М.А., Бабаева И.Х. Изучение конверсии нафталановой нефти грибными штаммами. // Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2003, с.98-101.
11. Qasımova S.Y., Məmmədyarov M.Ə., Babayeva İ.X., Abbasova T.X. Göbələklərin naftalan neftində böyüməsinə azot və karbon mənbələrinin təsiri.// AMEA-nın Botanika İnstitutunun elmi əsərləri, Bakı: "Elm" 2004, c.XXV, s.505-507.
12. Касумова С.Ю. Экологические аспекты ассимиляции нафталановой нефти грибами./Материалы Международной конференции на тему «Актуальные проблемы экологии», Гродно, 2004, с.171-173.
13. Касумова С.Ю. Поиск и выделение микромицетов, ассимилирующих нафталановую нефть. / Материалы Международной конференции на тему «Биология систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах». Минск, 2004, с.116-119.
14. Касумова С.Ю., Абдуллаева Х.Д., Гурбанова Г.Х. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы почв Северо-Восточной части Азербайджана. / Физиолого-биохимические и экологические особенности микроорганизмов. Материалы международной конференции. Баку:« Элм », 2005, с.77-79.
15. Касумова С.Ю. Нафталановая нефть - физико-химические свойства и биологическая активность. // Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2005, s.53-68.
16. Qasımova S.Y. Study of soil microflora of Nafththalane oil-fields. / The Eight Baku International Congress «Energy, Ecology, Economy» in association with UNESCO & Urmia University/ Iran, Baku – 2005, p.528-531
17. Касумова С.Ю., Мамедъяров М.А., Бабаева И.Х., Велиев М.Г., Бекташи Н.Р. Микробное окисление нафталановой лечебной нефти. // Доклады НАНА, 2005, № 1, с.121-128
18. Касумова С.Ю. Микромицеты нефтезагрязненных почв-деструкторы нафталановой нефти. // Azərbaycan Torpaqsunaslار Səmiyyətinin Əsərləri, 2005, c. X, h. II, s.224-228.
19. Касумова С.Ю. Культивирование микромицетов на средах с нафталановой нефтью. // «Известия» НАНА, серия биологических наук, 2005, № 3-4, с.154-160.

20. Касумова С.Ю. Ферменты нефтезагрязненных почв. // Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2006, s.27-38.
21. Касумова С.Ю. Изучение биосинтеза ростовых веществ микроорганизмами, деградирующими нафталановую нефть. // Труды Института Ботаники НАНА. Баку:Элм, 2006, с.27-29.
22. Касумова С.Ю. Микробиологический синтез гибберелинов. // Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2007, IV т., с.26-33.
23. Касумова С.Ю. Сравнительное изучение микробиоты месторождений нефти Нафталана и Апшерона. // Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2007, V т. с. 52-55.
24. Касумова С.Ю. Изучение биodeградирующей способности нафталанокисляющих микроорганизмов. / Материалы II Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии и природопользования в Казахстане и сопредельных территориях, 2007, т.2, с.66-68.
25. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Ашрефи Ф.Д. Влияние состава среды на биосинтез липаз микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана. // Труды Института Ботаники НАНА. Баку:Элм, 2007, с.141-145.
26. Qasımova S.Y., Qurbanova Q.H. Spesifik substratların peroksidaza oksidləşməsinin bəzi göbələklərdə peroksidaza aktivliyinə təsiri. // Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası Mikrobiologiya İnstitutunun Elmi Əsərləri. Bakı: "Elm" nəşriyyatı, 2007, c.IV, s.106-108.
27. Касумова С.Ю., Наджафова И.Х.. Некоторые физиолого-биохимические особенности грибов-деструкторов нафталановой нефти. // «Известия» НАНА, серия биологических наук, 2007, № 5-6, с. 123-128.
28. Касумова С.Ю. Особенности распространения микроорганизмов в почвах нефтеносного района Нафталана. // Труды Института Ботаники НАН Азербайджана, Баку, 2007, т. XXVII, с.277-280.
29. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Ашрефи Ф.Д. Липолитическая активность микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана. // Труды Института Ботаники НАН Азербайджана, Баку, 2007, т.XXVIII, с.244-247.
30. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Ашрефи Ф.Д. Условия биосинтеза экзолипазы грибом *Mucor racemosus*. / Сборник

- материалов международной научной конференции: «Биология: теория, практика, эксперимент». Саранск, 2008, с.108-112.
31. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Ашрефи Ф.Д. Влияние нефтяного загрязнения на ферментативную активность серо-бурых почв Апшерона «Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря и водоёмов внутреннего стока Евразии» // Материалы X Международной научной конференции, посвященной 450-летию Астрахани. Астрахань, 2008, с.156-157.
 32. Касумова С.Ю., Наджафова И.Х. Разложение нафталановой нефти грибными культурами. / Сборник материалов международной научной конференции: «Биология: теория, практика, эксперимент». Саранск, 2008, с. 116-120.
 33. Касумова С.Ю. Сравнительная активность микромицетов-деструкторов нафталановой нефти, выделенных из нефтезагрязненных почв различных регионов Азербайджана. // «Известия» НАНА, серия биологических наук, 2008, № 1, с.128-138.
 34. Мурадов П.З., Ашрефи Ф.д., Касумова С.Ю. Липолитическая активность микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана. // Труды Института Ботаники НАН Азербайджана, Баку, 2008, т. XXVIII, с.244-247
 35. Qasimova S.Y., Babayeva I.X. Utilization of naphthalane oil by micromycetes. // Журнал Микробиологии и Биотехнологии(Грузия), 2009, т.1, №1, с.24-28.
 36. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Ашрефи Ф.Д. и др. Влияние состава питательных сред на биосинтез некоторых гидролаз микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана. // Вестник МГОУ, серия «Естественные науки», 2009, №3, с.45-48
 37. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Гасанов Х.А., Намазов Н.Р. Образование протеолитических ферментов грибами рода *Arthrobotrys* в связи с фибринолитической активностью. // Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2009. Т.VII, с.270-273
 38. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Гасанов Х.А. Изучение образования протеолитического комплекса у хищных грибов. //

- Вестник МГОУ, серия «Естественные науки», 2009, №4, с.102-105.
39. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Хорасани М.М., Гасанов Х.А., Намазов Н.Р., Ферментативная активность микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана. / Материалы Международной конференции на тему «Современные проблемы экологии и экологического образования». Орехово-Зуево, 2009, с.107-111.
 40. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Намазов Н.Р., Изучение образования протеаз с фибринолитическим действием у хищных нематофаговых грибов. // Журнал «Иммунопатология, аллергология, инфектология», 2010, № 1, с.252
 41. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Гасанов Х.А. Влияние различных источников азота на образование протеолитических ферментов гриба *Arthrobotrys compacta*. // Вестник МГОУ, серия «Естественные науки», 2010, №1, с. 48-51.
 42. Касумова С.Ю., Мурадов Гасанов Х.А., Намазов Н.Р. Протеолитическая активность микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана. // Azərbaycan Torpaqsünaslar Cəmiyyətinin Elmi Əsərləri, 2010, с.XI, h.I, s. 275-282
 43. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Хорасани М.М., Асланова У.Ч. Лецитиназная активность микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана. // Azərbaycan Torpaqsünaslar Cəmiyyətinin Elmi Əsərləri, 2010, с.XI, h.I, s.264-274
 44. Касумова С.Ю., Мурадов П.З. Влияние состава питательной среды на рост микромицетов, ассимилирующих нафталановую нефть. // Вестник МГОУ, серия «Естественные науки», 2010, № 3, с.37-41
 45. Касумова С.Ю., Бабаева И.Х. Изучение микробиологической деградации нафталановой нефти// Журнал «Микробиология и биотехнология»(Грузия), 2010, т 2, №1, с.44-47.
 46. Касумова С.Ю. Протеолитические ферменты - классификация и биологическое назначение.//Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2011, т.9, №2, с.76-91.

47. Касумова С.Ю., Мурадов П.З., Бабаева И.Х. Исследование лецитиназной активности некоторых почвенных микромицетов. / Сборник материалов международной научной конференции: «Наука и современность». Москва, 2011», с.23-27.
48. Касумова С.Ю. Нафталановая нефть- биологическая активность и физико-химические свойства. // Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2012,т. X , №1, с.92-106.
49. Касумова С.Ю., Бабаева И.Х.Активность грибных штаммов месторождения нафталановой нефти. //Труды Института Микробиологии НАНА. Баку:Элм, 2012, с. 10, №2, s. 134-138.

Svetlana Yusif qızı Qasımova
AZƏRBAYCANIN NEFTLƏ ÇİRKƏNƏN MİKROMITSETLƏRİNİN
MİKROMITSETLƏRİ

İşin məqsədi Azərbaycanın müxtəlif neftləçirklənmiş torpaqlarında yayılmış mikromitsetlərin öyrənilməsi və onlar arasından, nəfalan nefinin aktiv destrukturlarının və bioloji aktiv maddələrin fəal produsentlərinin seçilməsidir.

Nəticədə ilk dəfə olaraq Naftalan mənbəyindən və müqayisə üçün Abşeronun neftlə çirklənmiş torpaqlarından naftalan neftini deqradasiya edən mikroorganizmlər (göbələk və bakteriya kulturaları) ayrılmış və dörd aktiv göbələk ştamminin (*Penicillium sp.3*, *Fusarium sp. 11a*, *Mucor sp.6*, *Cephalosporium sp. 45*) naftalan neftini maksimal deqradasiyasını təmin edən optimal becərilmə şəraiti və qidalı mühitinin tərkibi seçilmiş, eləcə də naftalan neftinin və onun fraksiyalarının konversiyası və deqradasiya məhsulları öyrənilibdir.

Tədqiqatlar zamanı Azərbaycanın neftlə çirklənmiş ərazilərindən seçilmiş 108 mikromitset ştammi proteolitik aktivliyinə görə xarakterizə edilmiş, *Mucor* cinsindən olan göbələklərin proteolitik ferment sisteminin daha fəal olması müəyyən edilmişdir ki, bu da özünün ən yüksək göstəricisini *Mucor hiemalis 30a* ştamminə tapmışdır. Etilendiamintetraasetatın (EDTA) təsiri *M.hiemalis 30a* ştamminə sinez ediyi fermentin aktivliyini zəiflədir ki, buda onun metalloenzimlərə(metalloproteaza) aid olunmasını təsdiqləyir.

Müəyyən edilmişdir ki, proteazalar nematofaq göbələklərin ferment sistemində əhəmiyyətli yer tutur və onlar fibrinolitik təsirə malik proteazaların aktiv produsenti kimi perspektivlidirlər və bu xüsusiyyət *A.longa* və *A.compacta* kimi növlərdə daha aydın şəkildə özünü göstərir. Bu göbələklərin sintez etdiyi trombolitik təsirə malik ferment qanda hemoliz hadisəsi törətmir.

Neftlə çirklənmiş torpaqlardan ayrılmış mikromitsetlərdə hibberelinin əmələ gəirmə xüsusiyyətləri öyrənilmişdir. Məlum olmuşdur ki, ən fəal produsentlər *Fusarium* cinsinin nümayəndələridir. Hibberelinin əmələ gəitirməyən ştammların kultural mayesi isə bəzi kənd təsərrüfatı bitkilərinin böyüməsini dayandırır.

Svetlana Yusif Qasımova
THE MICROMYCETES OF OIL-CONTAMINATED SOIL
OF AZERBAIJAN

The aim of submitted work is the study of micromycetes isolated from Absheron and naphthalan oil source soils, investigation and isolation of micromycetes actively degrading naphthalan oil and different hydrocarbons, the selection producers of hydrolytic enzymes and gibberellins.

As a result of conducted investigations for the first time there have been isolated cultures of microorganisms (fungal and bacterial) from naphthalan oil source soil and oil contaminated soil of Absheron capable for naphthalan oil degradation. In the sample of 4 active fungal strains as *Penicillium sp.3*, *Fusarium sp. 11a*, *Mucor sp.6*, *Cephalosporium sp. 45* optimal cultivation conditions and composition of nutritious medium supplying maximal growth and naphthalan oil degradation have been chosen. For the first time there has been investigated conversion of naphthalan oil and its fractions by active strains and studied products of naphthalan oil degradation.

During investigations it was studied proteolytic activity of 108 strains of microscopic fungi isolated from different biotopes of Azerbaijan. It was revealed that among the fungi isolated from oil-contaminated soils of Azerbaijan, representatives of the genus *Mucor* are characterized by high activity of proteolytic enzymes and fungus *Mucor hiemalis Webmer 30* is an active enzyme producer. It was identified that EDTA strongly inhibits proteolytic enzymes synthesized *M.hiemalis 30*, that allows to relate it to metalloproteases.

It was found that nematophag fungi have a strong proteolytic enzyme system and *Arthrobotrys compacta* and *A.longa* can synthesize proteolytic enzymes which are metallo and serine proteases. Besides, proteolytic enzymes have a wide range of activities, including thrombolytic one, although these enzymes do not cause hemolysis of blood.

The ability to synthesise gibberellin was found out in strains belonging to genus *Fusarium*. Marked inhibitory effect of the culture liquid in certain *Fusarium* strains that are not synthesized gibberellins on the some agricultural plants.

AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
MİKROBİOLOGİYA İNSTİTUTU

Əlyazması hüququnda

SVETLANA YUSİF QIZI QASIMOVA

AZƏRBAYCANIN NEFTLƏ ÇİRKLƏNMİŞ TORPAQLARININ
MİKROMİTSETLƏRİ

2414.01- “Mikrobiologiya”

Biologiya üzrə elmlər doktoru alimlik
dərəcəsi almaq üçün təqdim olunan dissertasiyanın

AVTOREFERATI

BAKI – 2014