

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedra

Daivos Seletytės

**Celiuliozę ir chitiną ardančių mikromicetų išskyrimas ir jų
aktyvumo bei sąveikos analizė**

Magistro darbas
(Mikologija)

Darbo vadovė:
dr. Dalė Pečiulytė

Vilnius
2007

TURINYS

TERMINŲ SAŲOKOS	3
IVADAS	4
3. LITERATŪROS APŽVALGA	6
3.1. Gamtiniai angliavandeniai. Polisacharidai	6
3.1.1. Celiuliozė	6
3.1.1.1. Paplitimas (telkiniai) gamtoje	6
3.1.1.2. Struktūra	7
3.1.2. Chitinas	8
3.1.2.1. Paplitimas (telkiniai) gamtoje	8
3.1.2.2. Struktūra	9
3.2. Mikroorganizmai polisacharidų apykaitos ir destrukcijos procesuose	10
3.2.1. Polisacharidų sintezė	10
3.2.2. Celiuliozės destrukcija (transformacija, utilizavimas, hidrolizė)	11
3.2.3. Chitino destrukcija	15
3.3. Mikroorganizmų tarpusavio santykis celiuliozės ir chitino aplinkoje	18
3.3.1. Kompleksinis aktyvumas ardant celiuliozę arba chitiną	18
3.3.2. Konkurencija, antagonizmas, agresyvumas, parazitavimas	19
4. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	23
5. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI	23
5.1. Mikromicetų išskyrimas iš natūralių substratų	23
5.2. Aktyvių celiuliazinių ir chitinazinių producentų atranka	24
5.3. Celiuliazinio aktyvumo tyrimas	26
5.4. Chitinazinio aktyvumo tyrimas	28
5.5. Potencialių bioagentų atranka	30
6. REZULTATAI	31
6.1. I SKYRIUS. Celiuliazinių ir chitinazinių mikromicetų kamienų paplitimas natūraliuose substratuose	31
6.1.1. Dirvožemio mikromicetai	31
6.1.2. Mikromicetai išskirti iš antropogeninių substratų	36
6.2. II SKYRIUS. Mikromicetų gebėjimas vystytis terpėse su vieninteliu anglies šaltiniu celiulioze arba chitinu	40
6.2.1. Gebėjimas pasisavinti celiuliozę	40
6.2.2. Gebėjimas pasisavinti chitiną	45
6.3. III SKYRIUS. Celiuliozės ir chitino hidrolizės fermentai	46
6.3.1. Celiuliozės hidrolizė – Endogliukanazinis (karboksimetilceliuliazinis – KMCazinis) ir filtrinio popieriaus celiuliazinis (FPCzinis) aktyvumai	46
6.3.2. Chitinazinis aktyvumas	50
6.4. IV SKYRIUS. Mišrių ir pavienių kultūrų vystymosi celiuliozės hidrolizės palyginimas	54
6.5. V SKYRIUS. Mikromicetų tarpusavio sąveika terpėse su celiulioze arba chitinu	57
6.5.1. Konkurencija, antagonizmas/parazitavimas (bioagentai)	58
IŠVADOS	64
SANTRAUKA	66
SUMMARY	69
PADEKA	71
LITERATŪROS SĄRAŠAS	72
PRIEDAS	79

TERMINŲ SAVOKOS

KMC – karboksimetilceliuliozė

KMCazė – karboksimetilceliuliazė

I_{KMC} – santykinis fermento karboksimetilceliuliazės (endogliukanazės) aktyvumas

FPCazė – filtrinio popieriaus celiuliazė

KSV – kolonijas sudarantys vienetai

ČMT – Čapeko mineralinė terpė

BDA – bulvių dekstrozės agaras (PDA)

AMA – alaus misos agaras

ČA – Čapeko agaras

KCH – koloidinis chitinas

CM – celiuliozės milteliai (smulkinta celiuliozė)

DNS – dinitrosalicilinė rūgštis

FRBC – fosforo rūgštimi brinkinta celiuliozė

IVADAS

Kiekvienoje augavietėje, įskaitant laukus ir sodus, ekologiniai veiksniai susieja augalus, grybus, bakterijas, vabzdžius ir kitus organizmus. Kai kurių jų gausa gali sukelti augalų derliaus nuostolius. Augintojų pastangos sumažinti derliaus nuostolius brangiai kainuoja ir dažnai duoda labai menkus rezultatus. Mikromicetai yra vieni iš pavojingiausių augalams mikroorganizmų. Augalų antžeminis paviršius ir jų šaknų sistema yra ypatingai palanki buveinė jiems vystytis. Patogeniškų dirvožemio mikromicetų (*Phythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* ir kt.) kamienai gali sunaikinti sėklų daigelius, pradėjusius augti daigus arba jau brandų augalą. Naudojamos prevencinės priemonės (kenkėjų ir ligų reguliavimas kultūriniais metodais, jų monitoringas) ne visada pasiteisina ir tenka naudoti tiesioginius kontrolės metodus. Cheminės priemonės, naudojamos kovai su augalų ligų sukėlėjais turi neigiamų pasekmių. Jų naudojimas kenkia žmogui, aplinkai, be to ilginiui augalų patogenai tampa atsparūs cheminių medžiagų poveikiui (Handelsman, Eric, 1996). Nepalanku ir tai, kad cheminės kovos priemonės slopina ne tik patogeninių, bet ir saprofitinių grybų, tame tarpe mikorizės, vystymąsi, taip pakenkdamas mikroorganizmų ir augalo simbiozės procesams. Ieškoma naujų, nekenksmingų aplinkai priemonių pasitelkiant augalinės kilmės medžiagas ir net pačius mikroorganizmus. Biologinei kovai skiriamas ypatingai didelis dėmesys. Kai kurie mikroorganizmai – bakterijos (*Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*) ir mikromicetai (*Ampelomyces*, *Candida*, *Gliocladium*, *Trichotecium*, *Coniothyrium*, *Trichoderma* ir kt.) jau yra registruoti kaip biopesticidai. Bakterijos biokontrolėje dalyvauja ne tik išskirdamos įvairius antibiotikus (ituriną A, surfaktiną, glioviriną, gliotoksiną, pirolnitriną, pioluteoriną, fenezino – 1 – karboksilatą), bet ir naudodamos tam tikrus baltymus. Daugiausia baltymo harpino išskiria *Bacillus thuringiensis* (Brian ir kt., 2002). Vis dažniau bioagentų sąrašuose randami aktinomicetai (Soares ir kt., 2006). Dažno patogeno *Fusarium oxysporum* slopinimui jau sėkmingai naudojami tos pačios rūšies kamienai, nepasižymintys patogeniškumu, bet taip pat aktyvūs substrato atžvilgiu kaip ir patogenas. Tai geriausias antagonistinio varžymosi dėl substrato panaudojimo biologinėje kovoje pavyzdys. Galimybę kontroliuoti augalų ligų sukėlėjus antagonistiniais mikroorganizmais pirmieji pateikė užsienio mokslininkai – Blakeman (1985), Mercier ir Reekender (1987), Pandey (1993). Tokie tyrimai atliekami ir Lietuvoje (Vilniaus universitetas, Botanikos institutas - Fitopatogeninių mikroorganizmų laboratorija), tačiau labiau orientuojamasi į antagonistų (mikromicetų ir bakterijų) išskiriamų antibiotikų efektyvumą slopinant patogenų vystymąsi. Tradiciškai dažniau tiriami ir naudojami *Trichoderma harzianum* ir *T. viride* kamienai. Tačiau autorių Gohel ir kt. (2006) potencialių antagonistų apžvalgoje bei pastarojo dešimtmečio publikacijose akcentuojami ir kitų genčių mikromicetai – aktyvūs prieš augalų ligų sukėlėjus.

Beveik neištirta Lietuvoje paplitusių mikromicetų – potencialių bioagentų fermentinis aktyvumas skirtingų substratų aplinkoje ir grybų tarpusavio sąveikos procese, mažiau nagrinėjami ir kitų netradicinių genčių mikromicetų kamienai. Kadangi mikroorganizmų išskiriami antibiotikai nėra neutralūs aplinkai, labai svarbu surasti biologinei kovai mikroorganizmų kamienus, gebančius slopinti patogenų vystymąsi kitu keliu – ardant patogeno ląstelių sienelės antagonistu išskiriamais egzofermentais (chitinazės, proteazės, gliukanazės ir kt.).

Dauguma antagonistų, kaip ir patogenų turi gerai išvystytą celiuliazinių ir/ar chitinazių kompleksą. Celiuliozė ir chitinas yra gausiausi biologiniai polimerai gamtoje. Jų struktūra nesudėtinga, tačiau kristalinės struktūros substratai suskaldomi iki mažų molekulių tik veikiant keliems fermentams. Išskiriamų substrato hidrolizei fermentų koncentracija ir aktyvumas priklauso nuo grybo rūšies ir aplinkos, kurioje jis vystosi. Šių fermentų kompleksas yra svarbus patogeniui, atakuojančiam augalą ir bet kuriam mikromicetui, konkuruojančiam dėl mitybinio substrato. Stabdant patogeno celiuliazinį aktyvumą, užkertamas kelias jo prasiskverbimui į augalą-šeimininką, o aktyvuojant antagonisto celiuliazinį aktyvumą, skatinamas jo vystymasis nepažeidžiant augalo bet slopinant patogeną (Okigbo, 2005). Kadangi visų micelinių grybų, tame tarpe ir patogeniškų (išskyrus *Pythium*) ląstelių sienelės struktūrinis elementas yra chitinas, chitinazių kompleksas yra labai svarbus parazitavimo procese, ir neliko nepastebėtas ieškant alternatyvių fungicidams biologinės kovos priemonių. Intensyviai tiriamos mikromicetų-antagonistų chitinazės, atrenkami potencialūs chitino utilizatoriai, pasižyminčių stabiliu chitinazių kompleksu.

Aktyvių celiuliozę ir chitiną hidrolizuojančių mikromicetų paiešką ir jų detalesnius tyrimus skatina taip pat ir šiomis medžiagomis turtingų buitinių ir pramoninių atliekų perdirbimo problema. Poreikis efektyvių, pasižyminčių specifinėmis savybėmis (termostabilios, veiksmingos rūgščioje ar šarminėje aplinkoje) ir stabilių celiuliazinių bei chitinazių išaugo, valdant atliekų transformacijos procesą iki reikiamų tarpinių produktų arba galutinių – monomerų susidarymo. Mikromicetų fermentai tarnauja daugelyje sričių, kur reikia vieną polisacharidą atskirti nuo kito arba išgryninti iš mišinio ar suskaldyti jį iki cukraus.

LITERATŪROS APŽVALGA

1. Gamtiniai angliavandeniai. Polisacharidai

Angliavandeniai – polifunkciniai junginiai, aktyviai dalyvaujantys žmogaus, gyvūnų ir augalų gyvybinėse funkcijose. Angliavandeniai sudaro 80% sausosios augalų masės ir 2% sausosios gyvūnų masės ir dažniausiai yra polisacharidai. Polisacharidai (poliglikozidai) – gamtinės stambiamolekulinės medžiagos (gamtiniai polimerai), susidariusios iš daugelio glikozidiniais ryšiais susijungusių monosacharido likučių. Polisacharidų molekulės būna linijinės arba šakotos, susidariusios iš vienodų arba skirtingų monosacharidų. Pirmosios grupės polisacharidai vadinami homopolisacharidais, o antrosios – heteropolisacharidai. Svarbiausi homopolisacharidai yra krakmolai, glikogenai, celiuliozė ir chitinas. Literatūrinėje dalyje, kaip ir šiame tyrime, didesnis dėmesys skiriamas dviem polisacharidams: celiuliozei ir chitinui.

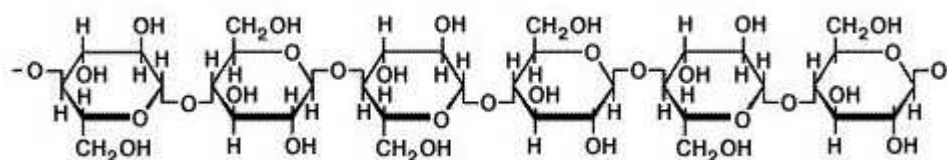
1.1. Celiuliozė

1.1.1. Paplitimas (telkiniai) gamtoje.

Celiuliozė – vienas iš gausiausių biologinių polimerų Žemėje (Karlsson ir kt., 2002). Nustatyta, kad apie 7.2×10^{11} tonų gamtinės celiuliozės sukaupta augaluose. Per metus augalai susintetina vidutiniškai apie 4×10^{10} tonų celiuliozės (Coughlan, 1985). Nors didžiausia celiuliozės dalis randama augalų ląstelėse, sintetinais formais ir stabilumui išlaikyti, ją sintetina ir kai kurie gyvūnai (pvz. tunikatai), mikrogyvūnai (Lyndt ir kt., 2002), keletas bakterijų ir jūrinių dumblių (Schwarz, 2001). Gamtoje celiuliozės makromolekules glaudžiai apsupa kiti polimerai tokie kaip ksilanas, hemiceliuliozės komponentai ir ligninas, sudarydami matricą. Nuo tokios tarpusavio sąveikos priklauso substrato inertiškumas bei jo utilizacija, reikalaujanti papildomo cheminio apdorojimo. Linijinis nesudėtingos cheminės struktūros polimeras – celiuliozė yra mechaniškai atsparus, chemiškai inertiškas polimeras dėl daugybės vandenilinių jungčių tarp makromolekulių. Būtent šią jos savybę panaudoja gamta: celiuliozė – konstrukcinė augalų medžiaga (medienoje jos yra ~50%). Augalinėse ląstelėse celiuliozė sudaro ląstelės sienelės kaip kompozito armatūrą, kur tarpai užpildyti kitais angliavandeniais (pvz. pektiniais). Organizmai gamtoje celiuliozę sintetina kaip pavienes gliukozės liekanų makromolekules, tačiau gamtoje nebūna celiuliozės iš pavienių makromolekulių grandinių, o dažniausiai yra daugelio makromolekulių, susietų vandenilinėmis jungtimis, grandinių kompleksas (Lyndt ir kt., 2002).

1.2. Struktūra

Celiuliozė (iš lot. *cellula* - narvelis, kambarėlis) – linijinis polimeras polisacharidas, kurio formulė yra $(C_6H_{10}O_5)_n$. Celiuliozės polimerizacijos laipsnis n būna 500-10000, o kartais pasiekia 35000. Celiuliozės molekulė (ji dažnai vadinama makromolekule) yra grandinės, susidedančios iš daugybės grandžių - gliukozės likučių, pavidalo. Gliukozės likučiai susidaro po vandens molekulės išsiskyrimo polisacharido biosintezės procese jungiantis gliukozės ($C_6H_{12}O_6$) molekulėms. Kiekviena tarp savęs susijungusių gliukozės likučių pora sudaro vadinamąją celobiozę. Celiuliozės molekulė (kaip ir elementarioji celiuliozės grandis) nėra plokščia, grandinės atomai vienas kito atžvilgiu paprastai būna įvairiose padėtyse ir sudaro įvairias konformacijas (įvairius erdvinius pavidalus). Celiuliozės molekulės konformacijai didelės įtakos turi silpni tarpmolekuliniai vandeniliniai ryšiai, kurie atsiranda tarp hidroksilinių grupių (OH) arba tarp OH grupių ir deguonies, jungiančio elementariausias grandis (1 pav.).



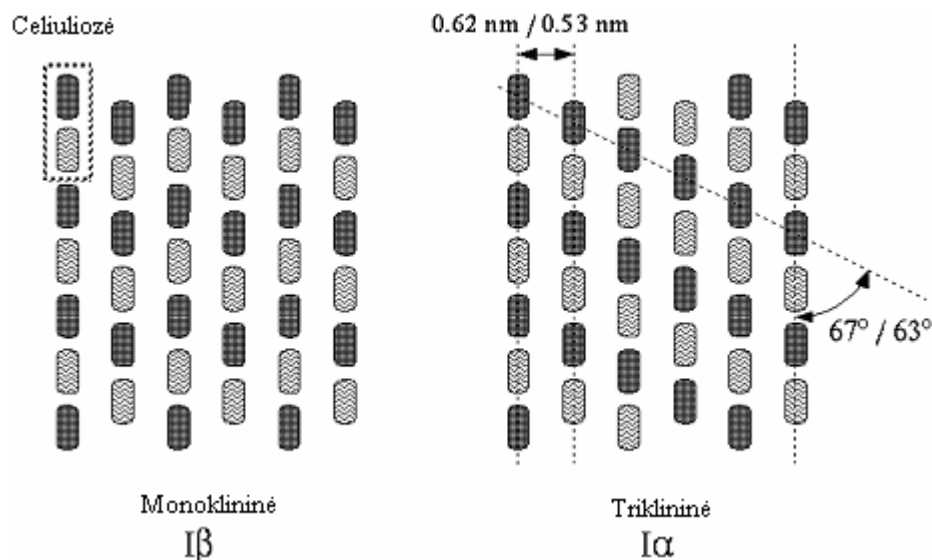
1 pav. Celiuliozės makromolekulės struktūra (pagal Lyndt ir kt., 2002).

Celiuliozė yra atspari medžiaga, netirpstanti vandenyje, spirite, eteryje, acetone ir kituose įprastiniuose organiniuose tirpikliuose. Celiuliozę veikiant šarmais, kartu su chemine reakcija vyksta ir fizikiniai-cheminiai procesai: brinkimas, mažo molekulinio svorio frakcijų tirpimas ir struktūriniai pokyčiai. Celiuliozė taip pat nėra atspari rūgščių poveikiui. Veikiama rūgščių celiuliozė hidrolizuojasi. Dėl hidrolizės sutrinkėja makromolekulės glikozidiniai ryšiai ir makromolekulė išsiskirsto į trumpesnes grandis. Hidroksilinių grupių buvimas sudaro galimybę gaminti įvairius eterius (metilceliuliozę, etilceliuliozę ir kt.) ir esterius (celiuliozės nitratus, celiuliozės acetatus ir kt.). Panašūs procesai vyksta celiuliozę veikiant ultravioletiniais spinduliais (fotocheminė destrukcija), aukšta temperatūra (terminė destrukcija), mechaniškai (mechaninė destrukcija). Visais tais atvejais celiuliozės savybės keičiasi viena kryptimi: sumažėja molekulinė masė, pablogėja mechaninės savybės, padidėja tirpumas šarmuose (Ghose, 1987).

Išskiriamos 6 celiuliozės polimorfos: I natūrali celiuliozė (2 kristalinės formos: I α ir I β); II celiuliozė, gaunama iš I celiuliozės; III 1 ir III 2 celiuliozė (gaunama iš I ir II celiuliozės) ir IV 1 ir IV 2 celiuliozė (gaunamos kaitinant III celiuliozę) (Adrio, 2003). Dauguma modifikuotų, tirpių celiuliozės derivatų yra naudojami kaip mikromicetų substratai:

karboksimetilceliulozė (KMC), hidroksimetilceliulozė (HEC) ir tirpus amorfinis β -1,4-gliukanas (Yeoh, 2004).

Gamtinė celiulozė yra kristalinės struktūros, kurią sudaro du tipai: triklininis $I\alpha$ ir monoklininis $I\beta$, besiskiriantys konformacija, hidroksilinių grupių išsidėstymu (2 pav.).



2 pav. Celiuliozės I kristalinės formos (pagal Teeri, 1997).

3.1.2. Chitinas

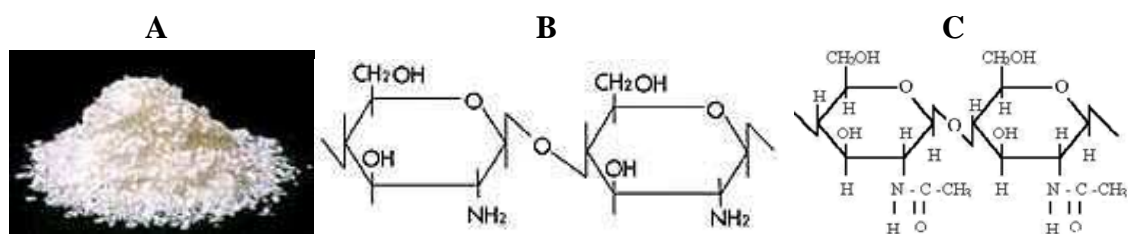
3.1.2.1. Paplitimas (telkiniai) gamtoje

Chitinas yra vienas iš trijų dažniausių polisacharidų gamtoje, kartu su celiulioze ir krakmolu. Pirmasis chitiną išskyrė Henry Braconnot (1811). Chitinas yra antras po celiuliozės pagal organinių junginių gausumą žemėje. Nuo celiuliozės skiriasi tik tuo, kad acetilamino grupės yra pakeistos hidroksilo grupėmis antroje pozicijoje. Kaip ir celiuliozė, chitinas gamtoje atlieka statybinės medžiagos funkciją. Kaip struktūrinis polisacharidas jis yra randamas vabzdžių, krabų, krevečių, kitų vėžiagyvių, koralų išoriniam skelete, bestuburiuose, protistuose bei yra universalus grybų (tame tarpe ir mielių) sienelių komponentas. Nustatyta, kad besidalijančių mielių *Schizosaccharomyces* rūšys chitino turi nedaug. Tačiau jo gausu kai kurių *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium* ir *Rhizopus* genčių grybuose, kur jo randama iki 32 % sienelės masės (Abdel-Sater, 2001; Okibo, 2005). Rentgeno spindulių difrakcijos metodu buvo nustatyta, kad chitinas gamtoje yra trijų tipų: α , β ir γ . Grybuose dažniausiai yra randamas α – chitinas, kuriame dvi N–acetilgliukozamino grandinės, išsidėsčiusios priešingomis kryptimis, kurios suformuoja vieną vieningą ląstelę. Palyginus su kitais chitino tipais, α -chitinas yra tvirčiausias (Gooday, 1995). Chitino preparatuose elektroninio mikroskopo pagalba matomos

mikro-fibrilės, kurios yra labai įvairių formų: nuo trumpų mazgelių mielių sienelėse iki ilgų persipynusių fibrilių hifų sienelėse (Gooday, 1995). Hifų chitinas dar turi išsišakojimus. Chitino sąveika su kitais komponentais, tokiais kaip peptidai ir gliukanai, yra labai svarbi sienelei susidaryti. Reikia pastebėti, kad ne visų micelinių grybų sienelėse rastas chitinas. Jį išsiskiria *Oomycetes* klasės mikromicetai, kurių sienelėje formą išlaikantis komponentas yra ne chitinas, o celiuliozė (Thomas, 1956; Szekeres ir kt., 2007). Chitosanas – deacetilinta chitino forma taip pat randamas grybų sienelėse. Tyrimai parodė, kad chitinas ir chitozanas nėra toksiniai ir nealerginiai, todėl kūnas šių medžiagų neatmeta. Chitozanas turi unikalią savybę prijungti prie savęs lipidus arba riebalus, todėl iš jo gaminami preparatai viršsvoriui gydyti. Chitozanas sudaro daugumą *Zygomycetes* sienelės komponentų. Ten jis apsuptas anijoninių polimerų, turtingų gliukuronine rūgštimi ir polifosfatais (Gooday, 1995). Chitozanas randamas kaip atskiras sluoksnis *Saccharomyces cerevisiae* askosporų sienelėje. Chitino ir chitozano rasta *Aspergillus niger*, *Cunninghamella elegans*, *Mucor racemosus*, *M. rouxii* ir *Rhizopus oryzae* micelyje (Pochanavanich, Sunttornsuk, 2002; Wu ir kt., 2005). Chitino randama *Ascomycota*, *Basidiomycota* ir kitų klasių grybuose (1 lentelė, priedas), kuriems priskiriami augalams patogeniški mikromicetai.

3.1.2.2. Struktūra

Chitinas – linijinis polisacharidas, tik sudarytas iš N-acetil-D-gliukozamino grandžių, sujungtų β -(1→4) glikozidiniu ryšiu. Chitino makromolekulė nešakota, erdviu išsidėstymu panaši į celiuliozę (3 pav.). Yra trys polimorfinės chitino formos: α , β ir γ . Dažniausia yra α forma, kurioje polimerinės jungtys yra labai stipriai surištos, susidaro kristalinė struktūra. Chitinas silpnai tirpsta ir yra inertiškas įvairiose reakcijose. Jis tirpus koncentruotoje druskos rūgštyje, sulfanilamidinėje rūgštyje, ledinėje acto rūgštyje, netirpus vandenyje, šarme ir



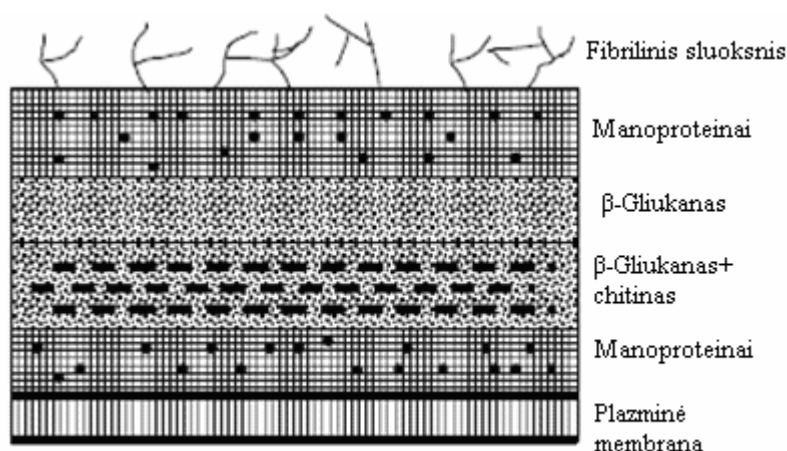
3 pav. Chitinas (A – pagal Звягинцев, 1991) ir chitino (B) bei chitozano (C) makromolekulių struktūra organiniuose tirpikliuose. Hifų chitinas dar turi išsišakojusias septas. Chitozanas – antrinis chitino produktas (3 pav., C).

Deacetilavimo proceso metu išlaisvinamos amino grupės (NH), taip chitozanas įgyja katijoninę charakteristiką. Chitozanas turi daug acetilo grupių (CH₃-CO), todėl molekulė yra tirpi daugelyje atskiestų rūgščių.

3.2. Mikroorganizmai polisacharidų (celiuliozės ir chitino) apykaitos ir destruktijos procesuose

3.2.1. Polisacharidų (celiuliozės ir chitino) sintezė

Dažniausiai grybų citoplazmą supa sienelė, per kurią ląstelė sąveikauja su aplinka. Ląstelės sienelė atlieka daugybę funkcijų, tokių kaip formos ir tvirtumo suteikimas ląstelei, apsauga nuo osmosinių pokyčių, jonų ir tirpinių koncentracijos palaikymas ląstelėje, didelių molekulių sekrecija iš ląstelės. Ląstelės sienelė gali kaupti anglies atsargas. Pagaliau, kai kurių parazitinių ir simbiotinių grybų ląstelės sienelė atlieka svarbų vaidmenį prasiskverbiant į augalą arba parazituojančią kito grybo ląsteles. Ne visi grybai turi ląstelių sienelės, bet tu, kurie turi, sienelės sudaro celiuliozė, gliukozaminas ir chitinas, tas pat angliavandenis, kuris suteikia stiprumo vabzdžių egzoskeletui (4 pav.). Apie 80 % sienelės sudaro įvairūs polisacharidai. Funkcionalūs sienelės komponentai svarbūs maisto medžiagų transportui, netirpių medžiagų metabolizmui, sienelės įvairioms modifikacijoms (Gooday, 1995).



4 pav. Ląstelės sienelės komponentų išsidėstymas (pagal Manisha, 2001).

Sienelė riboja toksinių grybui molekulių (sintetinamų augalų toksinų ar sintetinių fungicidų) patekimą. Sienelės sudėtis, savybės ir forma kinta priklausomai nuo ląstelės ciklo ar augimo fazių (Raven, 1983). Dauguma grybų turi fibrilių struktūrą, sudarytą iš chitino, chitozано (tik *Zygomycota*), β – gliukano ir įvairių heteropolisacharidų. Fibrilės sudaro gelio pavidalo matriksą. Proteinai sudaro 20 % ir dažniausiai būna glikoproteinai. Ne visi baltymai atlieka struktūrinį vaidmenį. Poravimosi, atpažinimo, sienelės modifikacijos ir maitinimosi funkcijas valdo su sienele susijungę baltymai. Hidrofobiniai pasireiškia konstitutiškai ir susiriša su sienele

kada hifai išsikiša į orą. Lipidų taip pat randama sienelėje, bet labai mažomis koncentracijomis. Hidrofobiniai, lipidai ir vašakai tampa funkcionalūs esant vandens kontrolei, ypač kai gresia išdžiūvimas. Sienelėje taip pat randama pigmentų ir druskų. Skirtingų genčių mikromicetų sienelės komponentai skiriasi (1 lentelė, priedas) (Thomas, 1956; Lahdenpera, 2000).

Pasak Gooday (1995) ląstelės sienelės biosintezė vyksta trijose vietose: citoplazmoje, plazminėje membranoje ir pačioje sienelėje. Struktūriniai polimerai, chitinas, $\beta(1-3)$ - ir $\beta(1-4)$ -gliukanas yra sintetinami plazminėje membranoje. Tai atlieka tam tikros sintetazės, paimdamos nukleotido cukrų pirmtaką iš citozolio ir polimerizuodamos grandinę į sienelę. Polimerai, tokie kaip manoproteinai yra sintetinami citoplazminės sekrecijos būdu. Sintezę vykdo endoplazminis tinklas per Goldžio pūsleles. Sienelėje vyksta polimerų kovalentinis jungimasis, chitino deacetilinimas bei kiti procesai. Ląstelės sienelės sintezę ir degradaciją vykdo keletas fermentų. Chitino metabolizmas yra labai svarbus procesas, įtakojantis sienelės augimą. Bartnicki-Garcia ir kiti, (1995) sukūrė sienelės augimo modelį, kuriame didelį vaidmenį atlieka chitinas ir chitinazė. Ląstelės vieno svarbiausių sudedamųjų dalių komponento chitino sintezę katalizuoja fermentas chitino sintetazė, kuris katalizuoja glikozidinių jungčių susidarymą iš nukleotido cukraus substrate, uridindifosfo-N-acetilgliukozamino. Pagrindinis šio metabolinio kelio fermentas yra gliukozamino-6-fosfato sintetazė. Šis fermentas sujungia anglies ir azoto metabolinius kelius grybo ląstelėje. Chitino sintetazė yra su membrana surištas fermentas, kurio taip pat randama ir mikropūslelėse – chitozomose. Fermentas yra alosterinis. Substratas uridino difosfatas N-acetilgliukozaminas (UDP-GlcNAc), laisvasis GlcNAc ir eilė kitų efektorių aktyvina chitino sintetazę. Augančiuose hifuose chitino sintezė yra labai poliarizuota. Visa tai atsiranda hifų viršūnėse, šonuose ir besidalijančiose pertvarėse. Bakterijos *Acetobacter xylinum* gebėjimas gaminti celiuliozę pritaikomas aktyvesnei celiuliozės sintezei augaluose. *Acetobacter xylinum* sintetina celiuliozę kaip ekstraląstelinį produktą augdama terpėje su gliukoze (Brown, Willison, 1976). Chitiną sintetina ir mielės *Saccharomyces cerevisiae*, kur šio polisacharido sintezė yra priklausoma nuo Chs3p (Bulik, 2003).

3.2.2. Celiuliozės destrukcija (transformacija, utilizavimas, hidrolizė).

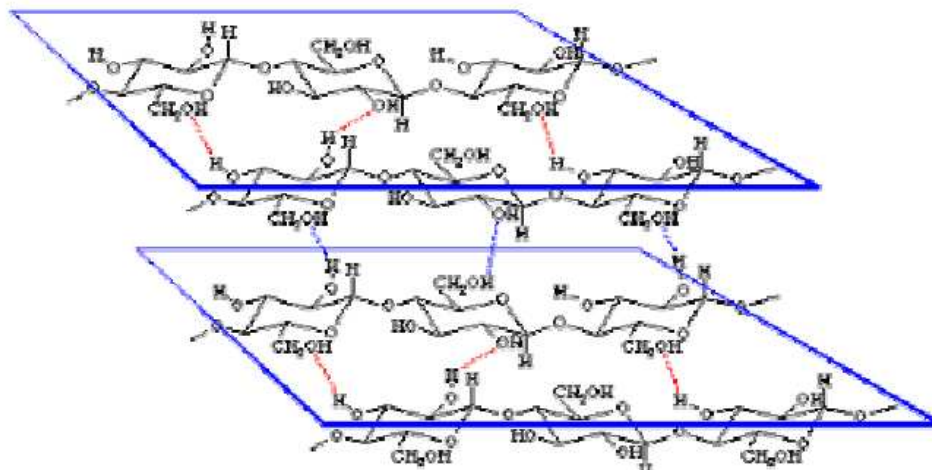
Celiuliozė - gausus energijos ir mitybos šaltinis (Coral ir kt., 2002), kurį intensyviai transformuoja mikroorganizmai panaudodami kaip gerą energijos ir anglies šaltinį. Pagrindinė celiuliozę transformuojančių mikroorganizmų buveinė yra dirvožemis, kuriame jie celiuliozę drauge su kitomis anglies turinčiomis natūraliomis medžiagomis ir taršalais utilizuoja išskirdami į aplinką įvairių fermentų kompleksus (Nishise ir kt., 1985; Poulsen, Petersen, 1988; Rajoka, Malik, 1997).

Gebėjimas sintetinti celiuliazės dažnas fiziologinis mikroorganizmų, ypač mikromicetų fiziologinis veiksmas, patraukęs daugelio tyrėjų dėmesį. Didžiausio dėmesio susilaukė dirvožemio miceliniai grybai, ardantys celiuliozės substratus (Carlile, Watkinson, 1997; Montegut ir kt., 1991), kurie yra pagrindiniai organizmai, dažnai charakterizuojami kaip turintys visų pagrindinių celiuliozei transformuoti reikalingų (endo-, egzogliukanazės ir celobiazės) fermentų rinkinį (Klyosov, 1990; Schwarz, 2001). Šie fermentai yra egzoląsteliniai ir indukuojami gamtinių substratų natūraliomis sąlygomis (Enari, 1983). Dauguma celiuliozės mikroorganizmų išskiria įvairius ląstelės sienelės ardančius fermentus: ligninazes, ksilanazes, pektinazes ir tik keletas mikroorganizmų geba sintetinti fermentus, ardančius natūralią celiuliozę (Bayer ir kt., 2004).

Celiuliaziniu aktyvumu pasižyminčių rūšių gausu *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* ir *Deuteromycetes* poskyriuose (kiekvienam iš kurių apytiksliai priskaičiuojama iki 15.000 rūšių), tačiau, tarp 700 aprašomų *Zygomycetes* poskyrio narių, tik *Mucor* genties kamienams būdingas ryškesnis celiuliazinis aktyvumas (Lyndt ir kt., 2002). Geriausiai ištirti ir žinomi celiuliaziniai kamieniai, gebantys ardyti medieną yra *Bulgaria* Fr., *Chaetomium* Kunze ir *Helotium* Tode (*Ascomycetes*); *Coriolus* QuéL., *Phanerochaete* P. Karst., *Poria* Pers., *Schizophyllum* Fr. ir *Serpula* (Pers.) Gray (*Basidiomycetes*); bei *Aspergillus* P. Micheli ex Link, *Cladosporium* Link, *Fusarium* Link, *Geotrichum* Link, *Myrothecium* Tode, *Paecilomyces* Bainier, *Penicillium* Link ir *Trichoderma* Pers. (*Deuteromycetes*) gentys (Carlile, Watkinson, 1997). Tačiau vėlesnių tyrimų rezultatai dar pailgino genčių, kurioms priskiriami celiuliaziniu aktyvumu pasižymintys kamieniai, sąrašą, kuriame yra ne tik saprofitų (*Absidia*, *Cunninghamella*, *Rhizomucor*) bet ir patogenų (*Botrytis*, *Myrothecium*, *Sporotrichum* ir kt.) gentys.

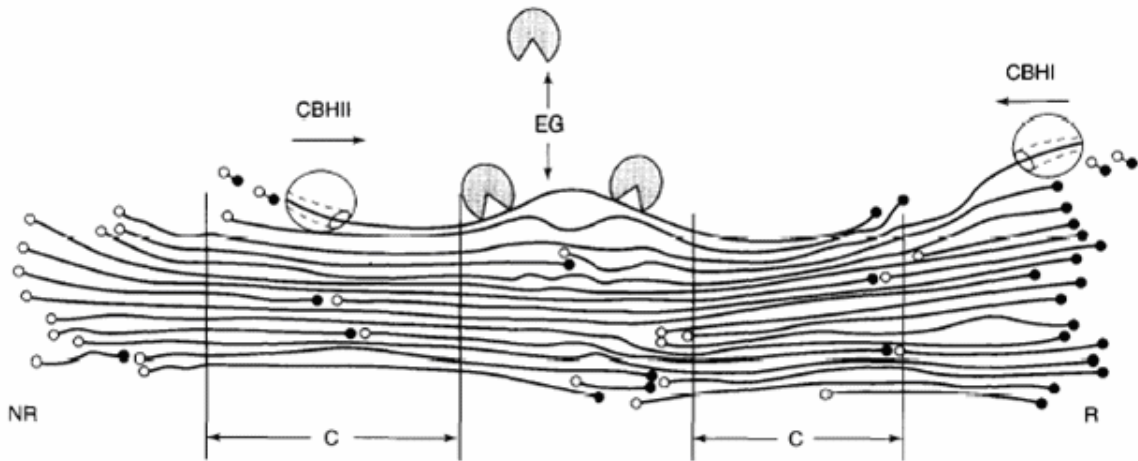
Celiuliozės transformacija, jos skaldymas iki monosacharidų nėra paprastas procesas, nes, kaip jau buvo minėta, priklausomai nuo substrato, jis reikalauja atitinkamos celiuliazės arba celiuliazinių kompleksų. Pagrindiniame celiuliozės šaltinyje – augalų ląstelėje, celiuliozės mikrofibrilės, sujungtos tarpusavyje hemiceliuliozės molekulėmis, sudaro atsparų sienelės karkasą. Celiuliozinis karkasas paniręs drebutinėje medžiagoje. Drebučius sudaro irgi tinkliškai susijungę pektinai. Sienelėje celiuliozės, hemiceliuliozių ir pektinų būna maždaug po lygiai. Nors ir pavienės celiuliozės makromolekulės struktūra nesudėtinga, tačiau gamtoje randama ir kristalinė celiuliozė, kuriai suskaldyti iki cukraus reikia kelių skirtingų fermentų. Kaip jau buvo minėta, celiuliozė yra mechaniškai atsparus, chemiškai inertiškas polimeras dėl daugybės vandenilinių jungčių tarp makromolekulių. Supinti celiuliozės plaušeliai sudaro popieriaus pagrindą (filtravimo popierius – praktiškai gryna celiuliozė). Kai kuriuose augaluose (linuose, kanapėse, medvilnėje ir t.t.) celiuliozės molekulės išsidėsčiusios lygiagrečiai ir sudaro pluoštą.

Skersinėmis vandenilinėmis jungtimis sutvirtintos celiuliozės siūliškos molekulės sudaro 10-25 nm storio labai stiprias mikrofibriles (5 pav.).



5 pav. Celiuliozės mikro-fibrilės sluoksniuose. Raudonomis punktyrinėmis linijomis pažymėtos to paties sluoksnio vandenilinės jungtys, mėlynomis linijomis pažymėtos vandenilinės jungtys tarp skirtingų sluoksnių (pagal Newton, 2001) [123].

Kristalinės celiuliozės transformavimasis yra kompleksiškas procesas, kuriame dalyvauja keli fermentai, dažnai veikiantys nepriklausomai vienas nuo kito, valdomi tik substrato (Schwarz, 2001; Onori ir kt., 2005). Celiuliazės atsakingos už β -1,4-glikozidinių jungčių skaldymą. Tai hidrolazių klasės fermentai, kurie skirstomi į tris pagrindines grupes: endogliukanazes (EC 3.2.1.4), celobiohidrolazes arba egzogliukanazes (EC 3.2.1.91) ir β -gliukozidazes (EC 3.2.1.21). Šie fermentai yra laisvi (aerobų celiuliazės) arba daugiakomponenčiuose kompleksuose (anaerobinių bakterijų celiuliazės) (Bayer ir kt., 2004). Kiekvienas fermentas atlieka specifinę funkciją (6 pav.). Endogliukanazės paveikia visą celiuliozės makromolekulės grandinę, todėl stipriausiai paveikia cheminę struktūrą (Cao, Huimin, 2002). Jos skaldo β -1,4-gliukozidines jungtis celiuliozės grandinės anamorfinėse zonose (5 pav.), o šios hidrolizės produktas – oligosacharidai ir skirtingo ilgio grandinės segmentai su naujais redukuojančiais galais (Lyndt ir kt., 2002). Taip endogliukanazės paruošia substratą egzogliukanazėms, nes padidina grandinės galinių segmentų prieinamumą ir jų skaičių. Egzogliukanazės efektyviausiai degraduoja kristalinę celiuliozę veikdamos redukuotus ir neredukuotus grandinės segmentų galus, susidarant produktams gliukozei (gliukohidrolazės veikimo rezultatas) arba celbiozei (celbiohidrolazės veikimo rezultatas) (Bhat, Bhat, 1997; Lynd, 2002). β -gliukozidazės hidrolizuoja celbiozę, kuri yra stiprų egzogliukanazių inhibitorius, užbaigdamas celiuliozės grandinės skaldymą iki monosacharidų. Šių fermentų aktyvumas proporcingas substrato polimerizacijos laipsniui.



6 pav. Kristalinės celiuliozės morfologija. Amorfiniai centrai randami netoli kristalo paviršiaus arba gali būti glaudžiai susieti su kristaline celiulioze visame mikrofibrilės ilgyje. Skirtingos egzogliukanazės arba celobiohidrolazės (CBHI, CBHII) atakuoja kristalinės celiuliozės makromolekulių galus, o endogliukanazės (EG) atakuoja vidurines celiuliozės dalis, dažniausiai kur yra amorfiški centrai. ● – redukuoti galai (R), ○ – neredukuoti galai (NR); C – pažymi stipriai stipriai kristalizuotus segmentus (pagal Teeri, 1997).

Įvairių mikroskopinių grybų rūšių ekstraląstelinės celiuliazės veikia plataus masto pH (5-8). Celiuliolitinius fermentus išskiria ne tik mikromicetai, bet ir kai kurios bakterijos: *Clostridium thermocellum*, *Caldocellum saccharolyticum*, *Acidothermus cellulyticus*, bet bakterijos celiuliazės išskiria nuolat, o mikroskopiniai grybai tik tada, kai aplinkoje yra celiuliozės (Schwarz, 2001).

Daugelio gyvūnų (ir žmogaus) organizmuose nėra fermento, gebančio hidrolizuoti gliukozidines jungtis, todėl celiuliozė netinka maistui. Tokį fermentą gamina kai kurie mikroorganizmai, gyvenantys atrajojančių gyvulių, termitų, skruzdėlių-medgraužių skrandžiuose bei dirvožemyje. Todėl minėti gyvūnai gali maitintis celiulioze. Celiuliozė sudaro nuo 15% iki 60% organinės augalų masės ir yra lengvai įsisavinamas energijos ir anglies šaltinis dirvožemyje tarpstantiems mikroorganizmams. Fermentų koncentracija ir aktyvumas priklauso nuo grybo (ar kito mikroorganizmo) rūšies ir aplinkos, kurioje jis vystosi. Šių fermentų kompleksas ypatingai svarbus patogenams, atakuojantiems augalus, kad galėtų nugalėti ląstelių sienelės barjerą ir prasiskverbti į šeimininko biomasę. Celiuliozė turi daug -OH grupių, todėl ji labai hidrofiliinė, tačiau dėl didelės molekulinės masės ir tarpusavio jungčių netirpsta, o tik brinksta. Celiuliozės skaidymo produktai dirvoje virsta pagrindinėmis humuso sudėtinėmis medžiagomis, kurios išlaiko savo hidrofiliškumą. Dėl hidrofiliinių savybių daug humuso turintys gruntai gerai sulaiko vandenį ir vandenyje ištirpusių druskų jonus, todėl humusingi dirvožemiai būna derlingi ne tik augalams, bet ir dirvožemio mikroorganizmams. Celiuliozingi augalų likučiai (nukritę lapai, šiaudai, smulkios durpės, žolėdžių mėšlas) yra organika pagerinanti dirvožemio struktūrą. Dirvožemio mikroorganizmai pagreitina celiuliozės, esančios nukritusiuose lapuose, medžių

kamienuose ir t.t. irimą. Mikroorganizmų gebėjimas panaudoti celiuliozę kaip anglies ir energijos šaltinį yra vienas iš svarbiausių medžiagų srauto biosferoje procesų (Coral ir kt., 2002). Augalinių medžiagų utilizacija ir jų transformacija į humusą priklauso nuo dirvožemio mikrofloros. Tai yra viena iš priežasčių kodėl tiriami mikromicetai molekulinio lygiu (Penttilä ir kt., 2004), siekiant išaiškinti kuo daugiau celiuliazinių kamienų, kuriami nauji metodai celiuliazinių efektyvumui tirti bei indukuojami mutantiniai kamienai, kurių celiuliazinių kompleksų veikla pagerinama.

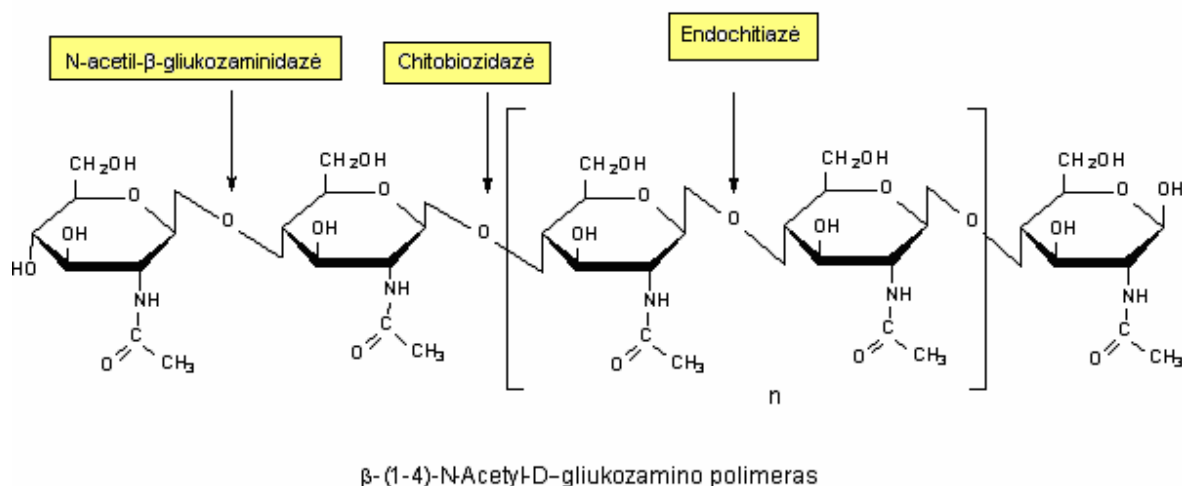
Labiausiai ištirti *Trichoderma* Pers. genties grybai siekiant panaudoti jų egzolastelines celiuliazes įvairiose srityse. Dažniausiai tiriami *T. aureoviride* Rifai, *T. viride* Pers., *T. reesei* E.G. Simmons ir *T. harzianum* Rifai rūšių kamienai bei jų mutantai, ypač tie kurių celiuliazinių sistema celiuliozę konvertuoja į gliukozę (Oksanan ir kt., 2000; Mach, Zeilinger, 2003; Cavaco-Paulo, Gübitz, 2003, Nierstrasz, Warmoeskerken, 2003; Van Wyk, Mohulatsi, 2003; Penttilä ir kt., 2004). *Trichoderma* kamienų celiuliazinių kompleksas ne visada pasiteisina, nes dažnai nebūna celobiazės ir susukaupusi celobiozė slopina celiuliozės skaldymo procesą (Gruno ir kiti, 2004). Ieškoma naujų rūgštims, šarmams atsparių ir tero- atsparių celiuliozių ir kitų genčių mikromicetų kamienuose (Updegraff, 2004; Hanif ir kt., 2004; Kamal, Mathur S.N., 2005; Gopinath ir kt., 2005; Kluczek-Turpeinen ir kt., 2005; Onori ir kt., 2005; Ikram-ul-Haq, Khan, 2006), ir pagrindinis dėmesys tebeskiriamas dirvožemio mikromicetams (Lee ir kt., 2002).

3.2.3. Chitino destrukcija

Chitinas gamtoje randamas kompleksuose su kitomis molekulėmis. Jis, kaip ir celiuliozė augalų ląstelių sienelėse, gali būti matricoje su gliukano fibrilėmis ir komplekse su baltymais ir kitais karbohidratais, todėl jo destrukcija reikalauja ne mažiau svarbių fermentų, kaip ir celiuliozės ardyme. Chitinazės hidrolizuoja chitiną (β -1,4-jungtimis sujungtų N-acetil-D-gliukozamino grupių polimerą) ir gali būti aktyvios tiek natūraliomis, tiek ir modelinių tyrimų sąlygomis. Yra tyrimų rezultatais paremta nuomonė, kad pavienė chitinazė nėra aktyvi prieš patogenų sienelėse esantį chitiną (Sela-Buurlage ir kt., 1999) ir patogenas nėra jautrus tokiam veikimui. Būtinai bent jau dviejų fermentų (chitinazės ir β -1,3-endogliukanazės) veikimas. Pagrindinės chitinazės yra endochitinazė ir egzochitinazė, viena skaldanti polimero grandinę gabalais, kita atskeldama galinius segmentus. Mikroorganizmai chitiną naudoja ne tik kaip energijos šaltinį, bet (pvz. kai kurios bakterijos) ir kaip azoto šaltinį (Gupta ir kt., 2006). Aktyviems antagonistams konkurencijai už substratą arba parazituojuojant kitą organizmą jis tampa atakos taikiniu.

Labiausiai ištirta ir labai svarbi chitino santykio su mikroorganizmais sritis yra augalo išvystytas atsparumas prieš patogeno invaziją arba biologinė kova su augalų ligas sukeliančiais

organizmais. Abu procesai tarpusavyje susieti ir neatsitiktinai ieškoma aktyvių chitinazių producentų, tiriami jų genai ir perkėlus juos į augalus, pagerinamas augalų atsparumas patogenams (Steyaert ir kt., 2003).

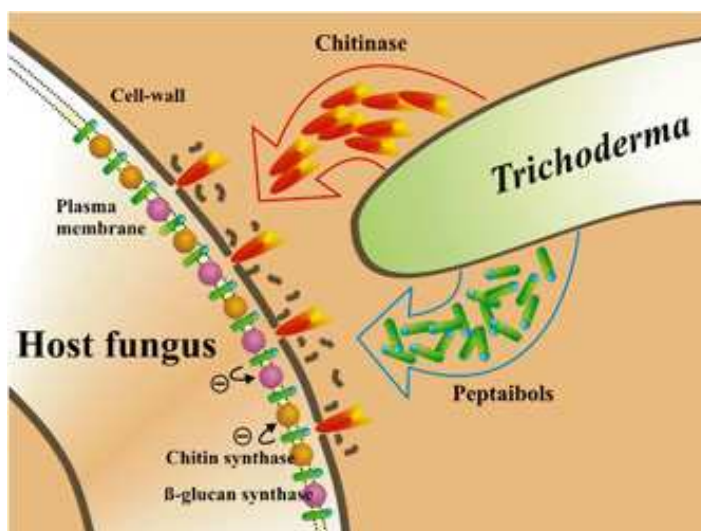


7 pav. Chitino skaidymo schema (pagal Gomes ir kt., 2004).

Pagrindiniai chitino skaldyme dalyvaujantys fermentai yra: endochitinazės, egzochitinazės ir 1,4-β-N-acetilgliukozaminidazės (7 pav.) (Gomes ir kt., 2004.). Chitinazės kerpa 2 chitino N-acetilgliukozaminus tarp C₁ ir C₄ anglies atomų. Šie fermentai kartu leidžia recirkuliuoti chitinui arba padeda organizmui suvirškinti ir panaudoti išorės chitiną. Po sintezės chitinas augančiose hifų ląstelėse pasikeičia: kovalentiškai susijungia su gliukanais ir modifikuojasi iki chitozano.

Augalų ligos - didelė pasaulinė žemės ūkio ir miškininkystės problema. Nustatyta, kad 25% derliaus prarandama vakarietiškoje ir 50% gerai išvystytose šalyse būtent dėl mikroorganizmų sukeltų augalų ligų (Gohel ir kt., 2006). Iš jų vienas trečdalis nuostolių priklauso mikromicetų sukeltoms augalų ligoms. Fitopatogeniški *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* ir *Fusarium* vis intensyviau plinta. Apie 70 % dažniausių augalinių ligų sukelia *Oomycota* grybai (Xia ir kt., 2001). To priežastimi laikoma spartūs ūkininkavimo pokyčiai siekiant didesnių ekonominių efektų, kurie dažnai sukelia pašalinius nelaukiamus ir visai netikėtus pašalinius efektus. Keičiama strategija kovojant su augalų ligomis cheminius preparatus pakeičiant biologinei kovai skirtais preparatais (Harman, 2000; Harman ir kt., 2004; Elad, Stewart, 2004; Elmer ir kt., 2002, 2003, 2005). Tokį pasirinkimą nulemia keletas priežasčių: fungicidų neigiamas poveikis žmogaus sveikatai, dideli jų apskaitos reikalavimai, nemažos leistinių likučių koncentracijos ir koncentracija eksportuojamame derliuje, žaliavose ir produktuose, patogenų atsparumas naudojamiems cheminiams preparatams ir kt. (White, 1998; Rosslenbroich, Stuebler, 2000; Chamberlain, 2001; McManus ir kt., 2002; Janisiewicz, Korsten,

2002). Todėl mikoparazitai intensyviai tiriama ir jais bei jų preparatais bandoma pakeisti cheminius preparatus (Lorito ir kt., 1998). Be to, yra tyrimais patvirtintas kombinuoto bioagentų ir sumažintos koncentracijos cheminių preparatų efektyvumas slopinant patogenų vystymąsi (Monte, 2001). Didesnė dalis – 90% praktinio bioagentų panaudojimo siejama su *Trichoderma* genties grybais (Witkowska, 2002; Benítez ir kt., 2004).



8 pav. *Trichoderma* genties grybų poveikio patogenų ląstelių sienelei klasikinė schema (pagal Kubicek, 2007) [122].

Nors bioagentams būdinga stiprus konkurentiškumas dėl substrato išskiriant antibiotikus į aplinką, patogeno ląstelių sienelių ardymas hidrolizuojančiais polisacharidus egzofermentais, tokiais kaip chitinazės, proteazės ir gliukanazės laikomas beveik esminiu bioagentų atakos mechanizmu (Papavizas, 1985; Lorito ir kt., 1994; Lima ir kt., 1997, 1999; De Marco ir kt., 2000; Inglis, Kawchuk, 2002; Howell, 2003; Shternshis ir kt., 2006; Martin ir kt., 2006) (8 pav.).

Klasikinis *Trichoderma* genties kamienų, kaip bioagentų, modelis buvo naudojamas įvairių patogenų vystymuisi slopinti: *B. cinerea* (Witkowska, 2002; Elad, Stewart, 2004, Elmer, Reglinski, 2006), *Fusarium* spp., (Sivan, Chet, 1989; Громовых ir kt., 2002; Witkowska, 2002; Beever ir kt., 2005) *Rhizoctonia solani*, (Lima ir kt., 1999), *R. cerealis* (Innocenti ir kt., 2003), *Sclerotium rolfsii* (Lima ir kt., 1999), *Pythium ultimum* (Wolffhechel, Jensen, 1992; Howell, 2002), *Venturia inaequalis* (Bolar, 2001), ir *Crinipellis perniciososa* (De Marco ir kt., 2000). Chitinazės svarbios dėl pagrindinio daugelio grybų ląstelių komponento chitino (Szekeres ir kt., 2007) išlieka tiek grynos, tiek ir veikdamos sinergistiškai su proteazėmis ir panaudodamos chitiną kaip anglies ir azoto šaltinį. Panašiomis savybėmis pasižymi ir kitų grupių mikroorganizmai: bakterijos (Gupta ir kt., 2006), aktinomicetai, mielės bei kitų nei *Trichoderma*

genčių grybai (Lahdenpera, 2000). Chitinazės aktyvios ne tik antagonizmo ir parazitavimo procese, bet yra žinomos ir autolizės procese (Perez-Leblec ir kt., 1982).

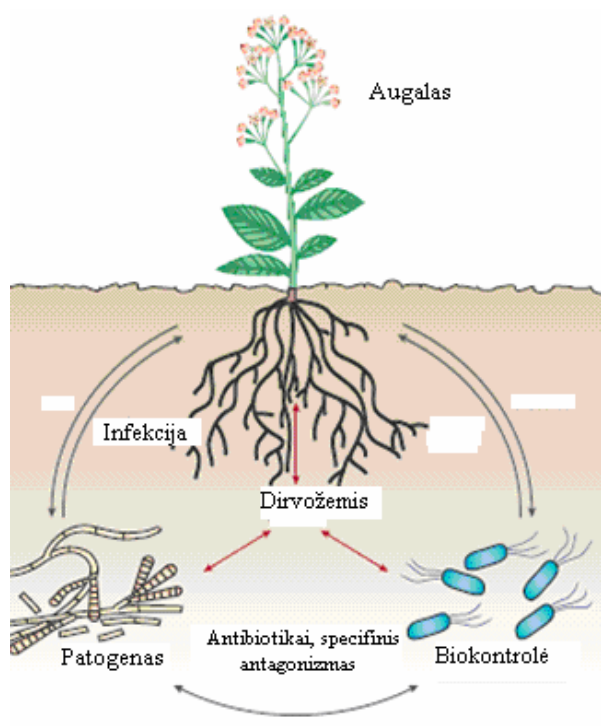
3.3. Mikroorganizmų tarpusavio santykis celiuliozės ir chitino aplinkoje

3.3.1. Kompleksinis aktyvumas ardant celiuliozę arba chitiną

Dauguma mikromicetų vystosi aplinkoje, kur gausu celiuliozės: augalų biomasėje dirvožemyje ir kompostuose, augalų lapų paviršiuje, parazitodami nematodus ir vabzdžius arba utilizuodami atliekas (makulatūra, kartonas, pakuotės, maisto pramonės, ypač sulčių gamybos atliekos). Jų veiklos rezultatas – substratų transformacija iki humuso dirvožemyje, disacharidų arba monosacharidų (mitybinių medžiagų kitiems mikrobams), o biotechnologijos baruose, kryptingai valdant jų veiklą, – iki įvairaus sudėtingumo cheminių junginių (Cavaco-Paulo, Gübitz, 2003; Nierstrasz, Warmoeskesken, 2003; Van Wyk, Mohulatsi, 2003; Miettinen-Oinonen ir kt., 2004; Penttilä ir kt., 2004). Polisacharidai arba medžiagos, kurių sudėtyje yra didesnė šių polimerų koncentracija, gali būti transformuojami vieno, kelių arba ir daugelio mikroorganizmų. Procesas priklauso nuo to, kokios medžiagos ir kokių grupių mikroorganizmai yra konkrečioje nišoje. Kadangi šių dviejų polisacharidų destrukcijoje dalyvauja keli fermentai, o visą rinkinį šių fermentų turi ne visi mikromicetai, todėl natūralu, kad gamtinėmis sąlygomis celiuliozės ir chitino transformacija gali vykti veikiant skirtingų organizmų celiuliazėms (arba chitinazėms). Toks vienalaikis visos mikromicetų (ir kitų mikroorganizmų grupių) bendrijos vystymasis spartina destrukcijos procesą, o geriausiu tokio proceso pavyzdžiu gali būti augalų masės (lapų, šaknų, stiebų ir kt.) destrukcija dirvožemyje. Panaši situacija pažeistose augalo dalyse, kur dažniausiai randamas skirtingų mikroorganizmų kompleksas, ir ne visada yra išaiškinama tikrasis pažeidėjas. Įdomi situacija taip pat formuojasi bioagento ir antagonisto sąveikos metu, kai jie abu vystosi augalo paviršiuje, šaknų rizosferoje arba irstančios dalies masėje. Todėl natūralu, kad reikia atlikti tyrimus, kurie leistų išsiaiškinti skirtingų mikromicetų, ypatingai mikoparazito/patogeno sąveiką konkretaus substrato, tokio kaip celiuliozė arba chitinas, aplinkoje. Dažniausiai mikromicetų tarpusavio sąveika analizuojama modelinėmis sąlygomis standartinėse mitybinėse terpėse ir tik nustačius tarpusavio sąveiką ir palankų kompleksinį veikimą procesas perkeliamas į natūralias sąlygas (atliekų utilizavimas, kompostavimas ir kt.). Galima pagerinti sąlygas natūralios mikofloros vystymuisi arba valdyti jos veiklą - įvedant papildomus, pasižyminčius reikiamomis savybėmis mikromicetus (arba kitus mikroorganizmus).

3.3.2. Konkurencija, antagonizmas, agresyvumas, parazitavimas

Mikromicetų tarpusavio santykis, kaip ir jų ryšys su augančiais augalais yra esminiai dirvožemio procesuose (9 pav.). Labai svarbus yra neutralaus arba vienalaikio mikromicetų (kaip ir kitų mikroorganizmų) aktyvumo konkrečiomis sąlygomis santykio pastovumas, kuris išlieka stabiliomis gamtinėmis sąlygomis. Ekstremalūs pokyčiai skatina konkurentingumą, vienu mikromicetų rūšių dominavimą prieš kitas, o tai atsiliepia ir augalo vystymuisi. Atsiradusi konkurencija dėl anglies šaltinio arba specifinių junginių (kai kurių metalų jonų, vitaminų ar kt.) vyksta tarp daugelio mikromicetų rūšių kamienų, tačiau ypatingai svarbus yra saprotrofų ir patogenų santykio pasikeitimas. Ieškant biotechnologijai svarbių kamienų, tokios ekstremalios situacijos gamtoje tampa geru paieškos šaltiniu.



9 pav. Biokontrolės schema (pagal Cavaglieri ir kt., 2005).

Nemažai atliekama tyrimų, kurių metu sekamas mikroorganizmų vystymasis ant augalų stiebo, lapų paviršiaus arba šaknų rizosferoje. Atliekami ir dirvožemio bendrojo celiuliazinio aktyvumo tyrimai. Tačiau ne visada lyginama dirvožemio mikromicetų (arba kitų mikroorganizmų) bendrijos struktūra ir ją sudarančių komponentų indėlis į šio fermentinio aktyvumo intensyvumą. Tiek teorine, tiek ir praktine prasme visada būtų įdomu žinoti, kurie mikroorganizmai ir kaip susigyvena konkrečiomis sąlygomis vieno arba kito substrato aplinkoje. Svarbūs slopinimo ir stimuliavimo efektai, antagonizmas ir konkurencija dėl substrato

Aktyviausia konkurencija tarp mikroorganizmų vyksta dėl geležies. Nors geležis yra dažnas mūsų planetos cheminis elementas, bet jis pagrindė yra netirpioje formoje ir organizmams jį pasisavinti gana sudėtinga. Geriausiai geležį pasisavina mikroorganizmai, kurių koncentracija

apie 10^{-18} dirvožemio tirpale ir neutralus pH. Geriausią geležies pasisavinimo sistemą turi bakterijos (Shoda, 2000). Nematodus infekuojantys grybai *Verticillium chlamydosporium* ir *V. suchlasporium* chitinazių pagalba prasiskverbia pro jų kiaušinių apvalkalėlį (Tikhonov, 2001). Idėja, kad biologiniai agentai gali indukuoti augalo atsparumą kokiam tai patogenui kilo atlikus bandymą su pomidorais. Praturtinti tam tikromis bakterijomis jie tapo atsparūs *P. Solanacearum* infekcijai (Hendawy ir kt., 2005). Pirmieji biokontrolės agentai paminėti šių autorių darbuose: Chet, 1997; Weller, 1988; Whipps ir Lumsden, 1991; O'Sullivan ir O'Gara, 1992; Cook, 1993; Goldman et al., 1994; Lumsden et al., 1995 (Brian ir kt., 2002). Biokontrolės agentai, tokie kaip *Trichoderma atroviride*, gali būti naudojami kaip vektoriai. Juos įterpus į augalą, sustiprinamas augalų atsparumas ligoms (Brunner ir kt., 2005). Grybų gentis – *Hypomyces* yra artima *Trichoderma* genčiai ir kovoja prieš tokius augalinius patogenus kaip *Verticillium* sp. ir *Pythium* sp., sukeliančius augalų vytulius ir kitas ligas. Išskirtos rūšys *H. viridigriseus*, *H. favoli* ir *H. Puertoricensis* (Handelsman, Eric, 1996).

Nors tokiems klausimams išaiškinti reikia nemažai laiko ir kruopštumo, atlikti tyrimai atskleidžia konkurencijos už substratą mechanizmą, dažnai kompleksišką, priklausantį ir nuo substrato sudėtingumo, ir nuo fizinių-cheminių veiksnių (Papavizas, 1985; Lorito ir kt., 1994; Howell, 2003; Benítez ir kt., 2004). Modelinėmis sąlygomis daugiau tiriama porinių kultūrų sąveikos mechanizmai, tačiau ir tokia informacija naudinga aiškinantis kai kurių mikromicetų dominavimą natūraliomis sąlygomis, arba slopinant vienų ir stimuliuojant kitų vystymąsi valdomuose procesuose. Įdomi *Trichoderma* kamienų ir kai kurių patogenų – *B. cinerea* (Witkowska, 2002; Elad, Stewart, 2004), *Fusarium* spp., (Sivan, Chet, 1989; Witkowska, 2002; Beever ir kt., 2005) *Rhizoctonia solani*, (Lima ir kt., 1997, 1999), *R. cerealis* (Innocenti ir kt., 2003), *Sclerotium rolfsii* (Lima ir kt., 1997, 1999), *Pythium ultimum* (Wolffhechel, Jensen, 1992; Howell, 2003), *Venturia inaequalis* (Bolar, 2001) ir *Crinipellis perniciososa* (De Marco ir kt., 2000) sąveika. Kitų genčių grybų sąveika taip pat yra nagrinėjama. *Ulocladium oudemansii* (Simmons.) (Elmer ir kt. 2003, 2005) ir *U. atrum* (Berto ir kt., 2001) kamienų ir *Botrytis cinerea* sąveika intensyviai tiriama ant vynuogių. Nustatytas *Epicoccum nigrum* Link. (syn. *E. purpurascens*) aktyvumas slopinant *S. sclerotiorum* ant 'kivi' augalo ir vaisių (Elmer ir kt., 2002, 2005). *Pythium oligandrum* fermentų pagalba perveria *Phytophthora parasitica* sienelę (Picard, Tirilly, 2000).

Atlikti biokontrolės tyrimai su svogūno lapų ligą sukeliančiu mikroorganizmu *Pleosporum herbarum*. Šio augalų patogeno augimą slopino tokie mikromicetai kaip *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *Cladosporium herbarum*, *Cochliobolus lunatus*, *Setosphaeria rostrata* ir *Ulocladium botrytis*. Bandymai parodė, kad stipriausią sąveiką

prieš *P. herbarum* vykde *A. alternata*, *A. niger*, *C. lunatus*, *S. rostrata* ir *S. chartarum* (Mahomed, Abdel – Sater, 2001).

Mikromicetas *T. harzianum* slopina *Scerotium rolfii* augimą, kurio micelis yra hidrolizuojamas. Augalų patogenas *S. rolfii* sukelia stiebo ir anksčių pūvinį. Ypač tai didžiulė problema JAV žemės riešutų produkcijai. Šis patogenas rastas ir Europoje ant saulėgražų (El-Katatny, 2001).

Trichoderma sp. stabdo kakavmedžio “raganų šluotų” ligos sukėlėją – *Crinipellis pernicioso* augimą. Įdomu tai, kad kiti biokontrolės agentai šios augalų ligos neįveikia. Patogeno micelį ardo *Trichoderma sp.* išskirti hidrolitiniai fermentai ir proteazės (De Marco, Felix, 2002).

Egipte išskirtas ant pomidoro lapų esančių dėmių sukėlėjas *Xanthomonas campestris* sėkmingai naikinamas bioagentu - *Rahnella aquatilis*. Ant pomidorų lapų buvo gelsvos dėmės, nuo kurių lapai suirdavo. Bandyto metu pomidorų lapai, šaknys, sėklos ir dirva, kurioje jie augo, buvo užkrėsti šiuo biokontrolės agentu. Paveikus augalą bioagentu, pomidorai pato atsparūs šiam patogenui, išnyko dėmės ant lapų (Hendawy ir kt., 2005).

Biokovoje su augalų patogenais svarbios ir kai kurios bakterijos. *Bacillus subtilis* yra vienos iš augalų šaknų patogenus naikinančių bakterijų. Jos užkerta kelią patogeno sporų formavimuisi išskirdamos antibiotikus (fumoniziną B₁). Šiuo būdu buvo sunaikintas augalų patogenas *Fusarium verticillioides* (Cavagliari ir kt., 2005).

Augalų ligų biokontrolę vykdo ne tik mikromicetai, bakterijos, bet ir kai kurios mielės. Antagonistinės mielės buvo išskirtos nuo vynuogių uogų. Viso išskirtos 144 mielių rūšys, kurios pasižymėjo kileriniu aktyvumu prieš *Aspergillus carbonarius* ir *A. niger*. Stipriausiu aktyvumu slopinant minėtų mikromicetų augimą pasižymėjo *Issatchenkia orientalis* mielės (Bleeva ir kt., 2006).

Augalų patogenų veiklą rizosferoje gali stabdyti kai kurių bakterijų (*Pseudomonas fluoresceus*, *P. aureofaciens*) išskiriami antibiotikai. Silpniau augalų patogenus veikia bacilos - *Bacillus cereus* rūšis UW 85. Jų endosporos išlieka gyvybingos net esant aukštai aplinkos temperatūrai ar kitoms nepalankioms sąlygoms (Cavagliari ir kt., 2005). Iš biokontrolėje dalyvaujančių bakterijų (*Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Streptomyces*), *Pseudomonas* yra aktyviausios. Jos išskiria įvairių rūšių antibiotikus: pirolnitriną, pioluteoriną ir fenezino – 1 – karboksilatą, kurie slopina kai kuriuos augalų ligų sukėlėjus (Shoda, 2000). *Bacillus subtilis* taip pat kovoja prieš tokius augalų patogenus, kaip *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae*, *Monilia fructicola*. *B. subtilis* išskiria antibiotikus: ituriną A, surfaktiną (Okigbo, 2005).

Chitinazių produkcija, kaip ir celiulazių, yra grybų ir bakterijų originalus mechanizmas. *Serratia plymuthica* C48 buvo izoliuota nuo aliejinių rapsų kaip antagonistas prieš

patogeninius grybus. *Serratia plymuthica* C48 sintetina įvairias chitinazes, chitinolitinė sistema susidaro iš 2 endochitinazių, chitobiozidazės, 2 N-acetil-β-1,4-D-heksozaminidazių ir chitoboazės (Чигалейчик, Пириева, 1981).

Aktinomicetas *Streptomyces violaceusniger* išskirtas nuo "Dehradun" medžio žievės Indijoje. Ši aktinomicetų rūšis atakuoja medžių patogenus tokius kaip *Phanerochaete chrysosporium*, *Postia placenta*, *Coriolus versicolor* ir *Gloeophyllum trabeum*. Tolesni tyrimai parodė, kad už antagonizmą atsakingas ekstraląstelinis aktyvus junginys, kuris vėliau identifikuotas kaip 28 kDa endochitinazė (Shekhar, 2006).

Didesnis dėmesys yra skiriamas fermentų sintezei dviejų kultūrų – antagonisto/patogeno santykiuje ir tokiems tyrimams paskirta daugelio autorių darbai (Innocenti ir kt., 2003; Kūcūk, Kivanc, 2004; Kawchuk, Inglis, 2002; Witkowska, 2002; 2003; Beaver, 2005; Brand ir kt., 2002).

Labai nedaug tyrimų, kurie nagrinėja mišrių kultūrų egzoląstelių celiuliazinių ir chitinazių aktyvumą. Detaliau ištirta *Trichoderma* genties kamienų ir *Aspergillus niger* biotechnologijoje naudojamų kamienų mišrių kultūrų vystymasis ir celiuliazės sintezė jų auginimo terpėje. Ieškoma aktyvių kitų genčių mikromicetų kamienų, gebančių sintetinti celobiazę, kurios stokoja kai kurie *Trichoderma* genties kamieniai. *A. niger* yra vienas iš tokių mikromicetų, kurio celobiazė yra sintetinama intensyviai (Javed, Khan, 2006).

4. TYRIMO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – Išskirti iš dirvožemio ir antropogeninių substratų celiuliozę ir chitiną utilizuojančius mikromicetus ir išaiškinti jų aktyvumą bei gebėjimą konkuruoti pasisavinant šiuos polisacharidus modelinėmis sąlygomis.

Darbo uždaviniai:

- Nustatyti mikromicetų koncentraciją įvairių tipų dirvožemiuose, celiuliozės atliekose (popieriaus, kartonas, pakuotės ir kt.) ir antrinio atliekų perdirbimo substratuose.
- Išskirti dominuojančius, celiuliozę ir chitiną pasisavinančių mikromicetų kamienus ir nustatyti jų santykį tiriamo dirvožemio arba tiriamo substrato mikromicetų bendrijose.
- Iširti atrinktų aktyvesnių mikromicetų kamienų augimą mitybinėje terpėje su skirtingais polisacharidais (įvairios struktūros celiulioze ir chitinu).
- Atlikti pradinis aktyvesnių mikromicetų kamienų egzolaštelinių celiuliazinio ir chitinazinio aktyvumų tyrimus, kurių pagrindu atrinkti geriausius polisacharidus hidrolizuojančių fermentų producentus, didesnę dėmesį skiriant celiuliazijų producentams.
- Nustatyti koreliaciją tarp egzometabolitų sintezės intensyvumo, gebėjimo konkuruoti dėl substrato ir antagonisto/patogeno santykio efektyvumo.

5. TYRIMO METODAI

5.1. *Mikromicetų išskyrimas iš natūralių substratų*

Mikromicetų koncentracijos dirvožemyje ir tiriamuose substratuose nustatymas.

1. Dirvožemio paruošimas tyrimui.

Dirvožemio pavyzdžius ėmėme pagal priimtą standartinę metodiką. Dirvožemį ėmėme iš 10–20 cm gylio, skirtingose (10–16 vietų) tiriamo dirvožemio ploto vietų ir sumaišėme gaudami bendrą dirvožemio ėminį, kurį džiovinome iki orausės masės ir persijojome per 2 mm diametro sietą.

Pastaba: kiti substratai, iš kurių buvo ruoštos suspensijos, nebuvo papildomai paruošiami.

2. Mikromicetų koncentracijos dirvožemyje tyrimas.

Mikromicetų analizę atlikome vertindami kolonijas sudarančių vienetų skaičių (KSV) alaus misos, Čapeko su gliukoze, Čapeko be gliukozės, ją pakeičiant celiuliozės (celiuliozės milteliai, 1 g/l arba karboksimetilceliuliozė – KMC, 10 g/l) arba chitino (chitino dribsniai, 0.5 g/l) priedais. Mikromicetus išskyrėme ir skaičiavome terpėse, išsėdami 10^3 , 10^4 ir 10^5 skiedimus

(1 ml skiedimo kiekvienoje Petri lėkštelėje). Pradinius skiedimus (10 g dirvožemio į 90 ml 0.9% NaCl tirpalo) ruošėme dirvožemį ištrynę iki vienodos smulkios masės, kad atskirtų mikroorganizmai nuo dirvožemio dalelių. Suspensijas išsėjome užpildami jas ištirpinta ir atvėsinta iki 45°C auginimo terpe ir gerai išmaišydami. Bakterijų auginimui slopinti į auginimo terpes pylėme antibiotiką (chloramphenicokol 40 µg/l). Pasėlius auginome tamsoje, 25°C temperatūroje. Stebėjome mikromicetų vystymąsi pasėliuose ir po 2, 3, 4, 7 parų, jei reikėjo ir vėliau, skaičiavome susidariusias kolonijas. Lyginome mikromicetų sudaromų kolonijų skaičių ant skirtingų auginimo terpių, taip gaudami pirminę informaciją apie aktyvumą ir konkurenciją konkrečiau anglies šaltinio terpėje. KSV skaičius įvertintas 1 grame dirvožemio, 1 grame popieriaus gamybos atliekų arba 1 ml popieriaus gamybos dumblo.

3. Grynų mikromicetų kultūrų išskyrimas iš bendro pasėlio ir jų apibūdinimas.

Dominuojančių, aktyvių (pagal užduočių reikalavimus) mikromicetų kamienų kultūras perkėlėme ant trijų terpių – alaus misos agarą (AMA), bulvių dekstrozės agarą (PDA) ir Čapeko agarą (ČA) ir, pagal išaugintų mikromicetų kultūrų morfologinius požymius, identifikavome iki genties arba rūšies. Naudojome sekančius apibūdintojus: Raper, Fenne (1977), Pitt (1979), Charmichael ir kt. (1980), Domsch ir kt. (1980), Kiffer, Morelet (2000), Samson ir kt. (2000) ir kitus.

Pastaba. Mažindami darbo krūvį, apibūdinome tik reikiamomis savybėmis pasižyminčius mikromicetus ir šioje tyrimų srityje daug padėjo darbo vadovė dr. D. Pečiulytė.

5.2. Aktyvių celiuliazinių ir chitinazinių producentų atranka

Aktyvių celiuliazinių ir chitinazinių producentų išskyrimui ir atrankai naudojome selektyvias terpes, kuriose vienintelis energijos ir anglies šaltinis buvo celiuliozė arba chitinas. Celiuliaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų išskyrimui naudojome karboksimetilceliuliozę (KMC) arba fosforo rūgštimi brinkintą filtrinio popieriaus (FPC) celiuliozę, kartais celiuliozės miltelius (smulkintą celiuliozę). Chitinaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų kamienų išskyrimui naudojome koloidinį chitiną.

Celiuliazės sintetinančių mikromicetų atranka vykdoma dviem etapais: pradžioje pasėliai ištiriami brinkintos celiuliozės terpėje, o aktyviausi perkeliama ir tiriami KMC terpėje.

a) Celiuliazinių kamienų pirminė atranka. Naudojam Mandelso (Mandels ir kt., 1974) terpę, kurios 1 litre yra 17.5 g agarą, 5.0 g fosforo rūgštimi brinkintos filtrinio popieriaus celiuliozės ir 0.5% L-sorbose. Sarbozė, pagal Wang ir kt. (1995) rekomendacijas, naudojama sumažinti kolonijų formavimosi greitį ir indukuoti celiuliozės sintezę. Paruoštos agarizuotos terpės lėkštelėje paviršiuje paskleidžiama 100 µl suspensijos ir 4–7 paras inkubuojama 25°C temperatūroje (kartais papildomai 24 val. inkubavome 50°C, kad sustiprinti fermento aktyvumą

ir paryškinti zonos ryškumą). Kiekvienam dirvožemio arba celiuliozės substrato pavyzdžiui buvo paruošiama 10 pasėlių lėkštelių. Tik celiuliozę produkuojantys izoliatai geba pasisavinti brinkintą celiuliozę, kurią utilizavus, terpė išskaidrėja.

Filtrinio popieriaus brinkinta celiuliozė paruošiama pagal Stewart ir kt. (1982) metodą paliekant 48 valandas 85% fosforo rūgštyje 6 °C temperatūros sąlygomis, vėliau kelis kartus perplaunama distiliuotu vandeniu centrifuguojama ir džiovinama. Į terpę brinkinta celiuliozė dedama prieš autoklavavimą.

b) Chitinazinių kamienų pirminė atranka. Mitybinė terpė ir auginimo sąlygos tokios pačios kaip ir celiuliazinių mikromicetų kamienų atrankos atveju, išskyrus tai, kad nededama L-sarbozė.

Koloidinis chitinas buvo ruošiamas iš švaraus krabų geldelių chitino (SIGMA) 7 paruošiamas pagal Chigaleichik ir kt. (1976) rekomenduojamą metodą:

- 10 g hidrolizuoto chitino (Fluca) sumaišoma su 200 ml distiliuoto vandens ir paliekama 24 val. 4 °C temperatūroje;
- po 24 val. pilama 400 ml 75% H₂SO₄ ir vėl paliekama 24 val. 4 °C temperatūroje;
- chitinas nusodinamas pridedant 9 litrus 4 °C distiliuoto vandens ir inkubuojant 48 val.;
- po 24 val. pilama 400 ml 75% H₂SO₄ ir vėl paliekama 24 val. 4 °C temperatūroje;
- chitinas nusodinamas pridedant 9 litrus 4 °C distiliuoto vandens ir inkubuojant 48 valandas;
- skystis nupilamas, o nuosėdos filtruojamos, kad atskirti stambesnius chitino gabalus;
- nuosėdos centrifuguojamos ir perplaunamos 0.2% K₂HPO₄, taip pakartojant 5–6 kartus, nupilant tirpalą;
- hidrolizuoto chitino nuosėdos naudojamos chitino agarų gamybai (dedama 2 g litrui terpės).

Chitinazinis aktyvumas įvertintas pagal koloidinio chitino utilizavimą ir to pasėkoje išskaidrėjant terpei (1 pav., priedas). Vandeningas paruošto chitino preparatas (10 mg sauso chitino / ml) buvo sterilizuojamas 30 min. autoklave ir saugomas 6 °C temperatūroje iki naudojimo tyrimuose.

c) Antrame aktyvių celiuliazinių mikromicetų kamienų atrinkimo etape KMC buvo vienintelis anglies šaltinis mitybinėje terpėje. Auginimo ir aktyvumo terpės sudėtis (g · l⁻¹): KMC – 4, NaNO₃ – 6.5, K₂HPO₄ – 6.5, mielių ekstraktas – 0.3, KCl – 6.5, MgSO₄ · 7H₂O – 3.0,

gliukozė – 0.65 ir agaras – 17.5. Kolonijos su agaru blokelis (5 mm skersmens) perkeliamas arba iš kultūros pasėlio arba iš kolonijos savaitę augintos ant bulvių dekstrozės agaro (BDA). Kultūros auginamos 3–5 dienas 25 °C temperatūroje ir papildomai 18 val. 50 °C temperatūroje. Lėkštelės su kultūra užpilamos 1% kongo raudonuoju indikatoriumi (Congo red), palaikoma 15 min. kambario temperatūroje, nupilama ir indikatoriaus perteklius pašalinamas užpilant 1 M NaCl tirpalu, jį nupilant po 20 min. Neutilizuota celiuliozė (šiuo atveju KMCazės) nusidažo raudonai, o ten, kur ji sunaudojama, terpė įgauna geltoną atspalvį arba būna neutrali. Koloidinis chitinas (2 %) terpėje naudojamas pradinio chitinazinio aktyvumo įvertinimui.

Celiuliazės arba chitinazės aktyvumo zonoje susidaro skaidri zona, kurios plotis nusako mikromiceto biomasės aktyvumą polisacharido atžvilgiu. Kiekybiškai pradinis aktyvumas įvertinamas, remiantis metodinėmis rekomendacijomis, kaip santykinis aktyvumas (Bradner ir kt., 1999), kuris lygus skaidrios zonos pločio ir kolonijos diametro santykiui [I_{KMC} (arba I_{KCH}) = zonos plotis (mm)/kolonijos diametras (mm)]. Aktyvių kamienų santykinis aktyvumas būna didesnis už vieneta, o labai aktyvių mikromicetų kamienų šis koeficientas būna > 2.

5.3. Celiuliazinio aktyvumo tyrimas

Atrinkti aktyvesnių celiuliaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų kamienai buvo auginami terpėse su skirtingu anglies šaltiniu: gliukoze, karboksimetilceliulioze (vidutinio klampumo KMC, SIGMA), fosforo rūgštimi brinkinta filtrinio popieriaus (FPC) celiulioze, smulkintu filtriniu popieriumi ir (rečiau) celiuliozės milteliais (smulkintą celiuliozė), substratų priedus terpėje parenkant taip, kad susidarytų panašus anglies kiekis tenkantis auginimo terpės mililitrui. Kiekybiniam celiuliazinių tyrimui naudojome tuos miromicetų kamienus, kurie gebėjo pasisavinti celiuliozė nepriklausomai nuo jos struktūros.

Tyrėme endo- β -1,4-gliukanazės (dar vadinamos karboksimetilceliuliazė arba sutrumpintai – KMCaze) ir filtrinio popieriaus celiuliazė (FPCaze).

Karboksimetilceliuliazės aktyvumą matavome ir skaičiavome prisilaikydami Tarptautinio komiteto rekomenduojamos endogliukanazės (KMCazės) ir filtrinio popieriaus celiuliazės aktyvumo nustatymo eigos ir fermento aktyvumo skaičiavimo rekomendacijų (Ghose, 1987). Mikromiceto micelis po 14 kultivavimo skystoje terpėje su skirtingu anglies šaltiniu parų atskiriamas nuo auginimo terpės filtruojant per filtrinį popierių. Skystis naudojamas fermentinių aktyvumų matavimui.

Endo- β -1,4-D-gliukanazės aktyvumo nustatymo eiga. Nedidelis kiekis tirpalo (0.5 ml) ištirpinamas 0.05 M natrio citratiniame buferyje (pH 4.8) ir pašildomas vandens vonioje iki 50°C. Į pašildytą tirpalą įpilama 0.5 ml substrato (2% ištirpintos KMC tirpalas), gerai

sumaišoma ir 30 min. eksponuojama 50°C temperatūros vandens vonioje. Pasibaigus reakcijos laikui, įpilama 3.0 ml dinitrosalicilinės rūgšties reagento ir 5 min. pavirinama. Atvėsinus išmatuojama tirpalo sugertis ir pagal kalibracinę kreivę (2 pav., 2 lentelė, priedas) randama gliukozės koncentracija tirpale. Vienas fermento aktyvumo vienetas (vienetas – U) yra lygus fermento kiekiui, kuris hidrolizuodamas KMC reakcijos metu išlaisvina 1 μmol gliukozės per 1 minutę.

Filtrinio popieriaus celiuliazinio aktyvumo nustatymo eiga. Auginimo terpės (3.0 ml) pilami į 0.05 M natrio citratinį buferį (pH 4.8) pakaitinama iki 50°C temperatūros vandens vonioje, įdedamas filtrinio popieriaus juostelė (1 x 6 cm) ir 1 val. eksponuojama toje pačioje temperatūroje. Filtrinio popieriaus hidrolizės reakcija stabdoma įpilant 3.0 ml dinitrosalicilinės rūgšties reagento, pakaitinama 5 min. 90°C ir procedūra vykdoma kaip ir endogliukanazės nustatymo atveju.

Gliukozės kiekio nustatymas dinitrosalicilinio reagento metodu. Metodas naudojamas redukuoto cukraus (su laisvomis C = OH grupėmis) nustatymui. Kai tirpale yra gliukozė, oksiduojama reagento aldehido funkcinė grupė. 3,5-dinitrosalicilinė rūgštis (DMS) redukuojama į 3-amino,5-nitrosalicilinę rūgštį. Kadangi ištirpęs deguonis dalyvauja gliukozės oksidacijoje, sulfitas, kuris nėra būtinas spalvinei reakcijai, dedamas į reagentą ištirpusiam deguoniui sugerti. Kaip matome iš reakcijos, vienas cukraus molis reaguoja su vienu 3,5-dinitrosalicilinės rūgšties moliumi. Būtina kalibruoti gliukozę, kad pagal kalibravimo kreivę nustatyti susidariusios reakcijos metu gliukozės koncentraciją.

aldehido grupė – – – – → karboksilinė grupė

3,5-dinitrosalicilinė rūgštis – – – – → 3-amino,5-nitrosalicilinė rūgštis

Reagentai: 1. Dinitrosalicilinės rūgšties reagento tirpalas, 1%:

- dinitrosalicilinė rūgštis – 10 g;
- fenolis – 2 g;
- natrio sulfitas – 0.5 g;
- natrio šarmas – 10 g;
- vandens iki litro.

2. Kalio natrio tartrato tirpalas – 40%.

3. HCl – 37.3%, 11.9 N.

4. KOH – 5 N tirpalas.

Darbo eiga: 1. 3 ml DNS reagento pilama į 3 ml gliukozės pavyzdžio į kiuvetę, uždengiama plėvele, kad neišgaruotų ir 5–15 min. pakaitinama 90°C temperatūros vandens vonioje, kol susidaro rausvai ruda tirpalo spalva.

2. Įpilamas 1 ml 40% kalio natrio tartrato tirpalo spalvai stabilizuoti.

3. Atvėsinus iki kambario temperatūros, spektrofotometru išmatuojama sugertis ties $\lambda = 540 \text{ nm}$ (A_{540}).

Ruošiant kalibracinę kreivę, žinomos koncentracijos gliukozės tirpalas sumaišomas su dinitrasalicilinės rūgšties reagentu, kaitinama, ir išmatuojama skirtingos koncentracijos tirpalo sugertis. Ordinačių ašyje atidedama sugertis A_{540} , o abscisių ašyje – gliukozės koncentracija mg/ml. Kalibracinė kreivė – 2 pav., 3 lentelė, priedas.

PASTABA: norėdami įvertinti pH įtaką fermento aktyvumui jau kiekybiškai ištirto mikromiceto kultūrą auginome skirtingo pH terpėje su KMC ir pagal I_{KMC} nustatėme pradines optimalios fermentui pH reikšmes.

5.4. Chitinazinio aktyvumo tyrimas

Egzochitinazės aktyvumui nustatyti mikromicetų kamienus auginome minimalioje skystoje terpėje (sudėtis: K_2HPO_4 – 1.5 g; $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ – 1.5 g), kuriose chitinas (2 g/l) arba patogenų ląstelių chitinas (2 g/l) buvo vienintelis anglies ir energijos šaltinis. Ląstelių sienelių preparatus ruošėme iš 7–14 parų BPA terpėje išaugintų mikromicetų biomasės pagal Sivan ir Chet (1989) rekomendacijas. Homogenizuota biomasė filtruojama per stiklinį filtrą, o ant jo likusi ląstelių sienelių masė perplaunama tris kartus distiliuotu vandeniu, vieną kartą metanoliu ir po to acetonu. Tada išdžiovinama ir dedama į auginimo terpę kaip anglies šaltinis.

Egzochitinazės aktyvumo nustatymas. Po 10 auginimo terpėje su chitinu parų mikromicetų biomasė nufiltruojama, o skystis naudojamas baltymo pagausinimui arba (aktyviems kamienams) fermento aktyvumo matavimui. Auginimo terpės skystis (arba pagausinto baltymo ėminys) sumaišomas su N-acetil- β -D-gliukozaminu, palaikoma 3 min. 30 °C temperatūroje. Reakcija stabdoma 1 M NaOH tirpalu ir spektrofotometru išmatuojama tirpalo sugertis ties 410 nm, kurios intensyvumas priklauso nuo p-nitrofenolo kiekio. Nitrofenolas susidaro fermentinės reakcijos metu iš N-acetil- β -D-gliukozamino veikiant chitinazei. Aktyvumas (U) išreiškiamas fermento aktyvumu išlaisvinančiu 1 μmol p-nitrofenolio per 1 minutę. Pagal iš anksto padarytą kalibracinę kreivę (kurios ordinačių ašyje atidedama sugertis (A_{410}), o abscisių ašyje – $\mu\text{g/ml}$ fenolo) pagal išmatuotą sugertį surandama p-nitrofenolio koncentracija. Chitinazės aktyvumas buvo vertinamas terpės ml arba baltymo mg, jeigu buvo nustatomas baltymo kiekis.

Baltymo kiekio nustatymas. Tik chitinazių tyrimo etape bandėme pagausinti baltymo kiekį, naudodami Onori ir kt. (2005) rekomenduojamą pagausinimo metodą. Celiuliazinis atrinktų mikromicetų aktyvumas buvo nesunkiai užfiksuojamas šio tyrimo sąlygomis, o kadangi

Šie tyrimai yra pradiniai, nesiorientuojant į paties fermento charakteristikų ištyrimą, dažniau celiuliazės aktyvumą skaičiavome terpės tūriui (1 ml auginimo terpės). Baltymo pagausinimui naudojome amonio sulfatą ((NH₄)₂SO₄), dėjome į po auginimo nufiltruotą ir centrifuguotą auginimo skystį, sudarant 48.3% koncentracijos tirpalą. Taip paruoštą mišinį laikėme 16 val. 4°C temperatūroje, vėliau jį 20 min. centrifugavome (5000 x g), skystį nupylėme, o pasilikusį baltymą su koloidinio chitino likučiais išdžiovinome kambario temperatūroje, tada ištirpinę 5 ml palikome 48 valandoms 4°C temperatūroje. Po šios procedūros baltymo koncentracija ir chitinazės aktyvumas buvo tuoju pat ištiriamas.

Baltymo koncentracija buvo nustatyta Bredfordo metodu (Bradford ir kt., 1974) atsižvelgiant į Bagdonienės ir kt. (2006) rekomendacijas. Baltymai jungiasi su Kumasi brilantinio mėlio dažikliu ir matuojamas susidariusio komplekso spalvos intensyvumas. Gryno dažiklio katijoninė forma sugeria šviesą ties 470 nm ir 650 nm, o susijungusi su baltymo arginino ir aromatinėmis aminorūgštimis anijoninė dažiklio forma sugeria šviesą ties 596 nm. Šis metodas yra paprastas, greitas ir jautrus (galima apčiuopti 1–10 µg baltymo koncentraciją).

Reagentai: 1. 0.5 mg/ml jaučio serumo albumino tirpalas – 2 ml;

2. 0.15 M NaCl tirpalas – 50 ml;

3. Kumasi brilantinio mėlio G 250 dažiklio tirpalas: 50 mg Kumasi brilantinio mėlio G 250 ištirpinama 25 ml 95% etanolio ir įpilama 50 ml 85% fosforo rūgšties. vandens įpilama iki 0.5 litro, filtruojama. Laikoma 4°C temperatūros sąlygomis.

Darbo eiga: Visiems kalibravimo terpės taškams nustatyti procedūra atliekama du kartus.

1. Į 8 mėgintuvėlius įpilama atitinkamai po 10, 20, 30 ir 40 µl jaučio serumo albumino tirpalo ir į visus įpilama iki 100 µl 0.15 M NaCl tirpalo. Į kontrolinius (9 ir 10-tą) mėgintuvėlius įpilama tik po 100 µl 0.15 M NaCl tirpalo.
2. Į visus mėgintuvėlius įpilama po 10 µl Kumasi brilantinio mėlio G 250 tirpalo ir sumaišoma. Laikoma 2 min. kambario temperatūros sąlygomis.
3. Spektrofotometru pamatuojama sugertis ties $\lambda = 595$ nm (A_{595}) ir braižoma kalibravimo kreivė. Ant ordinačių ašies pažymima sugertis (A_{595}), o ant abscisių – baltymo kiekis (µg).
4. Į nežinomos koncentracijos baltymo tirpalą įpilama iki 100 µl 0.15 M NaCl tirpalo, 1.0 ml Kumasi brilantinio mėlio G 250 tirpalo ir sumaišoma, laikoma 2 min. kambario temperatūros sąlygomis. Spektrofotometru pamatuojama A_{595} , baltymo kiekis nustatomas iš

kalibravimo kreivės (3 pav., priedas).

5.5. *Potencialių bioagentų atranka*

Potencialių bioagentų atrinkimui analizavome gautus rezultatus jau pirminio mikromicetų išskyrimo iš tiriamų substratų metu, bei pagal santykinio fermentinio aktyvumo (I_{KMC} ir I_{KCH} koeficientų) lygį, kadangi ir gebėjimas įsisavinti celiuliozę (aktyvumas augalo atžvilgiu) ir gebėjimas sintetinti chitinazes (patogeno ląstelių sienelių atžvilgiu) yra svarbus mikoparazitavimui bei bioagento efektyvumui slopinant patogeno vystymąsi. Tie mikromicetų kamienai, kurie, remiantis tyrimo rezultatais, buvo charakterizuojami didesniais aktyvumais, buvo išbandomi mišrių kultūrų testuose bei auginant juos terpėje su chitinu ir nustatant chitinazės aktyvumą, kaip vieno iš esminių antagonizmo fermentų.

Chitinazės aktyvumo nustatymas aprašytas 5.4. metodikos dalyje.

Mišrių kultūrų testai.

Mišrios aktyvių antagonistų kamienų ir augalų patogenų kamienų kultūros buvo auginamos terpėse su skirtingais anglies šaltiniais (4%): gliukoze, KMC, celiuliozės milteliais, smulkintu filtriniu popierumi, chitinu ir koloidiniu chitinu. Pagrindinė buvo Čapeko druskų terpė arba dirvožemio ekstrakto terpė. Dirvožemio ekstrakto terpę naudojome norėdami atgaminti realesnę, artimesnę gamtinei mitybinių elementų situaciją. Dirvožemio ekstraktą ruošėme sekančiais: 1 kg humusingo dirvožemio 1 valandą virinome 1 litre vandens, ataušino ir 24 val. laikėme 4°C temperatūros sąlygomis. Po šios ekspozicijos skystį nuo kietųjų dalelių atskyrėme filtruodami ir į jį įpylėme vandens iki 1 litro tūrio. Šis ekstraktas buvo naudojamas kaip bazinė terpės dalis.

Agarizuotų terpių paviršiuje patalpinome dviejų kamienų (potencialaus bioagento ir patogeno) blokelių 2 cm atstumu vienas nuo kito. Paruoštas mišrių kultūrų lėkšteles auginome 25°C temperatūros sąlygomis ir periodiškai stebėjome mikromicetų kolonijų susidarymo greitį ir jų tarpusavio sąveiką.

Statistika.

Rezultatų analizė atlikta naudojant pradinis statistikos metodus įvertinant vidutines tiriamo parametro vertes, rezultatų vidurkių paklaidas, bei, atliekant palyginamuosius tyrimus nustatėme skirtumų patikimumus (Čekanavičius, Murauskas, 2000).

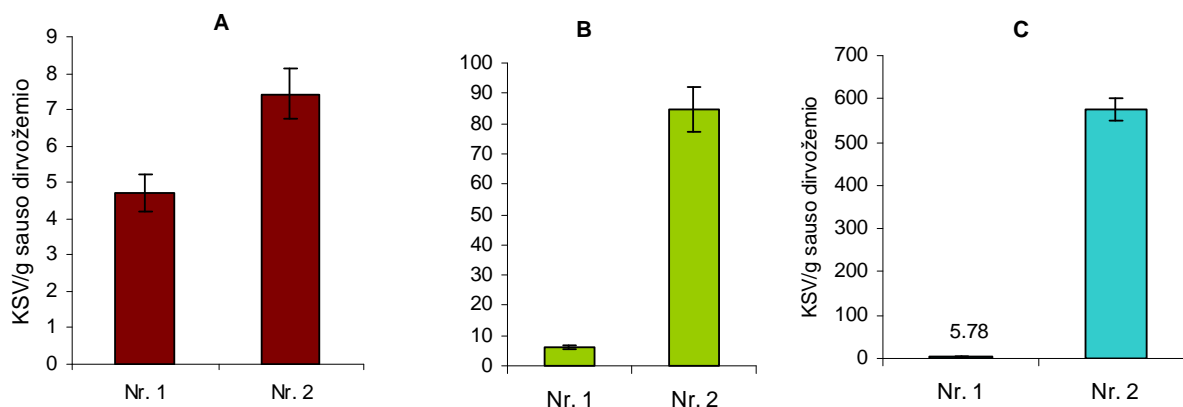
6. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

6.1. I SKYRIUS. *Celiuliazinių ir chitinazinių mikromicetų kamienų paplitimas natūraliuose substratuose*

Celiuliozė, kaip polimerinė žaliava, jau nuo amžių naudojama dviejuose pagrindiniuose procesuose: popieriaus gamybai ir natūraliems tekstiliniams pluoštams gauti. Celiuliozė dėl tankaus tarp molekulinų vandenilinių ryšių tinklo nėra tirpi populiariuose organiniuose bei neorganiniuose tirpikliuose. Tai riboja nemodifikuotos celiuliozės taikymo sritis. Tirpūs celiuliozės produktai gaunami ją chemiškai modifikuojant. Atitinkamomis sąlygomis įvedant į celiuliozės makromolekulę pakaitus, gaunama nemažai vandenyje ir/ar organiniuose tirpikliuose tirpių produktų, kurie naudojami dirbtiniams pluoštams formuoti, lakų, dažų gamybai, įvairių buitinės chemijos gaminių kompozicijose, maisto pramonėje. Tokie produktai sintetinami naudojant klasikines polimeranaloginių kitimų reakcijas. Celiuliozė natūraliomis gamtinėmis sąlygomis dalinai arba iki cukraus transformuojama mikroorganizmų, kurie gali būti naudojami ir žmogaus organizuojamuose grynos celiuliozės gamybos, celiuliozės hidrolizės iki reikiamo junginio arba utilizuojant atliekas. Aktyvių mikromicetų paieška pradedama nuo jų paplitimo natūraliomis sąlygomis ištyrimo.

6.1.1. *Dirvožemio mikromicetai*

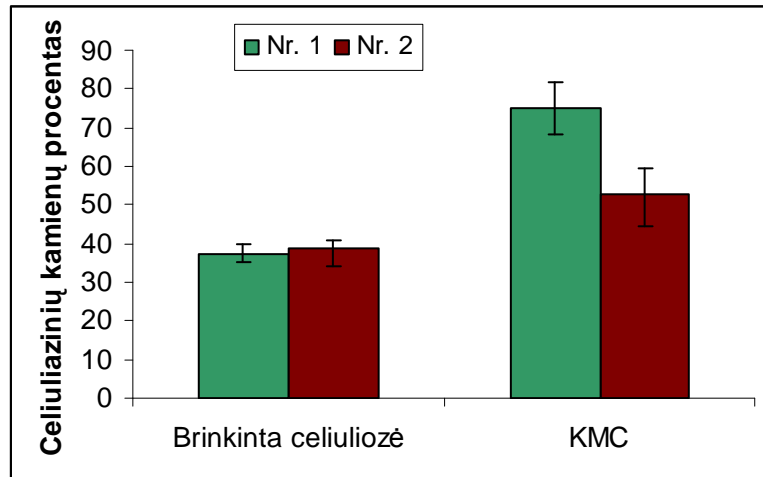
Ištyrėme dviejų skirtingų, pagal organinių medžiagų koncentraciją juose, miško dirvožemių mikromicetų koncentraciją ir nustatėme gebančių utilizuoti celiuliozę kamienų santykį bendroje išskirtų ant mitybinių terpių mikromicetų koncentracijoje. Mikromicetų (kaip ir kitų mikroorganizmų) bendrijos gausa ir struktūra priklauso nuo dirvožemio savybių bei jame augančių augalų. Priklausomai nuo žolinių augalų ir medžių nuokritų (lapų ir kt.) keičiasi ir paviršiniame dirvožemio sluoksnyje vykstančių procesų intensyvumas, augalinės masės destrukcijos eiga. Kadangi mūsų užduotis buvo aktyvių, polisacharidus hidrolizuojančių mikromicetų kamienų paieška ir tolesnis jų ištyrimas, du dirvožemius pasirinkome tik santykinai skirtingus pagal organinių medžiagų kiekį. Viename iš jų gausiai randama nuokritų ir vyksta intensyvūs augalų masės destrukcijos procesai, daugiau drėgmės; kitas skurdesnis, sausesnis, procesai lėtesni. Pirmajame dirvožemyje organinių medžiagų koncentracija pavyzdžiui ėmimo metu siekė 7.6%, kitame ji buvo dešimt kartų mažesnė (iki 0.5%). Bendra mikromicetų koncentracija dirvožemiuose, nustatyta pagal kolonijas sudarančių vienetų skaičių terpėje su lengvai įsisavinamu anglies šaltiniu – gliukoze, statistiškai patikimai ($p < 0.05$) skyrėsi ir buvo didesnė humusingame dirvožemyje (13 pav.).



13 pav. Mikromicetų koncentracija (kolonijas sudarančių vienetų skaičius – KSV $\times 10\ 000$) viename grame sauso dirvožemio Mandels mineralinėje terpėse su skirtingu anglies šaltiniu: **A** – 20% gliukozės, **B** – 4% fosforo rūgštimi brinkintos filtrinio popieriaus celiuliozės ir **C** – 4% karboksimetil-celiuliozės (KMC). Nr. 1 – smėlingas miško dirvožemis (0.5 % organinių medžiagų), Nr. 2 – humusingesnis miško dirvožemis (7.6% organinių medžiagų).

Skirtingi anglies šaltiniai išskyrimo terpėse turėjo įtakos išskiriamų mikromicetų koncentracijai. Kaip galime stebėti 13 paveiksle aprašomuose rezultatuose, brinkintos celiuliozės ir KMC terpėje, kolonijas sudarančių vienetų skaičius gerokai skyrėsi nuo jų skaičiaus terpėje su gliukoze. Pagal kolonijas sudarančių vienetų skaičių išskiriamų ant brinkintos celiuliozės terpės mikromicetų koncentracija buvo 10 kartų, o ant KMC terpės - 100 kartų didesnė nei kontrolinėje terpėje. Akivaizdu, kad kolonijų vystymosi greitį mažinanti sorbozė turėjo įtakos ir slopino greitai augančių *Trichoderma* genties grybų vystymąsi ant celiuliozės terpių ir sudarė sąlygas geriau išryškėti kitų genčių mikromicetams. Be to, terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu – celiulioze, galėjo vystytis tie mikromicetų kamienai, kurie geba pasisavinti šį substratą. Ryškiai skyrėsi skirtingų dirvožemių mikromicetų, gebančių augti terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu – celiulioze, koncentracija ($p < 0.01$). Išskirtų ant brinkintos celiuliozės terpės smėlingo dirvožemio mikromicetų koncentracija buvo tik 6.4 tūkstančius KSV/ g sauso dirvožemio, tuo tarpu išskirtų iš humusingo dirvožemio ji buvo virš 80 tūkstančių KSV/g dirvožemio (13 pav., B). Dar didesnis koncentracijų skirtumas užfiksuotas mitybinėje terpėje naudojant karboksimetilceliuliozę (13 pav., C). Šioje terpėje koncentracijos skiriasi 100 kartų.

Nepaisant didelių gyvybingų mikromicetų koncentracijų celiuliozės priedų terpėse, vertinant pagal kolonijos formavimosi pradmenis, funkcionalių, tikrai šiuos substratus utilizuojančių izoliatų skaičius buvo gerokai mažesnis. Dalis mikromicetų, kaip tenka stebėti analizuojant pasėlių kokybę, sugeba suformuoti mikrokolonijas agarizuotoje terpėje, tačiau vėliau, jei anglies šaltinis nepasisavinamas, mikromicetas nesivysto ir mitybine terpe naudojasi tik tie, kurie turi reikiamą fermentą substrato hidrolizavimui. Manome, kad dėl tokių savybių labai pasikeičia procentinis gebančių utilizuoti kamienų santykis (14 pav.).

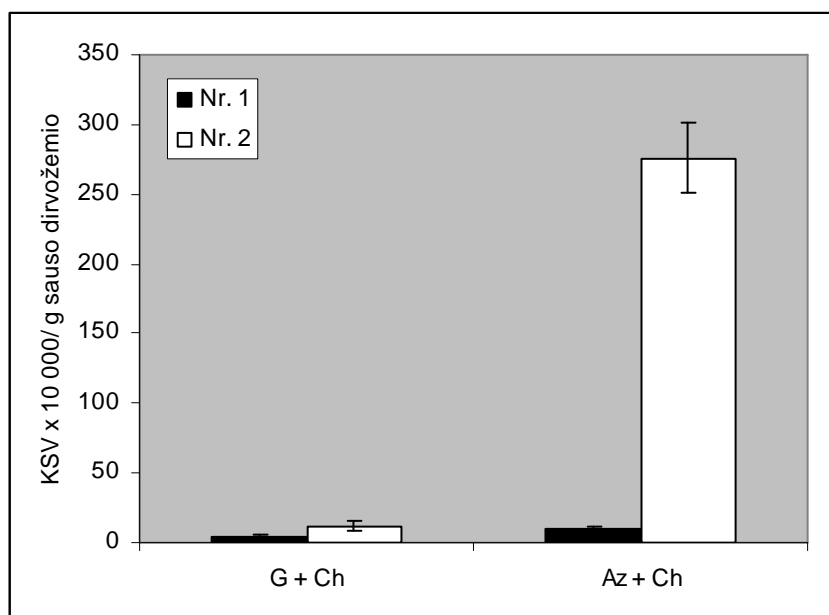


14 pav. Iš dirvožemio (Nr. 1 – smėlingo, Nr. 2 – turinčio 7,5% organinių medžiagų) išskirtų kamienų, gebančių augti terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu fosforo rūgštimi brinkinta filtrinio popieriaus celiulioze arba KMC, procentas bendroje išskirtų kamienų koncentracijoje, terpėje su gliukoze.

Nors smėlingame dirvožemyje bendra gebančių formuoti pradinį micelių pradų koncentracija buvo mažesnė nei humusingame, aktyvių celiuliazinių kamienų procentas terpėje su KMC jame buvo didesnis nei humusingame dirvožemyje (14 pav.). Kai mitybinėje terpėje buvo dedama brinkinta celiuliozė, abiejų dirvožemių celiuliazinių mikromicetų koncentracija buvo vienoda ir sudarė 36.7% bendro išskirtų kamienų skaičiaus.

Chitino priedai mitybinėje terpėje suteikė kitokį mikromicetų koncentracijos kitimo atspalvį. Naudojome dvi skirtingas chitino terpes: vienoje chitinu pakeitėme gliukozę, palikdami azoto šaltinį terpėje (nitrata), kitoje palikome gliukozę, bet pašalinome azoto šaltinį. Mes siekėme ne tik išskirti chitiną hidrolizuojančius mikromicetų kamienus, bet ir nustatyti, ar mikromicetams būdingas chitino panaudojimas tik kaip anglies šaltinio, ar jie jį gali naudoti kaip azoto šaltinį. Yra tyrimų įrodančių, kad ir bakterijos pasisavinana chitiną dėl azoto (Gupta ir kt., 2006). Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad azoto stoka gerokai sumažino išskirtų iš dirvožemio mikromicetų koncentraciją (15 pav.), lyginant su kontrole (13 pav., A), o tai reiškia, kad šiomis tyrimo sąlygomis, nepriklausomai nuo dirvožemio tipo, išskirti mikromicetai nepanaudojo chitino vietoje iš terpės eliminuoto azoto (nitrato). Kad chitinas buvo utilizuojamas kaip anglies šaltinis rodo mikromicetų koncentracijos (KSV/g sauso dirvožemyje) padidėjimas, lyginant su kontrole terpėje su chitinu ir azotu, bet be gliukozės (15 pav.). Ypatingai koncentracijos padidėjimas ryškus humusingo dirvožemio mikromicetams, kurių koncentracija nuo 11.72 tūkstančių KSV /g dirvožemio kontrolėje (13 pav., A) padidėjo iki 275.82 tūkstančių KSV/g dirvožemio terpėje gliukozę pakeitus chitinu (15 pav.). Kaip ir celiuliozės priedo į terpę atveju, lengvai įsisavinamą anglies šaltinį – gliukozę, pakeitus polisacharidu – chitinu, sumažėjo greitai

augančių mikromicetų koncentracija ir jų diametras, susiformavo kiti konkurenciniai ryšiai substrato atžvilgiu, o taip pasikeitusi situacija leido pasireikšti chitinaziniu aktyvumu pasižyminčių rūšių mikromicetams.



15 pav. Skirtingų dirvožemių (Nr. 1 ir Nr. 2) mikromicetų koncentracija, nustatyta ant standžios terpės su gliukoze ir chitinu (G + CH), bet be azoto ir ant standžios terpės su azotu ir chitinu (Az + CH), bet be gliukozės.

Keturiasdešimt trijų rūšių mikromicetai buvo išskirti iš tirtų dirvožemių. Šešios rūšys priklausė *Penicillium*, po tris rūšis priklausė *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Monocillium* ir *Mucor*, po 2 *Absidia*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Trichoderma* ir *Verticillium* gentims. Likusieji mikromicetai priskirti vienai iš *Acremonium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Ceratocystis*, *Cromelomyces*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Humicola*, *Paecilomyces* ir *Scopulariopsis* genčių rūšims, o 6 mikromicetai neidentifikuoti iki rūšies. Šiuos, mikromicetų identifikavimo tyrimus atliko darbo vadovė dr. D. Pečiulytė, tačiau konsultavo mane identifikuojant dominuojančius tirtuose dirvožemiuose ir atrinktus tyrimams – potencialius polisacharidų destruktorius.

Išanalizavus perkeltų iš kolonijų, apie kurias susidarė skaidrios zonos terpėje su fosforo rūgštimi brinkinta celiulioze, ir išaugintų terpėse mikromicetų kamienų kultūras susisteminoje jų gentinį pasiskirstymą ir celiuliazinio aktyvumo procentą (4 lentelė).

Tarp 1550 mikromicetų kamienų terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu brinkinta – celiulioze, buvo matomos 726 kamienų skaidrios zonos (46.83% visų išskirtų ant šios terpės kamienų). Tik 116 mikromicetų kamienų (7.41% kamienų, kuriems zonų sudarymas patvirtintas)

skaidrios zonos buvo patikimai aiškios ir patvirtinančios kamienų celiuliazinį aktyvumą pirmojo atrinkimo etapo tyrimo sąlygomis.

4 lentelė. Mikromicetų, aktyvių brinkintos celiuliozės terpėje pirminio atrinkimo tyrime, genčių charakteristika ir celiuliazinio aktyvumo palyginimas (aktyvių kamienų procentas).

Mikromicetų gentys	Išskirtų kamienų skaičius	Celiuliazinių kamienų procentas		
		Bendras	Silpnas aktyvumas ^a	Patikimas aktyvumas ^b
<i>Absidia</i> Tiegh.	86	27.90(24)*	87.50 (21)*	12.50 (3)*
<i>Acremonium</i> Link	13	23.07 (3)	33.34 (1)	66.66 (2)
<i>Alternaria</i> Nees	22	27.27 (6)	100.0 (6)	–
<i>Arthrinium</i> Kunze	8	100.0 (8)	97.42 (6)	12.58 (2)
<i>Aspergillus</i> P. Micheli ex Link	34	61.76 (21)	51.15 (12)	42.85 (9)
<i>Botrytis</i> P. Micheli ex Pers.	13	100 (13)	30.76 (4)	69.29 (9)
<i>Botryotrichum</i> Sacc. ex Marchal	6	83.33 (5)	40.00 (2)	60.00 (3)
<i>Chaetomium</i> Kunze	7	100.0 (7)	71.43 (5)	28.57 (2)
<i>Cladosporium</i> Link	68	50.00** (34)	–	–
<i>Clonostachys</i> Corda	53	77.36 (41)	60.98 (25)	39.02 (16)
<i>Chrysosporium</i> Corda	19	84.24** (16)	–	–
<i>Cylindrocarpon</i> Wollenw.	56	39.28 (22)	100.0 (22)	–
<i>Cunninghamella</i> Matr.	18	22.22 (4)	100.0 (4)	–
<i>Epicoccum</i> Link	4	100.0 (4)	85.00 (3)	25.00 (1)
<i>Fusarium</i> Link	48	100.0 (48)	97.92 (47)	2.03 (1)
<i>Geotrichum</i> Link	9	11.11 (1)	100.0 (1)	–
<i>Gliocladium</i> Corda	24	100.0 (24)	54.19 (13)	45.83(11)
<i>Mortierella</i> Coem.	143	2.79 (4)	100.0 (4)	–
<i>Mucor</i> Fresen.	21	23.80 (5)	60.0 (3)	40.0 (2)
<i>Myrothecium</i> Tode	23	30.76 (8)	73.92 (16)	26.08 (6)
<i>Oidiodendron</i> Robak	11	9.10 (1)	100.0 (1)	–
<i>Paecilomyces</i> Bainier	42	38.09 (16)	93.75 (15)	6.25 (1)
<i>Penicillium</i> Link	387	49.09 (96)	70.83(68)	29.16(28)
<i>Rhizomucor</i> Lucet & Costantin	6	100.0 (6)	66.67 (4)	33.33 (2)
<i>Scopulariopsis</i> Bainier	26	30.76 (8)	62.50 (5)	37.50 (3)
<i>Stachybotrys</i> Corda	6	100 (6)	16.66 (1)	83.33 (5)
<i>Syncephalastrum</i> J. Schröt.	5	80.0 (4)	100.0 (4)	–
<i>Torulomyces</i> Delitsch	30	70.0 (21)	66.66 (14)	33.33 (7)
<i>Trichocladium</i> Harz	12	75.00 (9)	33.34 (3)	66.66 (6)
<i>Trichoderma</i> Pers.	68	100.0 (68)	60.30 (41)	39.70(27)
<i>Trichosporiella</i> Kamyschko	3	100.0 (3)	66.67 (2)	33.33 (1)
<i>Ulocladium</i> Preuss.	21	14.28 (3)	100.0 (3)	–
<i>Verticillium</i> Nees.	36	19.44 (7)	85.71 (6)	14.28 (1)
Kiti (Mycelia sterilia, basidiomycetes ir nežinomi (neidentifikuoti) kamienai	128	28.90 (37)	75.68 (28)	24.32 (9)
Total	1456	40.04 (583)	66.89(390)	33.11 (157)

– nenustatytas; **a** – zona labai neryški arba siaura, **b** – skaidri zona > 5 mm ir gerai matoma. * – skliaustuose kamienų skaičius. ** Lėtai augančių – *Cladosporium* spp., *Crysosporium* sp., ir *Syncephalastrum* spp. buvo sunkiai atrenkami šio tyrimo sąlygomis.

Aktyvūs mikromicetai priskirti gerai žinomoms dvidešimt septynioms dirvožemio mikromicetų gentims (4 lentelė). Dauguma *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Clonostachys*, *Gliocaldium*, *Myrothecium*, *Penicillium* ir *Trichoderma* genčių mikromicetų kamienų rodė gerus celiuliazinius aktyvumus. Aktyvių šiose gentyse kamienų procentinis pasiskirstymas buvo nevienodas: atitinkamai sudarė apie 42.85%, 28.57%, 79.24%, 37.51%, 26.08%, 32.69% ir 39.70% kiekvienos iš šių genčių bendro išskirtų izoliatų skaičiaus. Mažesnis aktyvumas pagal skaidrios zonos sudarymą užfiksuotas *Verticillium* genties grybams (21.42% skaidrias zonas sudarančių kamienų), o *Cunninghamella*, *Geotrichum*, *Mortierella* ir *Ulocladium* genčių kamienai nepasižymėjo aktyvumu šio preliminaraus atrinkimo sąlygomis.

6.1.2. Mikromicetai išskirti iš antropogeninių substratų

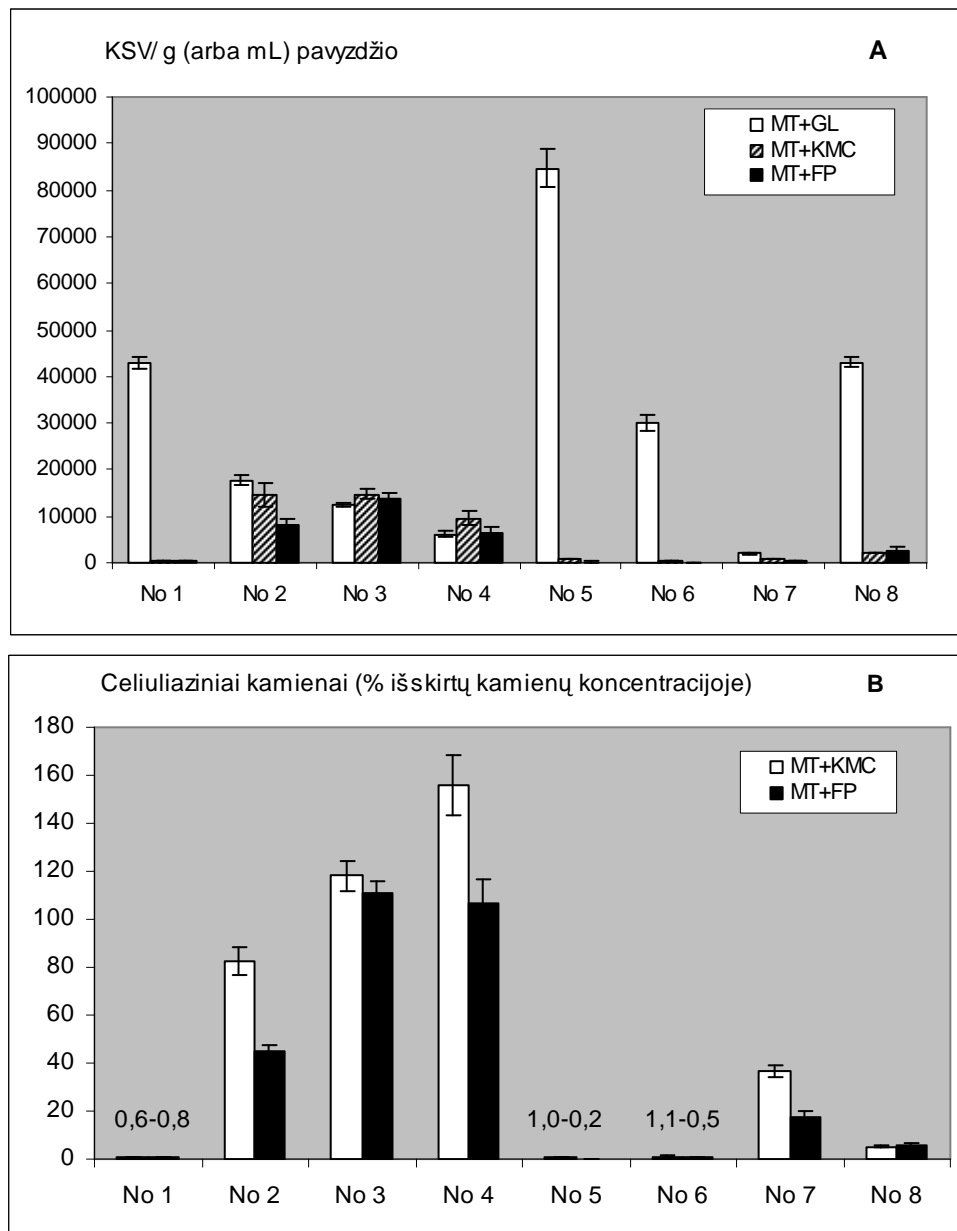
Mikromicetai celiuliazės sintetina ir išskiria į utilizuojamus celiuliozės arba celiuliozės savo turinyje turinčius substratus, kurie yra medžiagos, žaliavos ir skirtingos paskirties gaminiai. Sąlygos, kuriomis vyksta celiuliozės turinčių medžiagų irimas dalyvaujant mikroorganizmams, būna labai skirtingos. Norint paspartinti šį procesą (pvz. atliekų utilizacijos metu) arba sulėtinti saugant gaminio vaizdą ir pailginant jo tarnavimo pagal paskirtį laiką, reikia valdyti procese dalyvaujančių fermentų sintezę, jų aktyvumą. Mikromicetai, prisitaikę vystytis įvairiomis sąlygomis ir gebantys transformuoti skirtingos cheminės struktūros substratus, turi fermentines sistemas, kurių charakteristikos atspindi ir konkrečią taksonominę grupę, ir adaptacines konkrečiomis sąlygomis savybes. Daugiausiai ištirtos mikromicetų genties - *Trichoderma* genties, kuri traktuojama kaip dirvožemio grybų gentis, kamienų celiuliazės pradėtos naudoti įvairiose srityse (Oksanan, 2000; Mach, Zeilinger, 2003; Cavaco-Paulo, Gübitz, 2003, Nierstrasz, Warmoeskerken, 2003; Van Wyk, Mohulatsi, 2003; Penttilä ir kt., 2004). Tačiau, nepaisant visų tyrinėtojų pastangų, surasti tikrai gerą *Trichoderma* kamieną su puikiu industriniu celiuliazinių kompleksu nepavyksta. *Trichoderma* genties kamienams būdinga celobiazės stoka, ko pasekoje kaupiasi disacharidas celobiozė, stabdanti celiuliozės hidrolizės procesą (Gruno ir kt., 2004). Nemažėja poreikis termostabilių, labai aktyvių specifinių celiuliazinių, todėl tiriami ne tik *Trichoderma*, bet ir kitų genčių miceliniai grybai (Updegraff, 2004; Hanif ir kt., 2004; Kamal, Mathur, 2005; Gopinath ir kt., 2005; Ikram-ul-Haq, Khan, 2006). Dauguma mikromicetų sugeba adaptuotis antropogeniškomis sąlygomis bei pasisavinti antropogeninius substratus kaip energijos ir anglies šaltinį. Tokiomis sąlygomis galima aptikti mikromicetų kamienus su labai palankia konkrečiam procesui fermentų sistema. Gera ekologinė niša ieškant celiuliaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų kamienų yra celiuliozės atliekų antrinio perdirbimo įmonės. Popieriaus atliekos antrinio perdirbimo procese paverčiamos šlamu (popieriaus mase), iš kurio vėl gaminamas popierius, kartonas ar kiti gaminiai. Tiek pačios

atliekos, tiek jų perdirbimo masė yra užkrėsta mikroorganizmais, dalis kurių yra tiesiog natūralios taršos komponentai, dalis kaip tokių substratų utilizatoriai.

Ištyrėme kartono gamybos skirtingų substratų mikromicetų kompleksus ir pabandėme įvertinti celiuliazinių kamienų procentą, o atrinkę aktyvesnius, ištyrėme ir jų aktyvumą polisacharido – celiuliozės, atžvilgiu. Ištyrėme skirtinguose atliekų perdirbimo etapuose surinktų substratų pavyzdžius, pradėdant atliekų žaliavomis ir baigiant išgrynintu plaušu. Palyginimui ištyrėme ir pačios antrinio atliekų perdirbimo gamyklos pradinio dumblo, biologinio nutekamųjų atliekų rezervuaro masės ir sedimentacijos rezervuarų mikromicetus. Perdirbimo etapuose žaliava ir plaušas apdorojamas chemiškai, todėl substratuose paplitę mikromicetai patiria ekstremalius efektus ir išlieka tik atsparių rūšių kamienai. Nustatant mikromicetų koncentracijas naudojome ir terpes celiuliaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų koncentracijos įvertinimui bei aktyvių kamienų atrankai. Naudojome Mandels mitybinę terpę su vieninteliu anglies šaltiniu – fosforo rūgštimi brinkinta celiulioze arba karboksimetoceliulioze (KMC). Iš vieno gramo (arba 1 ml) tiriamo substrato išskiriamų mikromicetų koncentracija terpėje su gliukoze svyravo nuo 2 tūkstančių KSV sedimentacijos rezervuare iki 84.7 tūkstančių KSV nuotekų dumble (16 pav., A). Mandels terpėje su celiuliozės priedais galėjo augti tik gebantys hidrolizuoti celiuliozę mikromicetai. Mikromicetų koncentracija terpėje su KMC svyravo nuo 0.34 iki 14.7 tūkstančių KSV / g pavyzdžio, o terpėje su fosforo rūgštimi brinkinta celiulioze – nuo 0.18 iki 13.7 tūkstančių KSV / g pavyzdžio. Koncentracijos patikimai ($p < 0.02$) skyrėsi nuo mikromicetų koncentracijos terpėje su gliukoze. Ženkliai skyrėsi ($P < 0.01$) mikromicetų gausa makulatūroje, pirminiame dumble, biologinio apvalymo rezervuare ir po 5 metų ekspozicijos sedimentacijos rezervuare nuo jų gausos kituose tirtuose substratuose.

Nepaisant didelių mikromicetų, išskiriamų iš celiuliozės substratų antrinio perdirbimo metu, koncentracijų, gebančių utilizuoti celiuliozę tyrimo sąlygomis kiekis nebuvo didelis (16 pav., A).

Celiuliazinių kamienų santykis bendroje išskirtų mikromicetų koncentracijoje buvo nedidelis ir sudarė nuo 0.6 iki 5.67% bendro kiekio (16 pav., B). Didžiausios celiuliazinių kamienų koncentracijos nustatytos popieriaus žaliavoje po pirminio ir antrinio atrinkimo ir pirminiame dumble (atitinkamai nuo 8 iki 14.6 tūkstančių KSV, nuo 13.7 iki 14.7 tūkstančių KSV ir nuo 6.8 iki 9.6 tūkstančių KSV/g (arba ml) tiriamo pavyzdžio). Išanalizuotas mikromicetų kamienų, gebančių vystytis terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu celiulioze, skaičius ir bendras išskirtų mikromicetų kamienų skaičiaus santykis (16 pav., B). Akivaizdžiai matome tiriamo substrato (celiuliazinio substrato masės, dumblo ar vandens) įtaką mikromicetų bendrijai jame ir celiuliaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų kamienų skaičiui. Celiuliozės substratai, kaip ir laukėme, sudarė sąlygas išlikti gebantiems ją pasisavinti



16 pav. Gyvybingų mikromicetų kamienų koncentracija (A, CFU) nustatyta Mandels terpėje su gliukoze (MT+GI), Mandels terpėje su karboksimetilceliulioze (MT+KMC) ir Mandels terpėje su fosforo rūgštimi brinkinta filtrinio popieriaus celiulioze (MT+FP). Tyrimo substratai: celiuliozės atliekų žaliava (No 1), atliekų žaliava po pirminio grubaus rūšiavimo (No 2), žaliava po antrinio rūšiavimo (No 3), celiuliozės masė (šlamas) po išgryninimo (No 4), pirminis gamybos nuotėkų dumblas (No 5), nuotėkų vanduo iš biologinio apvalymo rezervuaro (No 6), nutekamasis vanduo po pusės metų ekspozicijos sedimentacijos rezervuare (No 7) ir po 5 metų ekspozicijos sedimentacijos rezervuare. Rezultatai vidurkis 4–7 kiekvieno tiriamo pavyzdžio ėminių vidurkis.

mikroorganizmams, kurių koncentracija mažėja akivaizdžiai tirtuose substratuose (dumblo ir nuotėkų vandens ėminiuose), kuriuose palankaus substrato skurdu, o cheminiai junginiai, naudojami antrinio perdirbimo proceso metu sąlygoja kitų, atsparių tokiems veiksniams mikromicetų išlikimą. Celiuliozės tirtuose substratuose celiuliazinių mikromicetų koncentracija patikimai ($P < 0.01$) didesnė nei kituose tirtuose ėminiuose, o tai rodo, kad net ir nepalankiomis

(perdirbimo) sąlygomis adaptuoti šiam substratui mikromicetai išlieka gyvybingi ir sintetina substrato utilizavimui reikalingus fermentus. Reikia pastebėti, kad didelės mikromicetų koncentracijos pradinėje celiuliozės atliekų medžiagoje sudaro bendro užkrato mikromicetus. Bendro užkrato mikromicetų gausa sąlygojo kai kuriuos mikromicetų komplekso ištyrimo ir celiuliazinių kamienų atrinkimo nesklaidumus. Pašaliniai, greitai augantys laboratorinėmis sąlygomis mikromicetų kamienai užgožė svarbesnius šio tyrimo tikslų siekimui mikromicetus. Todėl kai kurių mikromicetų kamienus reikėjo perkelti į selektyvias terpes ir juos papildomai iširti. Tiriant kai kuriuos substratus, celiuliazinių mikromicetų koncentracija, t. y. jų koncentracija terpėje su celiulioze, buvo ženkliai didesnė nei terpėje su gerai pasisavinamu anglies šaltiniu gliukoze (16 pav., B). Jau paruoštos masės (šlamo) iki apvalymo ir po išgryninimo ėminiuose bendra mikromicetų koncentracija tiriant Mandels terpėje su KMC buvo atitinkamai 14.7 ir 13.7 tūkstančių KSV/g ėminio (16 pav., A) ir sudarė atitinkamai 118.07% ir 110.44% bendro iškirtų mikromicetų kamienų skaičiaus (16 pav., B). Tų pačių dviejų tyrimo substratų mikromicetų koncentracija terpėje su brinkinta celiulioze atitinkamai buvo 9.6 ir 6.6 tūkstančiai KSV/g ėminio, ir jie sudarė atitinkamai 155.64% ir 106.45% bendro išskirtų kamienų skaičiaus. Tokį skirtumą galima paaiškinti kai kurių greitai augančių mikromicetų rūšių kamienų (*Mucor*, *Rhizopus* ir kt.) nebuvimu pasėliuose celiuliozės terpėje.

Karboksümetilceliuliozė buvo palankesnis anglies šaltinis terpėje analizuojant celiuliazinių mikromicetų kamienų koncentraciją ir atrenkant aktyvesnius jų kamienus nei fosforo rūgštimi brinkinta celiuliozė. Pavyzdžiui, išskiriant mikromicetus iš celiuliozės štamo jų koncentracija (KSV/g ėminio) buvo patikima, ($p < 0.05$) kai išskirimui naudojome mitybinę terpę su KMC. Iš aštuonių skirtinguose celiuliozės atliekų perdirbimo proceso etapuose surinktų pavyzdžių išskyrėme 412 mikromicetų kamienų, kurie po identifikacijos priskirti 37 rūšims ir varietetams, bei 11 neidentifikuotų (nesporuliuojančių) formų. Mikromicetų sąrašė buvo 6 *Aspergillus* P. Micheli ex Link genties, 8 *Penicillium* Link genties, 3 *Mortierella* Coem. genties, po 2 kiekvienos – *Gliocladium* Corda, *Trichoderma* Pers. ir *Mucor* Fresen. genčių mikromicetų rūšis, ir po vieną rūšį iš kiekvienos – *Acremonium* Link, *Arthrobotrys* Corda, *Botryotrichum* Sacc. & Marchal, *Cladosporium* Link, *Chaetomium* Kunze, *Epicoccum* Link, *Geomyces* Traaen, *Fusarium* Link, *Gliomastix* Guég., *Lecanicillium* W. Gams & Zare, *Paecilomyces* Bainier, *Stachybotrys* Corda, ir *Sporotrichum* Link genties. Nustatyti 269 mikromicetų kamienai, gebantys pasisavinti ir vystytis kai terpėje yra vienintelis anglies šaltinis – celiuliozė. Mikromicetų rūšys aprašytos sekančioje rezultatų nagrinėjimo dalyje (6.2) 3 lentelėje. *Penicillium funiculosum* (aktyvių kamienų procentas 27.1%), *P. simplicissimum* (15.7%), *Stachybotrys chartarum* (7.5%) ir *Aspergillus repens* (4.7%) rūšių kamienai sudarė pagrindinį aktyvių celiuliozės atžvilgiu kamienų sąrašą.

6.2. II SKYRIUS. Mikromicetų gebėjimas vystytis terpėse su vieninteliu anglies šaltiniu celiulioze arba chitinu

6.2.1. Gebėjimas pasisavinti celiuliozę

Pirmame tyrimų etape, išskiriant iš dirvožemio mikromicetų kamienus, naudojant terpes su celiuliozės priedais, buvo atrinkti aktyvesnių mikromicetų kamienai ir ištirtas jų santykinis aktyvumas KMC atžvilgiu. Santykinis atrinktų dirvožemio mikromicetų kamienų aktyvumas charakterizuojamas skaidrios zonos, susidarančios apie KMC terpėje augančio mikromiceto koloniją ir kolonijos diametro santykiu (Bradner ir kt., 1999), aprašytas 5 lentelėje.

5 lentelė. Iš dirvožemio išskirtų mikromicetų kamienų santykinis celiuliazinis aktyvumas terpėje su KMC priedu (I_{KMC} = skaidrios zonos plotis/kolonijos diameteras).

Mikromicetas	Kamienas	I_{KMC}
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc. & Troter (= <i>Mycocladus corymbifera</i> (Cohn) J.H. Mirza)	DPK-65	0.56 ± 0.02
	DPK-37	0.79 ± 0.05
	DPK-10	0.27 ± 0.03
<i>Arthinium phaeospermum</i> (Corda) M.B. Ellis	DPK-30	0.91 ± 0.11
	DPK-32	1.88 ± 0.21
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	DPK-cl-6	1.63 ± 0.07
	DPK-cl-7	1.36 ± 0.16
	DPK-cl-8	1.07 ± 0.14
<i>A. niger</i> var. Niger Tiegh.	DPK-cl-9	1.49 ± 0.08
	DPK-cl-12	2.58 ± 0.13
	DPK-cl-13	1.22 ± 0.23
	DPK-cl-14	1.04 ± 0.19
<i>A. terreus</i> Thom	DPK-cl-07	1.37 ± 0.17
	DPK-cl-08	2.11 ± 0.20
	DPK-cl-02	0.87 ± 0.06
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	DPK-cl-01	0.73 ± 0.04
	DPK-60	1.37 ± 0.11
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link <i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	DPK-cl-4	1.03 ± 0.05
	DPK-cl-5	1.52 ± 0.13
	DPK-cl-2	1.01 ± 0.03
	DPK-cl-1	1.24 ± 0.14
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> (J.C. Gilman & E.V. Abbott) Schroers	DPK-cl-3	1.34 ± 0.13
	DPK-cl-16	1.56 ± 0.24
<i>Epicoccum nigrum</i> Link (= <i>E. purpurescens</i> Ehrenb.)	DPK-cl-17	1.04 ± 0.18
	DPK-cl-18	0.93 ± 0.03
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdt.	DPK-cl-19	1.76 ± 0.07
	DPK-21	1.21 ± 0.20
	DPK-09	1.43 ± 0.17
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. (= <i>Nectria haematococca</i> Berk. & Broome)	DPK-103	0.95 ± 0.05
	DPK-87	0.68 ± 0.02
<i>Geomyces pannorum</i> (Link) Singler & J.W. Carmich. (= <i>Chrysosporium pannorum</i> (Link) S. Hughes)		
	DPK-cl-22	1.30 ± 0.03
<i>Geotrichum candidum</i> Link		

<i>Gibberella avenacea</i> R. J. Cook (= <i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.)	DPK-37	1.10 ± 0.11
<i>Gliocladium virens</i> J.H. Mill, Giddens & A.A. Foster (= <i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx)	DPK-cl-26	1.41 ± 0.07
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>murorum</i> (Corda) S. Hughes) (= <i>Acremonium murorum</i> (Corda) W. Gams)	DPK-cl-27	1.20 ± 0.13
	DPK-cl-41	1.66 ± 0.24
<i>Lecaniocillium lecanii</i> (Zimm.) Zare & W. Gams (= <i>V. lecanii</i> (Zimm.) Viégas)	DPK-cl-43	1.82 ± 0.06
<i>Mucor mucedo</i> Fresen.	DPK-cl-44	1.97 ± 0.13
<i>Mucor racemosus</i> Fresen.	DPK-25	0.66 ± 0.03
<i>Myrothcium verrucaria</i> (Alb. & Schwen.) Ditmar	DPK-m-11	0.46 ± 0.04
	DPK-m-62	0.71 ± 0.11
	DPK-cl-36	1.24 ± 0.04
<i>M. roridum</i> Tode	DPK-cl-38	1.43 ± 0.13
	DPK-cl-39	1.30 ± 0.20
<i>Nectria inventa</i> Pethybr.	DPK-042	1.01 ± 0.09
<i>Nectria radicola</i> Gerlach & L. Nilson	DPK-053	0.91 ± 0.11
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	DPK-021	1.12 ± 0.08
	DPK-014	1.27 ± 0.22
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	DPK-cl-62	1.36 ± 0.17
	DPK-cl-29	1.57 ± 0.15
	DPK-321	1.48 ± 0.11
<i>P. verruculosum</i> Peyronel	DPK-256	1.37 ± 0.18
	DPK-cl-66	1.85 ± 0.16
<i>P. decumbens</i> Thom	DPK-cl-64	1.50 ± 0.20
<i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	DPK-cl-63	1.37 ± 0.03
	DPK-cl-60	1.20 ± 0.06
<i>Rhizomucor miehei</i> (Cooney & R. Emers.) Schipper	DPK-cl-61	1.10 ± 0.14
<i>Trichosporon sporotrichioides</i> (Oorschot) Oorschot & de Hoog (= <i>Trichosporiella sporotrichioides</i> Kamyschko)	DPK-cl-59	1.06 ± 0.20
	DPK-m-99	0.41 ± 0.03
<i>Trichocladium asperum</i> Harz	DPK-cl-53	1.37 ± 0.11
	DPK-cl-50	1.42 ± 0.02
<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai	DPK-b-03	1.68 ± 0.08
	DPK-b-04	1.50 ± 0.04
<i>T. hamatum</i> (Bonord.) Bainier	DPK-b-6	0.99 ± 0.11
	DPK-b-21	1.00 ± 0.04
<i>T. harzianum</i> Rifai	DPK-b-19	1.21 ± 0.21
	DPK-b-01	0.80 ± 0.01
	DPK-b-32	0.96 ± 0.03
<i>T. longibrachiatum</i> Rifai	DPK-b-8	1.14 ± 0.02
	DPK-b-10	0.78 ± 0.05
<i>T. viride</i> Pers.	DPK-b-7	0.83 ± 0.11
	DPK-b-9	1.20 ± 0.06
	DPK-b-31	1.32 ± 0.12
	DPK-b-30	0.89 ± 0.02
<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex J. Gchröt	DPK-m-14	0.56 ± 0.06
<i>Ulocladium chartarum</i> (Preuss) E.S. Simmons	DPK-111	1.11 ± 0.10
<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Bertholdi	DKP-v-30	1.30 ± 0.04
<i>V. chlamydosporum</i> var. <i>catenulatum</i> (Kamyschko ex Onions & G.L. Barron) W. Gams	DPK-v-24	0.87 ± 0.03

Rūšių skaičiumi, kurių kamienai rasti kaip aktyvūs celiuliozės destruktoriai, dominuoja *Trichoderma* ir *Penicillium* gentis. Pirmoji gentis yra jau gerai ir tradiciškai žinoma kaip celiuliozę transformuojančių mikromicetų gentis, antroji labiausiai dirvožemiuose išplitusių

grybų gentis, todėl neatsitiktinai ir mūsų tyrimuose išryškėja jų dominavimas šio tyrimo sąlygomis nagrinėjant celiuliozės utilizavimą. Nors tyrėme tik du dirvožemius, tačiau aktyvių celiuliazinių mikromicetų išskyrėme visą rinkinį, kuriame yra gerai žinomų ir jau tiriamų dėl celiuliazijų sintezės rūšių, tokių kaip *Aspergillus niger*, *Fusarium*, *Myrothecium* ir *Trichoderma* genčių rūšių grybai.

Tarp išskirtų aktyvių mikromicetų mūsų tyrimo rezultatų pagrindu atsiranda *Absidia*, *Cunninghamella* ir *Rhizomucor* genčių kamienai. Šios gentys kaip ir daugelis *Zygomycetes* klasės grybų genčių priskiriamos nepasižyminčių celiuliaziniu aktyvumu grybų sąrašui. Remiantis literatūroje randama informacija iš 700 *Zygomycetes* rūšių tik *Mucor* genties atstovai minimi kaip potencialūs celiuliazijų producentai, o kiti aprašomi kaip geri įvairių tirpių organinių junginių utilizatoriai (Lynd ir kt., 2002). Tačiau šie mikromicetai tiriami mažai ir dėl greito jų kolonijų susidarymo yra pakankamai nelengvai testuojami, todėl gauta tyrimų informacija lieka diskusijos ribose. Atlikus detalesnius tyrimus mūsų tyrimo metu nustatytų aktyvių mikromicetų kamienų sąrašuose (2–4 lentelės) atsiranda ir *Zygomycetes* klasės atstovai, tokie kaip *Absidia corymbifera* ir *Mucor racemosus* ir *Cunninghamella echinulata* (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee kamienai taip pat rasti kaip aktyvūs, tačiau aktyvumas užfiksuotas tik nedaugeliui *C. echinulata* rūšies kamienų ir mikromicetas į aktyvių mikromicetų sąrašą neįtrauktas. *Acremonium strictum* W. Gams, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (= *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas)) ir kai kurie *Aspergillus* ir *Penicillium* genčių kamienai taip pat neaprašomi dėl mažo aktyvumo procento bendrame rūšies išskirtų kamienų skaičiuje.

Iš antropogeninių šio tyrimo metu tirtų substratų išskirti aktyvesni mikromicetų kamienai ir jų santykinio celiuliazinio aktyvumo tyrimo rezultatai aprašyti 6 lentelėje.

Išanalizavus mikromicetų kamienus, išskirtus antrinio celiuliozės atliekų perdirbimo proceso substratų, rastos mikromicetų rūšys yra priskirtos dirvožemio mikromicetams (6 lentelė) ir dauguma jų pasižymi artimu celiuliaziniu aktyvumu kaip ir mikromicetai, kuriuos išskyrėme iš dirvožemio (5 lentelė).

6 lentelė. Celiuliaziniai mikromicetų kamienai atrinkti tiriant celiuliozės atliekų antrinio perdirbimo substratus (procentinė sudėtis) ir jų celiuliazinis aktyvumas įvertintas pagal santykinį aktyvumą (I_{KMC} , pagal Bradner ir kt., 1999).

Mikromicetų rūšys	Jų dalis (%) išskirtų celiuliazinių kamienų skaičiuje	Testuotų KMC terpėje kamienų skaičius	(I_{KMC})
<i>Acremonium strictum</i> W. Gams	0.8	6	1,32 ± 0,08
<i>Arthrobotrys oligospora</i> Fresen.	0.2	2	0,42 ± 0,03
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen	0.6	4	0,73 ± 0,04
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> Tiegh.	2.1	8	2.21 ± 0,97

<i>Aspergillus repens</i> (Corda) Sacc.	4.7	9	1,54 ± 0,54
<i>Botyrotichum piluliferum</i> Sacc. & Marchal	0.9	2	0,97 ± 0,11
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	1.5	5	0,97 ± 0,07
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	0.5	2	0.88 ± 0.04
<i>Geomyces pannorum</i> (Link) Singler & J.W. Carmich. (= <i>Chrysosporium pannorum</i> (Link) S. Hughes)	1.3	6	1.29 ± 0.31
<i>Epicoccum nigrum</i> Link (= <i>E. purpurescens</i> Ehrenb.)	0.2	3	0.89 ± 0.45
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdt.	2.1	2	1.31 ± 0.27
<i>Geotrichum candidum</i> Link	0.5	1	0.83 ± 0.14
<i>Gliocladium roseum</i> Bainier (= <i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	1.4	3	1.37 ± 0.25
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>murorum</i> (Corda) S. Hughes) (= <i>Acremonium murorum</i> (Corda) W. Gams)	3.6	8	2.07 ± 0.85
<i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimm.) Zare & W. Gams (= <i>V. lecanii</i> (Zimm.) Viégas)	0.7	4	0.66 ± 0.03
<i>Mucor racemosus</i> Fresen.	0.1	1	0.28 ± 0.02
<i>Myrothecium verrucaria</i> (Alb. & Schwen.) Ditmar	1.1	2	1.04 ± 0.26
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	1.9	3	1.62 ± 0.75
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	16.2	11	1.31 ± 0.14
<i>Penicillium fellutanum</i> Biourge	3.5	4	0.54 ± 0.22
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	21.1	12	1.87 ± 0.13
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll	5.9	5	1.45 ± 0.21
<i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	15.7	13	1.11 ± 0.04
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	4.3	7	1.00 ± 0.12
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	1.6	4	0.98 ± 0.04
<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenb.) S. Hughes	7.5	6	1.85 ± 0.23

Tačiau reikia pastebėti, kad dalis mikromicetų rūšių antropogeniškuose substratuose buvo dominuojantys, o dirvožemyje, nepaisant jų priskirtinumo dirvožemio mikroorganizmams, nebuvo rastos šio tyrimo metu. Tokiems priklausė *Arthrobotrys oligosporum*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium fellutanum* ir *Stachybotrys chartarum*. Labai gausu ir gausiau nei dirvožemyje rasta *Aspergillus niger*, *Chaetomium* spp., *Glimastix murorum* var. *muromum* ir *Penicillium funiculosum* kamienų, kurių santykinis celiuliazinis aktyvumas buvo didesnis nei daugumos tirtų kamienų.

Tolesniam tyrimui atrinkome mikromicetų kamienus iš abiejų – dirvožemio ir antropogeninių substratų tyrimo etapų ir atlikome detalesnius tyrimus, lygindami jų santykinis celiuliazinius aktyvumus, augindami dviejose skirtingose terpėse – mineralinių druskų terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu fosforo rūgštimi brinkinta celiulioze (FRBC) arba karboksimetilceliulioze (KMC).

7 lentelė. Kai kurių mikromicetų rūšių, kurių kamienai atrinkti kaip potencialūs celiuliazinių producentai, santykinio aktyvumo fosforo rūgštimi brinkintos celiuliozės (FRBC) ir karboksimetilceliuliozės (KMC) atžvilgiu vidurkis terpėse su šių polisacharidų priedais.

Mikromicetų rūšys	Tirtų kamienų skaičius	Santykinio aktyvumo indeksai	
		I _{FRBC}	I _{KMC}
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc. & Troter (= <i>Mycocladus corymbifera</i> (Cohn) J. Mirza)	6	0.56 ± 0.21	0.87 ± 0.08
<i>Arthrinium phaeospermum</i> (Corda) M. B. Ellis	8	0.62 ± 0.19	0.91 ± 0.10
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> Tiegh.	6	1.56 ± 0.24	2.08 ± 0.39
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	3	0.92 ± 0.07	1.62 ± 0.04
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	4	0.37 ± 0.03	0.43 ± 0.04
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	13	1.11 ± 0.11	1.39 ± 0.08
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	2	0.49 ± 0.04	0.67 ± 0.03
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	9	1.40 ± 0.13	1.81 ± 0.24
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> (J.C. Gilman & E.V. Abbott) Schroers	3	0.97 ± 0.03	1.25 ± 0.13
<i>Chrysosporium pannorum</i> (Link) S. Hughes	8	1.00 ± 0.02	1.03 ± 0.03
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdt.	5	1.58 ± 0.10	1.16 ± 0.08
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. (= <i>Nectria haematococca</i> Berk & Broome)	4	1.23 ± 0.09	1.48 ± 0.12
<i>Humicola grisea</i> Traaen	2	1.07 ± 0.02	1.02 ± 0.05
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>murorum</i> (Corda) S. Hughes	3	1.46 ± 0.21	1.89 ± 0.31
<i>Myrothecium verrucaria</i> (Alb. & Schwen.) Ditmar	6	1.02 ± 0.07	1.73 ± 0.04
<i>Mucor racemosus</i> Fresen.	5	0.73 ± 0.04	0.98 ± 0.02
<i>Nectria inventa</i> Pethybr.	11	0.82 ± 0.04	1.00 ± 0.03
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	15	0.67 ± 0.21	1.33 ± 0.25
<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge	18	1.22 ± 0.11	1.88 ± 0.12
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling	6	1.02 ± 0.08	1.52 ± 0.03
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	12	0.98 ± 0.03	1.63 ± 0.04
<i>Trichocladium asperum</i> Harz	6	1.53 ± 0.28	2.24 ± 0.25
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	3	0.95 ± 0.31	0.96 ± 0.24
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	7	0.82 ± 0.14	0.89 ± 0.09
<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (= <i>Gliocladium virens</i> J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster)	4	0.78 ± 0.06	0.99 ± 0.13

Kaip ir pirminio atrinkimo bendro pasėlio terpėse, vertinant pagal terpės išskaidrėjimo intensyvumą, taip ir tiriant potencialių celiuliazinių mikromicetų kamienų grynas kultūras skirtingos celiuliozės terpėse, aktyvumo skirtumai priklauso ir nuo rūšies savybių, ir nuo kamieno savitumų. Norėdami palyginti skirtingas mikromicetų rūšis pagal jų celiuliazinio aktyvumo lygį, rėmėmės vidutinėmis santykinio aktyvumo vertėmis (7 lentelė).

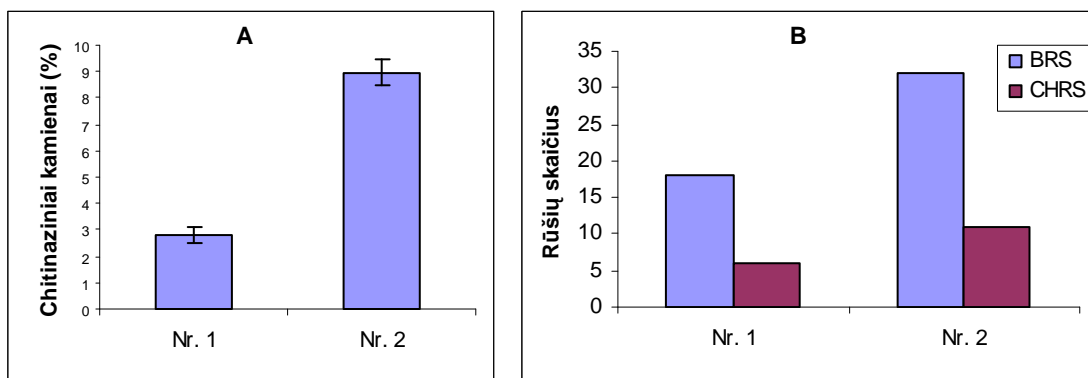
Dvylikos mikromicetų rūšių kamienų santykinio celiuliacinio aktyvumo vidurkis buvo > 1, o kitų rūšių mikromicetų vidutinis santykinis aktyvumas buvo ≤ 1. Daugumos rūšių

mikromicetų santykinis aktyvumas KMC atžvilgiu buvo didesnis nei FRBC atžvilgiu. Patikimai ($P < 0.05$) didesnės santykinio celiuliazinio aktyvumo vertės nustatytos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Gliomastix murorum* var. *murorum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium* ir *Trichoderma* spp. mikromicetų kamienams. Šių rūšių mikromicetai yra žinomi celiuliazijų producentai ir jų tyrimo rezultatai aprašomi literatūroje (Enari, 1983; Klyosov, 1990; Lyndt ir kt., 2002). Nevienodas santykinio aktyvumo intervalas kiekvienos rūšies ribose, tačiau didžiausi skirtumai užfiksuoti analizuojant *Absidia*, *Arthrinium* ir *Trichoderma* genčių kamienus. Šių genčių mikromicetai auga labai greitai, o jų biomasės tankis priklauso nuo mitybinės terpės sudėties ir joje esančio anglies šaltinio. Dėl greitai besivystančios kolonijos parametrų ir celiuliazės įsisavinimo greičio neatitikimo sudėtinga nustatyti šių genčių mikromicetų santykinį celiuliazinį aktyvumą šio metodo sąlygomis.

6.2.2. Gebėjimas pasisavinti chitiną

Ištyrėme gebančių utilizuoti chitiną, kai terpėje buvo vienintelis anglies šaltinis koloidinis chitinas, dirvožemio mikromicetų kamienų procentą bendroje išskirtų iš dirvožemio mikromicetų koncentracijoje. Atlikus preliminarius atrankos tyrimus pagal sunaudojamą terpės koloidinį chitiną ir terpės išskaidrėjimą, galėjome atrinkti aktyvesnius chitino atžvilgiu kamienus ir po jų identifikavimo, priskirti juos vienai ar kitai rūšiai. Kadangi chitinaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų tyrimui buvo skiriama mažiau dėmesio, aprašome tik preliminarius rezultatus tyrimo, reikalingo tik aktyvių kamienų atrinkimui. Chitinazinių kamienų skaičius buvo gerokai mažesnis nei celiuliaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų kamienų skaičius tiriamų dirvožemių ėminiuose. Organinėmis medžiagomis skurdžiame dirvožemyje chitiną utilizuojančių mikromicetų kamienų buvo mažiau nei humusingame dirvožemyje (17 pav., A).

Pirmajame chitiną utilizuojantys kamienai tesudarė 2.7% bendrame išskirtų mikromicetų kamienų skaičiuje, antrame jų buvo daugiau – 8.4%. Skyrėsi ir mikromicetų rūšinė įvairovė bei joje rastų chitiną utilizuojančių mikromicetų rūšių skaičius (17 pav., B). Organinėmis medžiagomis skurdžiame dirvožemyje tarp 18 aprašytų mikromicetų rūšių chitinaziniu aktyvumu pasižymėjo 6 rūšių kamienai, tuo tarpu tarp 32 mikromicetų rūšių aprašytų humusingame dirvožemyje 11 rūšių kamienų įvertinti kaip chitinaziniai. Chitinaziniu aktyvumu pasižymėjo dauguma *Trichoderma* genties kamienų, beveik visi *Paecilomyces* ir *Arthrobotrys* genčių kamienai, o aktyviausi buvo *Metarhizium* ir *Beuaveria* genčių mikromicetai.



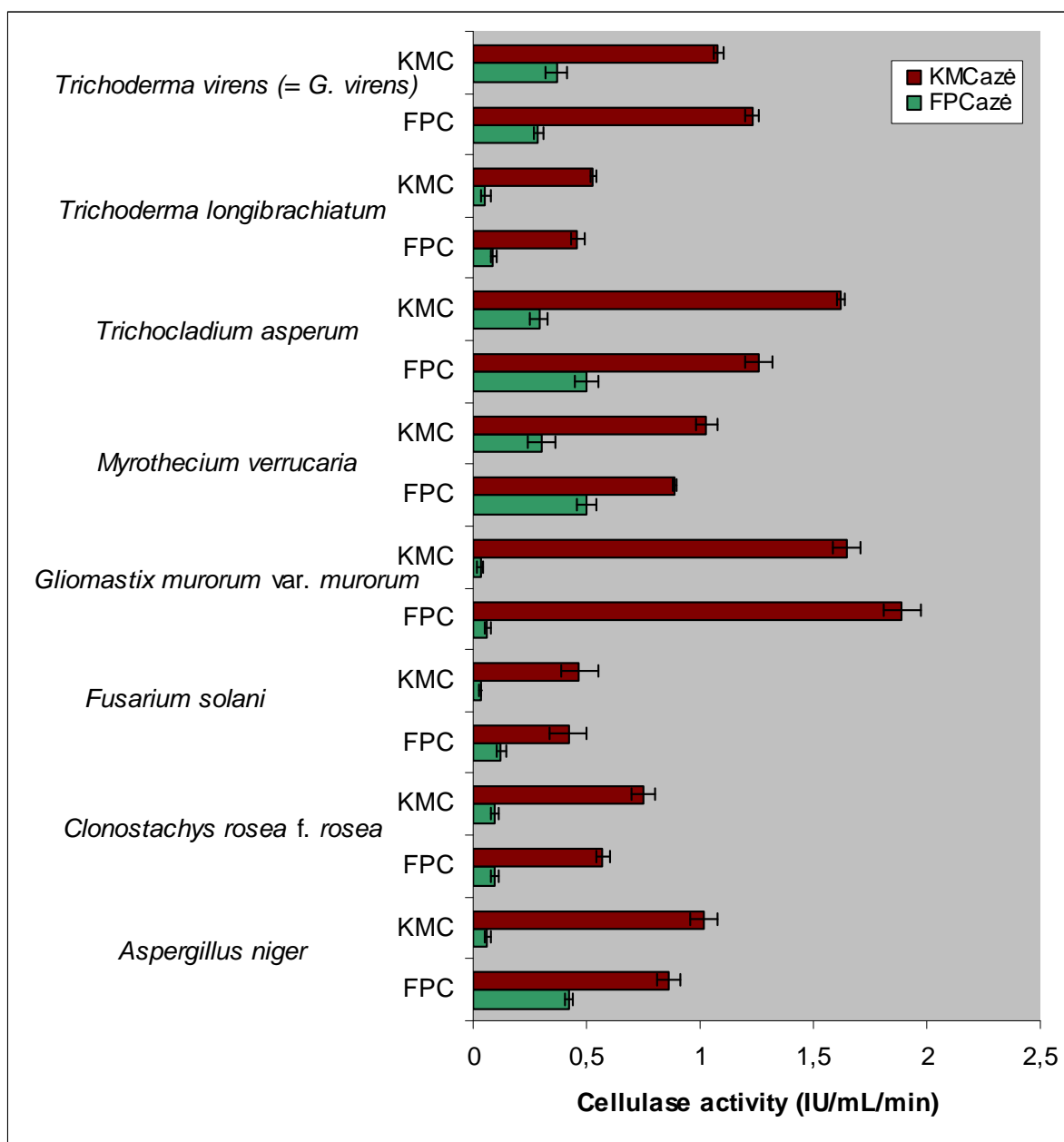
17 pav. Gebančių vystytis ir utilizuoti chitiną mikromicetų kamienų procentas (A) bendroje išskirtų mikromicetų koncentracijoje ir bendro išskirtų rūšių skaičiaus ir chitiną utilizuojančių mikromicetų rūšių skaičiaus palyginimas (B). Nr. 1 – smėlingas, Nr. 2 – humusingas dirvožemiai; BRS – bendras rūšių skaičius, CHRS – chitinaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų rūšių skaičius.

6.3. III SKYRIUS. *Celiuliozės ir chitino hidrolizės fermentai*

6.3.1. *Celiuliozės hidrolizė* – Endogliukanazinis (karboksimetil celiuliazinis – KMCazinis) ir filtrinio popieriaus celiuliazinis (FPC) aktyvumai

Dvylika atrinktų aktyvių mikromicetų kamienų buvo ištirti auginant juos skystoje Čapeko druskų terpėje su 4 g/l susmulkinto filtrinio popieriaus arba 4 g/l KMC. Po 14 parų kultivavimo, tyrėme auginimo terpėje išskirtos celiuliazės aktyvumą. Matavome endogliukanazinį aktyvumą (KMCazinį) reakcijos mišinyje naudodami tirpią celiuliozę – 2% KMC (Ghose, 1987) ir filtrinio popieriaus celiuliazinį aktyvumą, reakcijos mišinyje naudodami filtrinį popierių (0.5 mg FP juostelę). Filtrinio popieriaus celiuliazinis aktyvumas yra kelių fermentų – endogliukanazės, celobiohidrolazės ir β -gliukozidazės veikimo visuma sinergistinis veikimas (Wu ir kt., 2005). Celiuliazinių fermentų aktyvumą nustatėme pagal reakcijos metu susidariusios gliukozės koncentraciją, kurią matavome DNS rūgšties reagento metodu. Gautų celiuliazinių tyrimo rezultatai charakterizuojantys tirtus mikromicetų kamienus pateikti 18 paveiksle. Visų tirtų mikromicetų kamienų (išskyrus *Stachybotrys chartarum* DPK-cl-111 kamieną) bendras celiuliazinis aktyvumas (FPCazinis aktyvumas) buvo mažesnis nei endogliukanazinis aktyvumas. Bendro celiuliazinio aktyvumo ištyrimas yra sunkesnis, nes netirpi celiuliozė (mūsų atveju filtrinis popierius) yra sunkiau hidrolizuojama nei tirpi celiuliozė – KMC. Didžiausias šių dviejų celiuliazinių skirtumas nustatytas mikromicetų *Stachybotrys chartarum* DPK-cl-100, *Penicillium funiculosum* DPK-cl-19 ir *Gliocladium roseum* DPK-cl-102 kamienams. Matomai, kaip ir daugelio *Trichoderma* genties kamienų atveju (kaip aprašo Gruno ir kt., 2004) šių grybų celiuliazinių sistema neturi celobiazės, skaldančios disacharidus. Celobiozės neskaldomi disacharidai slopina celiuliozės hidrolizės procesą. Mikromiceto *Aspergillus niger*

DPK-cl-12 KMCazės aktyvumas buvo didžiausias ($P < 0.01$) lyginant su kitų dvylikos ištirtų mikromicetų kamienų endogliukanazės aktyvumu.



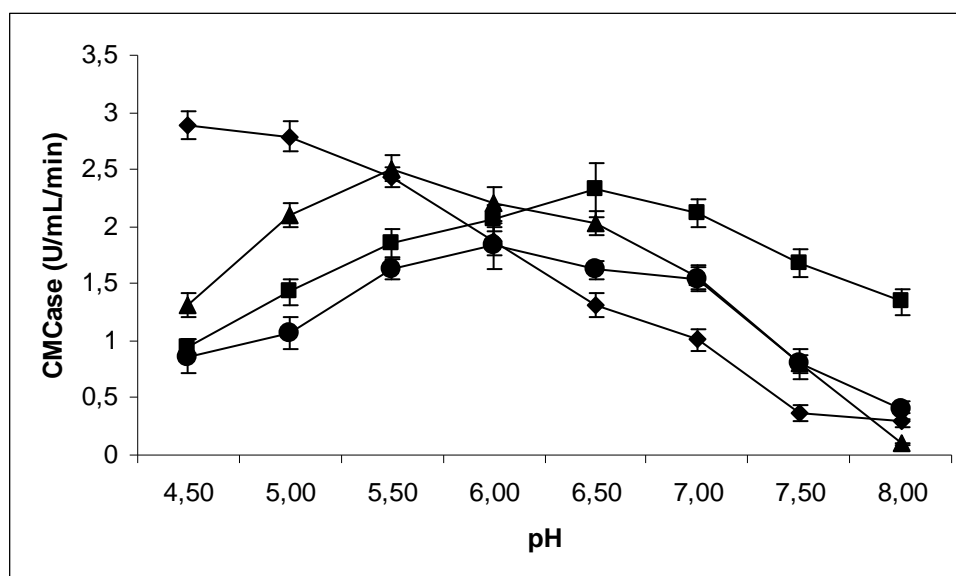
18 pav. Egzolaštelinės endogliukanazės (karboksimetilceliuliazės – KMCazė) ir bendro celiuliazinio aktyvumo – filtrinio popieriaus celiuliazės (FPCazė), aktyvumas ($U \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1}$) po 14 parų auginimo Čapeko druskų terpėje su KMC arba smulkintu filtriniu popieriumi (FRC). Rezultatai – vidurkis dviejų bandymų ir dviejų kiekvieno bandymo matavimų.

Panašus endogliukanazės aktyvumas buvo mikromicetų *S. chartarum* DPK-cl-100, *P. funiculosum* DPK-cl-19, *M. verucaria* DPK-cl-06, *G. murorum* var. *murorum* DPK-cl-03 ir *Clonostachys rosea* f. *rosea* (= *G. roseum*) DPK-cl-102, ir svyravo nuo 1.5 iki 2.5 aktyvumo vienetų ($U \cdot mL^{-1}$) (18 pav.). Šių mikromicetų celiuliaziniai aktyvumai šio tyrimo sąlygomis buvo didesni nei *Trichoderma* kamienų DPK-cl-36 ir PK-cl-51. *Trichoderma* genties grybai yra žinomi kaip labai aktyvūs celiuliozės destruktoriai ir perteklinės egzoceliuliazės producentai. *S.*

chartarum ir *Gluiomastix murorum* var. *murorum* kamienai buvo atrinkti iš tų aktyvių mikromicetų kamienų, kurie buvo išskirti iš celiuliozės atliekų, antrinio jų perdirbimo metu. Todėl didesnis šių rūšių kamienų celiuliazinis aktyvumas gali būti aiškinamas didesne adaptacija, tuo labiau, kad išskirti kamienai nebuvo laikomi mikromicetų kolekcijos sąlygomis, o buvo ištirti tuojau pat kai tik buvo išskirti.

Nors daugumos tirtų mikromicetų, kurie buvo atrinkti po pirminės atrankos ir pradinio santykinio celiuliazinio aktyvumo įvertinimo, celiuliaziniai aktyvumai buvo pakankami, kad nustatyti šio tyrimo sąlygomis, ne visi gali būti rekomenduojami kaip egzoceliuliazijų producentai. Tai tik pradiniai tyrimai, reikalaujantys detalesnių pačių fermentų charakteristikų nustatymo. Tarp įdomesnių mikromicetų kamienų, kurie numatomi tolesniam ištyrimui yra *Aspergillus niger*, *Gluiomastix murorum*, *Myrothecium verrucaria*, *Paecilomyces* spp., *Penicillium funiculosum* ir *Stachybotrys chartarum* kamienai. Mūsų tyrimų rezultatai yra palyginami su kitų tyrimų rezultatais, ypač nagrinėjant *Trichoderma* genties grybus (Updegraff, 2004; Kluczek-Turpeinen ir kt., 2005).

Didžiausią aktyvumą ($KMCazės\ aktyvumas = 2.89 \pm 0.12\ U\ mL^{-1} \cdot min^{-1}$) *Aspergillus niger* DPK-cl-12 kamienui 30°C temperatūros sąlygomis nustatėme, kai reakcija vyko pH = 4.5 (19 pav.). Optimalus pH = 5.5 buvo nustatytas mikromiceto *G. murorum* var. *murorum* DPK-cl-44 endogliukanazės aktyvumui, kuris sumažėjo 50% (nuo 2.4 iki 1.2 U/mL), kai pH sumažinus pH iki 4.5 arba padidinus iki 7.0. Optimalus *A. niger* DPK-cl-12 ir *S. chartarum* DPK-cl-111 kamienų endogliukanazei pH buvo atitinkamai 4.5 ir 6.5.



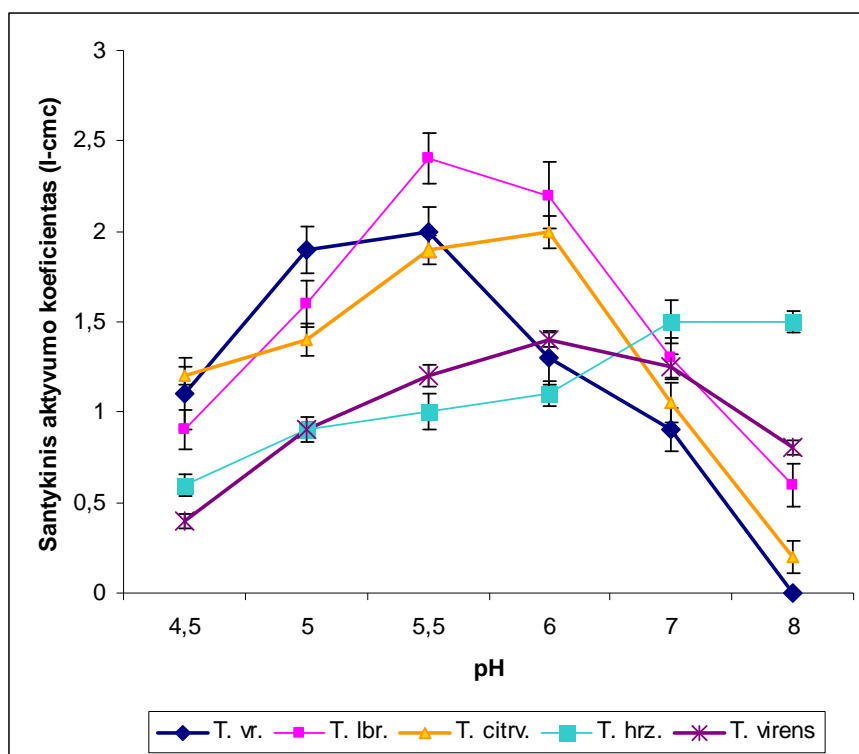
19 pav. Reakcijos mišinio pH įtaka mikromicetų *Aspergillus niger* DPK-cl-12 (◆), *Gluiomastix murorum* var. *murorum* (= *Acremonium murorum*) DPK-cl-44 (▲), *Penicillium funiculosum* DPK-cl-19 (●) ir *Stachybotrys chartarum* DPK-cl-111 (■) KMCazės (Endo-β-1,4-gliukanazės) aktyvumui 30°C temperatūros sąlygomis.

Nors mikromiceto *P. funiculosum* DPK-cl-19 endogliukanazės aktyvumas buvo mažesnis nei kitų trijų mikromicetų kamienų, jam būdinga endogliukanazės stabilumas pH 5.5–7.0 intervale. Pakeitus reakcijos mišinio pH iki 8.0, mikromicetų *A. niger*, *G. murorum* var. *murorum* ir *P. funiculosum* endogliukanazės aktyvumas buvo prarastas, tuo tarpu mikromiceto *S. chartarum* šio pH sąlygomis išliko 50% aktyvumo, o tai parodo, kad šiam mikromicetui būdinga šarminė endogliukanazė. Kaip matome 19 paveiksle aprašytuose rezultatuose, mikromicetų *Gliomastix murorum* var. *murorum* DPK-cl-44, *Penicillium funiculosum* DPK-cl-19 ir *Stachybotrys chartarum* DPK-cl-111 endogliukanazės aktyvumas buvo tris kartus mažesnis už mikromiceto *A. niger* DPK-cl-12 fermentinį aktyvumą. Modeliuodami pH (ir temperatūros) sąlygas, galime surasti ribas, kai tiriamas mikromiceto kamienas produkuoja kelis kartus daugiau egzolaštelinės gliukanazės nei rekomenduojamomis fermentui ištirti sąlygomis.

Reakcijos mišinio pH nevienodai įtakoją ne tik skirtingų genčių mikromicetų kamienų endogliukanazės aktyvumą, bet pastebėjome ir tos pačios genties mikromicetų kamienų skirtingą reakciją. Geriausiai tokią reakciją iliustruoja *Trichoderma* genties mikromicetų kamienų tyrimo rezultatai, pH įtaką vertinant pagal santykinio endogliukanazės aktyvumo matavimą skirtingo pH sąlygomis (20 pav.).

Skirtingo pH terpėse kultivuojamų mikromicetų kolonijų susidarymas ir KMC hidrolizės greitis priklausė nuo mikromicetų rūšies savybių bei tiriamo kamieno savitumų, įgytų adaptuojantis substrate, iš kurio jie buvo išskirti. Plačiame intervale pasiskirstė *Trichoderma* genties mikromicetų kamienų endo-1,4-beta-gliukanazės aktyvumo vertės, parodančios šių mikromicetų gebėjimą hidrolizuoti karboksimetilceliuliozę ir prisitaikyti skirtingo pH sąlygomis. Tos pačios rūšies skirtingų mikromicetų kamienų KMCazinis aktyvumas skyrėsi ir priklausė nuo to, iš kokio substrato (kartono gamybos atliekos, gamybos atliekų utilizacijos tarpiniai produktai, dirvožemis ar augalinės atliekos) jis buvo išskirtas. Optimaliaus pH vertės šiems mikromicetams pasiskirstė gana plačiame 5–7 verčių intervale, išskyrus vieną – *T. harzianum* kamieną, kurio endogliukanazės aktyvumas šiame tyrime naudotų pH intervale maksimalus buvo pH 8.0 sąlygomis.

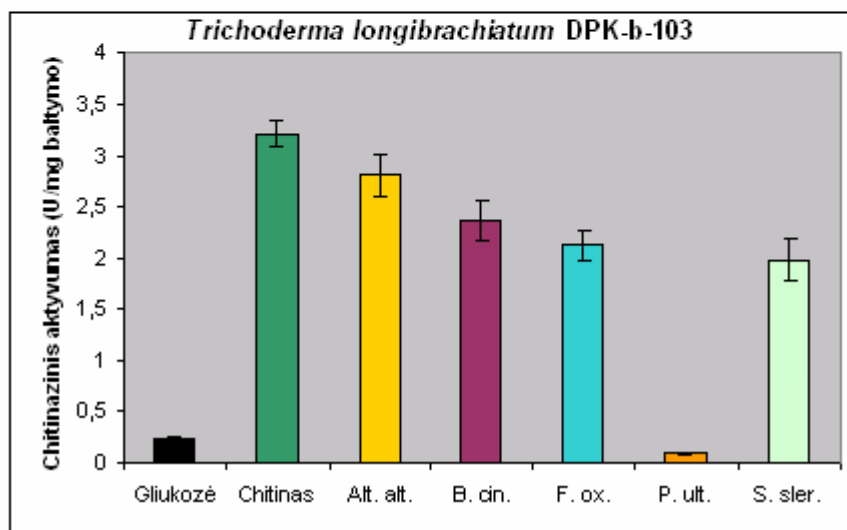
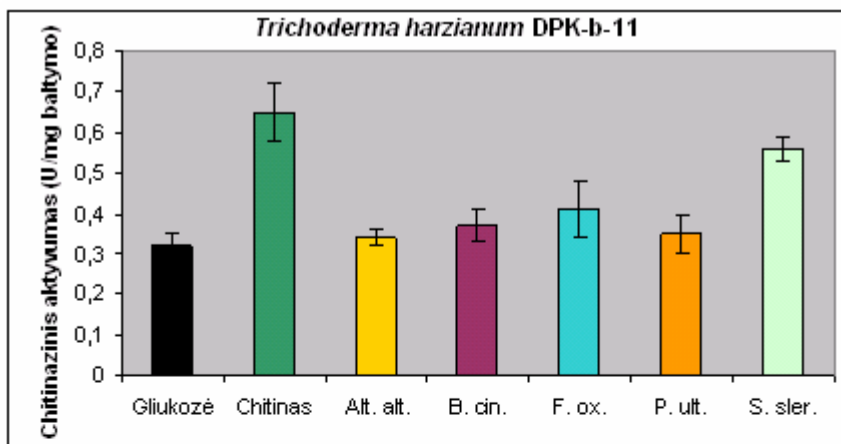
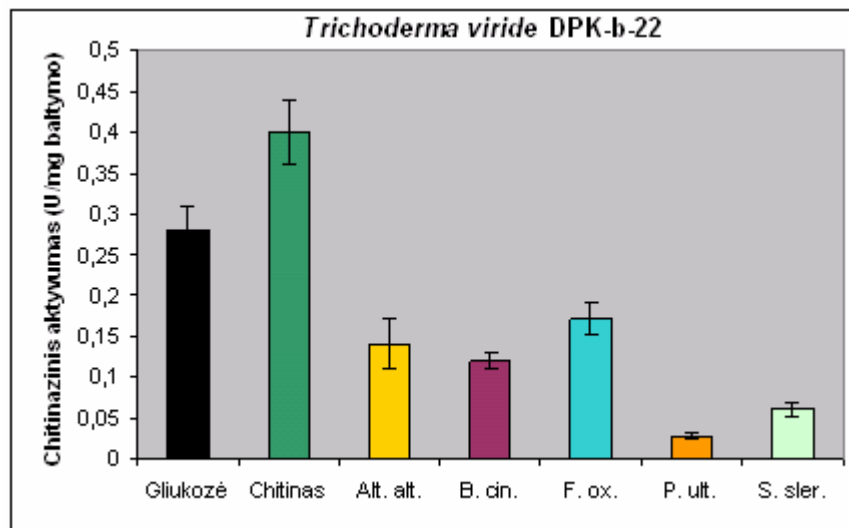
Nežymūs, tačiau tolesniems detalesniems fermentų ištyrimams svarbūs, kiekvieno *Trichoderma* kamieno optimalaus pH intervalo skirtumai išryškėjo šio tyrimo metu (20 pav.). Gerai pastebimas ir endogliukanazės aktyvumo lygio skirtumas lyginant 5 *Trichoderma* genties kamienus. Iš jų, optimaliomis sąlygomis geriausius aktyvumus parodė *T. longibrachiatum*, bei *T. citreoviride* ir *T. viride*. *Trichoderma* genties mikromicetų endo-1,4-β-gliukanazinio aktyvumo skirtumai bei didesnis *T. viride*, *T. longibrachiatum* bei *T. virens* rūšių mikromicetų kamienų aktyvumas minimas Brunner K. ir kt. (2005) darbuose.



20 pav. *Trichoderma* genties kamienų (*T. vir.* – *T. viride*, *T. lbr.* – *T. longibrachiatum*, *T. ctrv.* – *T. citreoviride*, *T. hrz.* – *T. harzianum* ir *T. virens* (dar vadinamas *G. virens*) santykinis endogliukonazės (KMCazės) aktyvumas (I_{KMC}) skirtingo pH sąlygomis.

6.3.2. Chitinazinis aktyvumas

Kadangi ne visų augintų terpėse su patogenišku mikromicetų ląstelių sienelėmis pavyko sukcentruoti patikimą statistiniam įvertinimui baltymo kiekį, analizuojame tik keturių mikromicetų celiuliazinio aktyvumo tyrimo rezultatus. Trys iš jų yra *Trichoderma* genties kamienai (*T. harzianum* DPK-b-11, *T. longibrachiatum* DPK-b-103 ir *T. viride* DPK-b-22) ir vienas – *Metarhizium anisopliae* DPK-b-57. Visi trys *Trichoderma* genties kamienai pagal IV skyriuje aprašomus antagonizmo rezultatus yra geri antagonistai bei potencialūs mikoparazitai. *M. anisopliae* yra gerai žinoma ir plačiai tiriama vabzdžius parazituojančių mikromicetų rūšis. Trys skirtingi *Trichoderma* kamienai, kaip ir laukėme, skyrėsi egzoląstelinės chitinazės kiekiu (arba jos aktyvumu) tomis pačiomis tyrimo sąlygomis. Didesnis chitinazinis aktyvumas nustatytas mikromicetams *T. harzianum* DPK-b-11 ir *T. longibrachiatum* DPK-b-103, nei mikromicetui *T. viride* DPK-b-22. Didžiausiu chitinaziniu aktyvumu (2.8 U/mg baltymo) ($p < 0,05$) pasižymėjo *T. longibrachiatum* DPK-b-103, ir buvo jis atitinkamai 8 ir 5 kartus didesnis nei mikromicetų *T. viride* DPK-b-22 ir *T. harzianum* DPK-b-11 celiuliaziniai aktyvumai (21 pav.). Skirtingi anglies šaltiniai auginimo terpėje nevienodai indukavo celiuliazės sintezę. Patogenišku mikromicetų ląstelių sienelių preparatai buvo silpnesni mikromiceto *T. longibrachiatum* chitinazinio aktyvumo induktoriai, nei koloidinis chitinas.

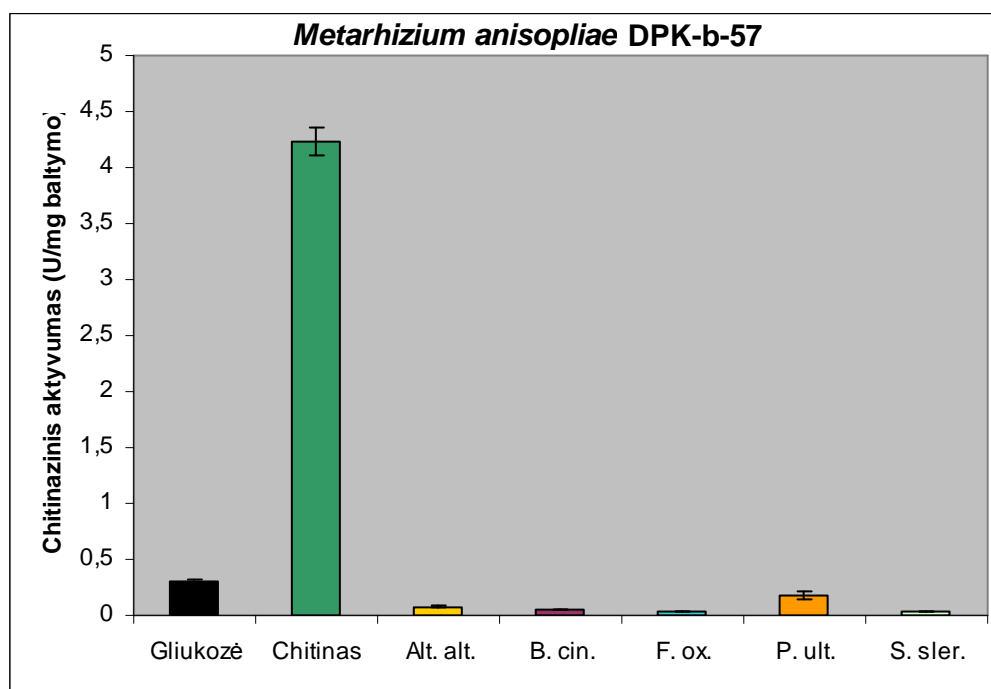


21 pav. Atrinktų *Trichoderma* genties mikromicetų kamienų chitinazinis aktyvumas (U · mg baltymo; substratas koloidinis chitinas), įvertintas po 7 kultivavimo parų auginimo Čapeko mineralinėje terpėje su skirtingų anglies šaltinių priedais: 5% gliukozės, 2% koloidinio chitino, 2% vieno iš patogenų (Alt. alt. – *Alternaria alternata*, B. cin. – *Botrytis cinerea*, F. ox. – *Fusarium oxysporum*, P. ult. – *Pythium ultimum*, S. Sler. – *Sclerotinia sclerotiorum*) ląstelių sienelių preparato. Kiekvienas diagramos stulpelis – vidurkis dviejų savarankiškų bandymų, matuojant trimis pakartojimais ± standartinė paklaida.

Terpėse su *A. alternata*, *F. oxysporum* ir *B. cinerea* ląstelių sienelių preparatais, šio mikromiceto

chitinazės skyrėsi nuo jo chitinazinio aktyvumo terpėje su koloidiniu chitinu (3.2 U/mg baltymo). Mikromiceto *T. harzianum* DPK-b-11 chitinazinis aktyvumas buvo beveik visiškai vienodas ir terpėje su koloidiniu chitinu ir terpėse su patogenų ląstelių sienelėmis (nuo 0.42 iki 0.65 U/mg baltymo). Panašus chitinazinio aktyvumo lygis nustatytas ir *T. Viride*.

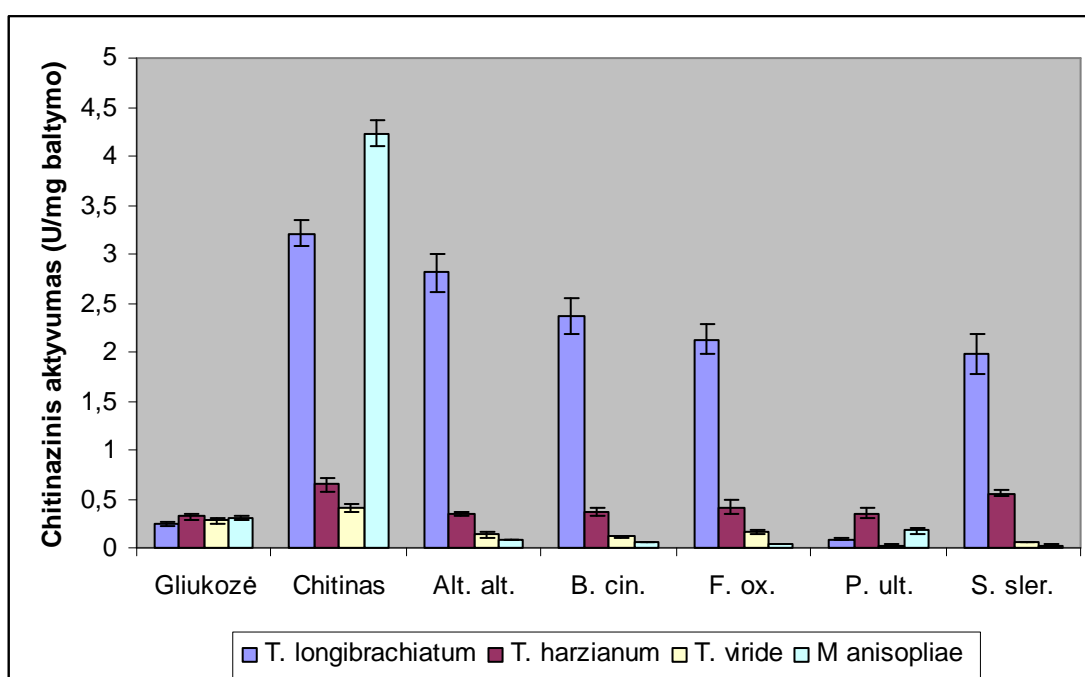
Mikromiceto *M. anisopliae* DPK-b-57 kamieno chitinazinis aktyvumas terpėje su koloidiniu chitinu didesnis nei geriausiu chitinaziniu aktyvumu išsiskyrusio *T. longibrachiatum* kamieno (2.8 U/mg baltymo) ir siekė 4.3 U/mg baltymo (22 pav.). Labai ryškūs ($p < 0.01$) skirtumai tarp šio mikromiceto chitinazinio aktyvumo indukuoto koloidinio chitino ir patogenų ląstelių sienelių. Matomai, *Metarhizium* genties grybų ir *Trichoderma* genties grybų chitinazių sistema yra skirtinga, ir priklauso nuo *Metarhizium* genties grybų prisitaikymo vienalaikiai dviejų fermentų – chitinazės ir proteazės veiklai.



22 pav. Mikromiceto *Metarhizium anisopliae* DPK-b-57 chitinazinis aktyvumas (U · mg baltymo; substratas koloidinis chitinas), įvertintas po 7 kultivavimo parų auginimo Čapeko mineralinėje terpėje su skirtingų anglies šaltinių priedais: 5% gliukozės, 2% koloidinio chitino, 2% vieno iš patogenų (Alt. alt. – *Alternaria alternata*, B. cin. – *Botrytis cinerea*, F. ox. – *Fusarium oxysporum*, P. ult. – *Pythium ultimum*, S. Sler. – *Sclerotinia sclerotiorum*) ląstelių sienelių preparato. Kiekvienas diagramos stulpelis – vidurkis dviejų savarankiškų bandymų, matuojant trimis pakartojimais ± standartinė paklaida.

Ankstesniuose skyriuose pastebėjome, kad gliukozė yra prastas celiuliazės kompleksu induktorius. Pagal 21, 22 ir 23 paveiksluose parodytus tyrimų rezultatus, gliukozė indukuoja kai kurių, tyrimui parinktų mikromicetų kamienų chitino sintezę. Visų keturių mikromicetų kamienų (geriau matomas 23 pav.) chitinazinis aktyvumas auginimo terpėje,

kurioje anglies šaltinis buvo gliukozė, statistiškai vienodas ($p > 0.05$). Labai artimos fermento aktyvumo vertės tarpėje su *P. ultimum* ląstelių sienelėmis, kuriose, kaip jau buvo minėta nėra chitino, o esanti celiuliozė, matomai indukavo chitino sintezę. Nors šis chitinazinio aktyvumo tyrimas yra preliminarus ir didesne dalimi palyginamasis, išryškėja kai kurių kamienų potencinės galimybės utilizuoti kitų mikromicetų ląstelių sienelėje esančius polisacharidus, o tai leidžia orientuotis į jų taikomumą kovai su augalų patogenais. Koloidinio chitino tarpėje (23 pav.) ryškiai ($p < 0.01$) dominuoja *T. longibrachiatum* DPK-b-103 ir *M. anisopliae* DPK-b-57 kamienų chitinaziniai aktyvumai. Labai gerai taip pat išsiskiria *T. longibrachiatum* DPK-b-103 kamieno chitinazinis aktyvumas kitų trijų mikromicetų kamienų aktyvumo fone ($p < 0.01$), o jo paties chitinazinio aktyvumo lygis skirtingos sudėties terpėse keičiasi nežymiai.



23 pav. Mikromicetų chitinazių aktyvumų, indukuotų naudojant auginimo terpėje skirtingus anglies šaltinius (žr. 21 ir 22 pav.) palyginimas.

Remdamiesi rezultatų analize galime teigti, kad patogenų ląstelių sienelės indukuoja *Trichoderma* genties grybų chitinazės sintezę, bet jos aktyvumo lygis labai priklauso nuo kamieno savybių. Chitinazių sintezę ir jų išskyrimą į auginimo terpę indukavo patogenišku mikromicetų ląstelių sienelių priedai tarpėje, ir šie rezultatai sutampa su kitų mokslininkų atliktų tyrimų rezultatais. Panašius rezultatus (geras chitinazės ir β -1,3-gliukanazės aktyvumas) gavo Sivan ir Chet (1989) mikromicetui *T. harzianum*, kai buvo auginamas tarpėje su *Rhizoctonia solani* miceliu aktyvumo auginimo terpėje stimuliavimas. Skirtingų genčių (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Sporotrichum*, *Beauveria* ir *Mucor*) mikromicetų chitinazinis aktyvumas nustatytas auginant juos tarpėje su 1 % kristalinės celiuliozės (Shubakov, Kucheriavykh, 2004), o jos aktyvumas keitėsi nuo 0.2 U/mg baltymo (mikromiceto

Sporotrichum olivaceum) iki 4.0–4.2 U/mg baltymo (*Trichoderma lignorum* ir *Aspergillus niger*). *Trichoderma* genties grybų genai perkeliama augalams ir padidina jų atsparumą patogenams. Pavyzdžiui, perkėlus *T. harzianum* ir *T. viride* endochitinazės geną (*ech42*) žymiai padidėjo bulvių ir pomidorų atsparumas patogenams *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea* ir *Rhizoctonia solani* (Steyaert ir kt., 2003). Chitinazę ir β -1,3-gliukanazę gausiai į auginimo terpę skyrė *Trichoderma* kamienai, kai terpėje buvo *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* ir *F. oxysporum* ląstelių sienelių biopolimerai (Witkowska, 2002). Aktyviausias buvo *T. harzianum* kamienas, kuris daugiausiai β -1,3-gliukanazės produkavo terpėje su *F. oxysporum* ląstelių biopolimeru.

6.4. IV SKYRIUS. Mišrių ir pavienių kultūrų celiuliozės hidrolizės palyginimas

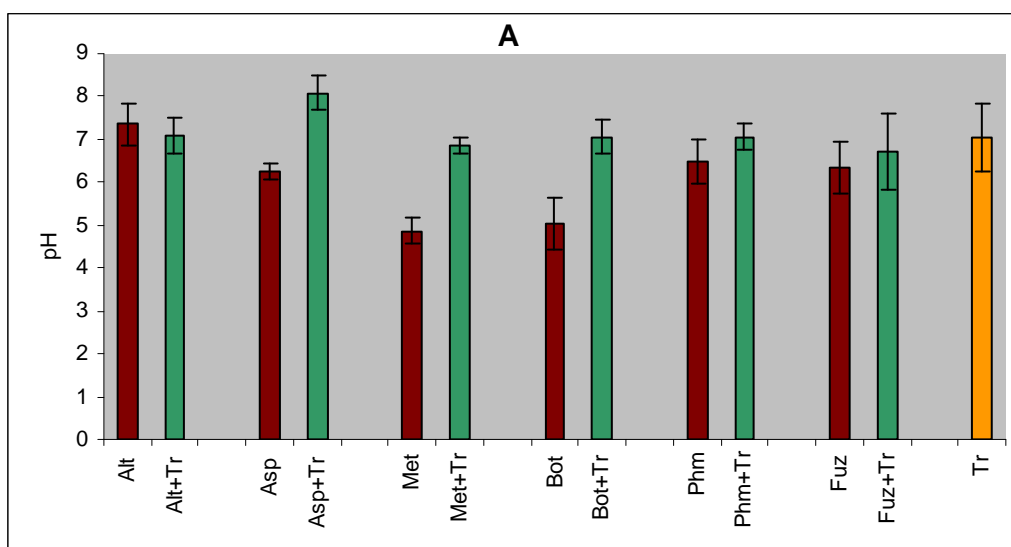
Natūraliomis sąlygomis mikromicetai vystosi bendrijose, kuriose skirtingų rūšių mikroorganizmų populiacijų gausa, santykis ir aktyvumas yra valdomas substrato cheminės sudėties, jo tirpumo ir pagrindinių fizinių veiksnių – temperatūros ir pH. Ieškant aktyvių celiuliazės producentų daug dėmesio skiriama ir fermentinių sistemų reakcijai besikeičiančiomis pH sąlygomis. Stebėti natūraliomis nuolat besikeičiančiomis sąlygomis populiacijos struktūros formavimąsi ar jos stabilumą yra sunku. Modelinėmis sąlygomis gauti tyrimo rezultatai pilnai neatspindi galimos natūraliomis sąlygomis situacijos, tačiau juos analizuojant galima prognozuoti kaitos intervalą, įvertinti santykinę skirtingų mikroorganizmų vystymosi tiriamomis sąlygomis priklausomybę. Patys mikromicetai vystydami geba valdyti juos supančios mikroaplinkos pH, arba konkuruodami slopina kitą, šalia besivystantį organizmą.

Šio tyrimo tikslas buvo palyginti skirtingų, pagal celiuliozės hidrolizės aktyvumą atrinktų kamienų tarpusavio sąveiką modelinėmis sąlygomis, įvertinant jų vystymąsi ir endo-1,4- β -gliukanazės aktyvumą pavienių ir mišrių populiacijų kultūrose.

Mikromicetus kultivavome sintetinio Malt ekstrakto (MEA, SIGMA) terpėje gliukozę pakeisdami 0,4% karboksimetilceliuliozės priedu. Auginome gryną kiekvieno mikromiceto kultūrą ir jo mišinį su aktyvaus *Trichoderma viride* (aktyvus bioagentas) kamieniu KA-N2. Visas kultūras analizavome po 14 kultivavimo parų. Karboksimetilceliuliazė (endo-1,4- β -gliukanazė) šio tyrimo metu įvertinta pagal 100 μ l kultivavimo terpės utilizuotos KMC kiekį ir perskaičiuota 1 sukauptos kultivavimo metu biomasės miligramui.

Pastebėti nežymūs 14 parų kultivavimo terpės pH skirtumai skirtingų mikromicetų kultūrų ir jų mišinių variantuose, priklausomai nuo anglies šaltinio mitybinėje terpėje (24 pav.). Didžiausi nustatyti *Aspergillus niger* kultivavimo terpės pH pasikeitimai, kai gliukozę pakeičiama karboksimetilceliulioze (KMC), pH = 6.25 terpėje su gliukozę parūgštėja iki 2,54 terpėje su KMC. Šis mikromicetas yra organinių rūgščių producentas, kurios keičia terpės

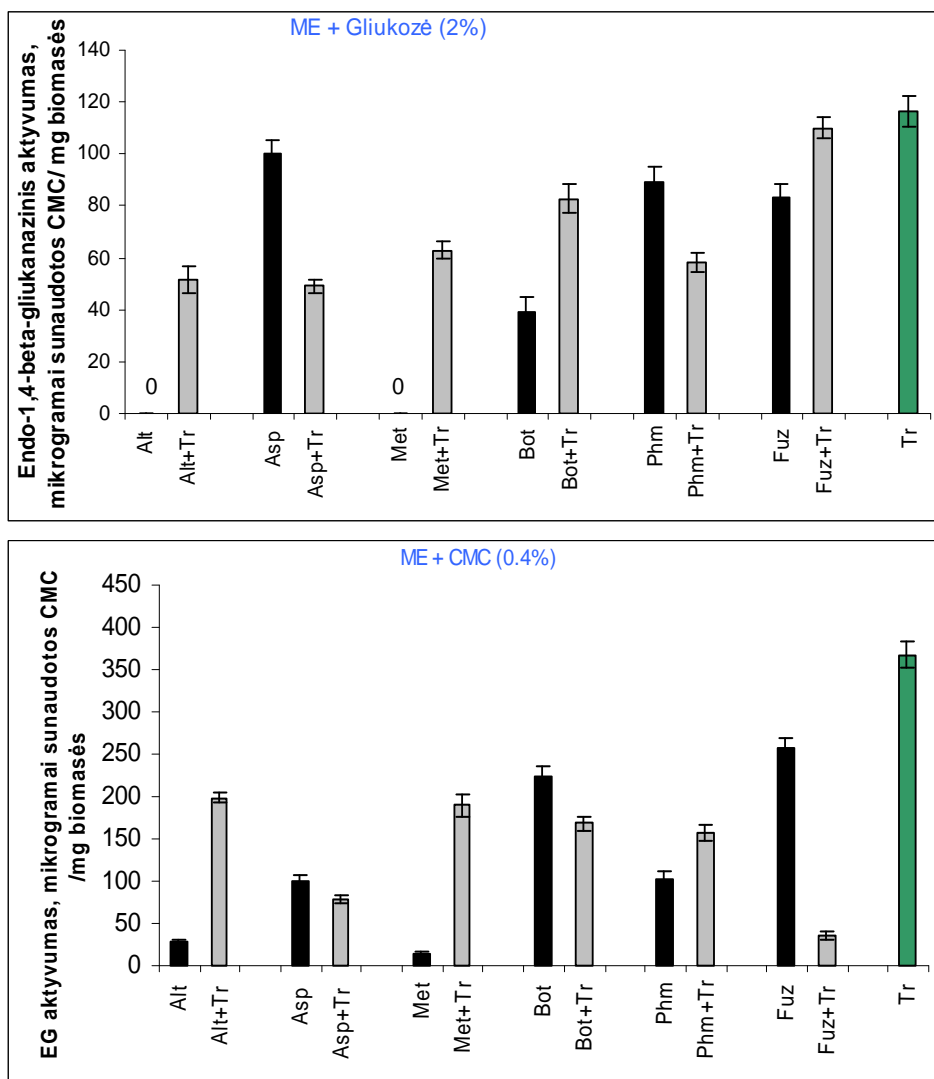
rūgštingumą. KMC indukavo pH rūgštėjimą ir kituose mūšų bandymuose, tiriant celiuliozės hidrolizę dalyvaujant *A. niger*. Kultivuojant mišinyje su *T. viride* terpės pH keičiasi nežymiai (nuo 7.09 iki 6.21). Nežymiai (nuo 6.33 iki 5.63 grynios kultūros atveju, ir nuo 6.71 iki 5.02 mišrios su *T. viride* atveju) mažėja mikromiceto *Fusarium oxysporum* auginimo terpės bei (nuo 4.86 iki 4,3 ir nuo 6.85 iki 6.54 atitinkamai grynios ir mišrios kultūros atveju) mikromiceto *Metarhizium anisopliae* terpės pH (24 pav.). *Botrytis cinerea* kultūroje, priešingai nei *A. niger* atveju, utilizuojant KMC terpės pH padidėja nuo 5.05 iki 6.4, kultivuojant jį gryną, o mišrioje kultūroje su *T. viride* didėja nežymiai nuo 7.05 iki 7.89. *Trichoderma viride*, auginama skirtingo anglies šaltinio terpėse išlaiko panašų terpės pH, 7.03 ir 7.58 atitinkamai terpėje su gliukoze



24 pav. Mitybinės terpės pH po 14 parų mikromicetų kultivavimo sintetinės alaus misos terpėje. Santrumpos: **Alt** – *Alternaria alternata*, **Alt+Tr** – *Alternaria alternate* + *T. viride*, **Asp** – *Aspergillus niger*, **Asp+Tr** – *A. niger* + *T. viride*, **Met** – *Metarhizium anisopliae*, **Met+Tr** – *M. anisopliae* + *T. viride*, **Bot** – *Botrytis cinerea*, **Bot+Tr** – *B. cinerea* + *T. viride*, **Phm** – *Phoma* sp., **Phm+Tr** – *Phoma* sp. + *T. viride*, **Fuz** – *Fusarium solani*, **Fuz+Tr** – *F. solani* + *T. viride* ir **Tr** – *Trichoderma viride*.

ir terpėje su KMC (24 pav., oranžinis stulpelis). Pastebėtas akivaizdus biomasės kaupimo skirtumas grynose ir mišrioje mikromicetų kultūrose. *Trichoderma viride* antagonistinio kamieno aktyvumas svarbus ir substrato hidrolizės procesui, ir biomasės sukaupimui. Nors parinkti šiam tyrimui mikromicetų kamienai visi hidrolizuoja KMC, tačiau *T. viride* aktyvumas buvo didesnis. Reikalingi išsamesni tyrimai, kad nustatyti, kurie *T. viride* metabolitai buvo esminiai antagonizmo procesui bei celiuliazijų aktyvumui hidrolizuojant tirpią celiuliozę – KMC. Jau šio tyrimo rezultatų analizė parodė, kad mikromicetų sąveika įtakoja ir augimą ir endo-1,4-β-gliukanazės (EG) aktyvumą. Svarbus ir anglies šaltinis. Neužfiksuota EG sintezė *Alternaria alternata* kultivavimo ME terpėje su gliukoze. Kai auginami abu mikromicetai – *A. Alternata* ir *T. viride* terpėje su gliukoze nukenčia ir *T. viride* EG aktyvumas, kuris nuo 116.56 μg/mg

biomasės grynos kultūros variante sumažėja dvigubai, iki 51.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Abu šie mikromicetai aktyvesni KMC atžvilgiu, aki auginami ME su KMC. Mikromiceto *A. alternata* EG aktyvumas po 14 parų kultivavimo terpėje su KMC buvo 27.42 $\mu\text{g}/\text{mg}$, mikromiceto *T. viride* – 367.82 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biomasės. Mišrios *A. alternata* ir *T. viride* kultūros aktyvumas išlieka pakankamai geras (198.75 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biomasės), matomai *T. viride* sąskaita, tačiau mažesnis nei grynos *T. viride* kultūros. Panaši situacija ir *Metarhizium anisopliae* bandymo variantų rezultatuose. Kultivuojant *M. anisopliae* terpėje su gliukoze EG aktyvumo neužfiksavome, o terpėje su KMC jis buvo 14.89 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biomasės.



25 pav. Mitybinės terpės endo-1,4- β -gliukanazinis aktyvumas po 14 kultivavimo parų. Rezultatai – kelių kiekvienos rūšies mikromicetų kamienų aktyvumo vidurkis, išreikštas sunaudotos karboskimetilceliuliozės $\mu\text{g}/1$ ml terpės per val. Santrumpos: **Alt** – *Alternaria alternata*, **Alt+Tr** – *Alternaria alternate* + *Trichoderma viride*, **Asp** – *Aspergillus niger*, **Asp+Tr** – *A. niger* + *T. viride*, **Met** – *Myrothecium verrucaria*, **Myr+Tr** – *M. anisopliae* + *T. viride*, **Bot** – *Botrytis cinerea*, **Bot+Tr** – *B. cinerea* + *T. viride*, **Phm** – *Phoma* sp., **Phm+Tr** – *Phoma* sp. + *T. viride*, **Fuz** – *Fuzarium solani*, **Fuz+Tr** – *F. solani* + *T. viride* ir **Tr** – *T. viride*.

Mišrioje mikromicetų *M. anisopliae* ir *T. viride* kultūroje tarpusavio santykis išlieka, bet lyginant su kitų mikromicetų ir *T. viride* tarpusavio vystymąsi, galima pastebėti, kad šie du

mikromicetai nelabai konkuruoja arba palaiko vienas kito aktyvumą KMC atžvilgiu, nes mišinyje EG aktyvumas gerokai didesnis nei mišiniuose su *A. alternata* arba *A. niger*. *Aspergillus niger* laikomas geru celiuliazų producentu, tačiau šio bandymo eigoje šios jo savybės nepasitvirtino, o santykiyje su *T. viride* išryškėjo kai kurie terpės pH kitimo įtakos ir *T. viride* EG aktyvumui.

Mikromiceto *A. niger* grynos kultūros EG aktyvumas abiejose kultivavimo terpėse buvo panašus (100.14 ir 98.87 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biomasės atitinkamai terpėje su gliukoze ir terpėje su KMC) – nė vienas substratas neindukavo didesnio EG aktyvumo. Mišrioje kultūroje su *A. niger* mikromiceto *T. viride* EG aktyvumas kelis kartus mažesnis nei grynoje kultūroje. Matomai, gerokai sumažėjęs kultivavimo terpės pH (iki 4.6, 25 pav.) terpėje su *A. niger*, turėjo įtakos ir mikromiceto vystymuisi bei jo EG aktyvumui.

Mikromiceto *T. viride* mišinių su *Botrytis cinerea* ir *Phoma* sp. EG aktyvumai labai panašūs, o šių mikromicetų grynų kultūrų EG aktyvumus KMC indukuoja iki 224.73 ir 102.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biomasės atitinkamai *B. cinerea* ir *Phoma* sp. Stipriausia antagonistinių išraiška pastebėta santykiyje tarp *T. viride* ir *Fusarium oxysporum*. Labai padidėja *Fusarium oxysporum* EG aktyvumas kultivuojant terpėje su KMC, tačiau mišrioje šių dviejų mikromicetų kultūroje, sumažėjus abiejų augimui, mažėja ir jų EG suminis aktyvumas, kuris užfiksuotas kaip mažiausias visų mišinių kultūroms.

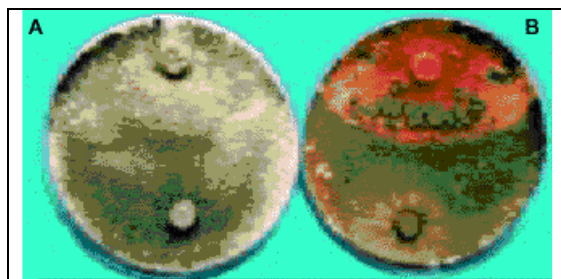
6.5. V SKYRIUS. Mikromicetų tarpusavio sąveika terpėse su celiulioze arba chitinu procese in vitro

Cheminės priemonės, naudojamos kovai su mikroorganizmų sukeltomis augalinėmis ligomis gali sumažinti jų kiekį, tačiau toks metodas turi ir neigiamų pasekmių. Jų naudojimas kenkia žmogui, aplinkai, be to ilginiui augalų patogenai tampa atsparūs cheminių medžiagų poveikiui. Nepalanku ir tai, kad cheminės kovos priemonės slopina ne tik patogenų, bet ir saprofitinių grybų, tame tarpe mikorizės, vystymąsi, taip pakenkdami mikroorganizmų ir augalo simbiozės procesams. Ieškoma naujų, ekologiškai mažiau kenksmingų kovos su augalų patogenais būdų. Vienas iš jų – biokontrolė. Biologinei kontrolei naudojami bioagentai – mikroorganizmai, kuriems būdingas stiprus antagonizmas patogenų atžvilgiu. Galimi keli antagonizmo būdai, kurie veikia pavieniai arba vienu metu. Bioagentas-antagonistas slopina patogeno vystymąsi išskirdamas antibiotikus, antagonistas stipriau kovoja dėl substrato arba ekstrahuoja fermentus celiuliazės, chitinazės, β -1,2 gliukanazės ir proteazės. Kadangi micelių grybų ląstelių sienelėje yra chitinas, gliukanas ir baltymai, galintys juos hidrolizuoti fermentai yra labai svarbūs sėkmingam antagonizmo procesui ir yra esminiai biologinėje kovoje su patogenais, saugant jo ląstelių sieneles (Lorito ir kt., 1994). Nustatyta, kad aktyvūs bioagentai

(dažniausiai naudojami *Trichoderma* genties grybai) augdami skystoje terpėje su chitinu sintetina kelias chitinazes: endochitinazes, egzochitinazes ir 1,4- β -N-acetilgliukozaminidazes. Visos jos svarbios ląstelės sienelės chitino skaldymo procese. Kita fermentinė sistema, kurią mobilizuoja antagonistas ardydamas patogeno ląstelių sienelės yra β -gliukaną skaldantys fermentai. Nustatyti du gliukano skaldymo mechanizmai: dalyvaujant endo- ir egzo-gliukanazėms, kurios abi atakuoja gliukaną sinergistiškai. Šio komplekso fermentai klasifikuojami pagal gliukozidines jungtis: 1,4- β -gliukanazės (joms priklauso ir celiuliazės), 1,3- β -gliukanazės ir 1,6- β -gliukanazės. Kadangi 1,3- β -gliukanas yra micelinių grybų ląstelių sienelės sudėtinė dalis, būtent egzo – 1,3- β -gliukanazės svarbios biokontrolės procese. Drauge su chitinu ir gliukanu esantys sienelėje baltymai išryškina proteazių svarbą biokontrolėje (El-Katatny, 2001; Martin, 2006; Sela-Buurlage, 1999; Carlson, 2002).

6.5.1. Konkurencija, antagonizmas/parazitavimas (bioagentai)

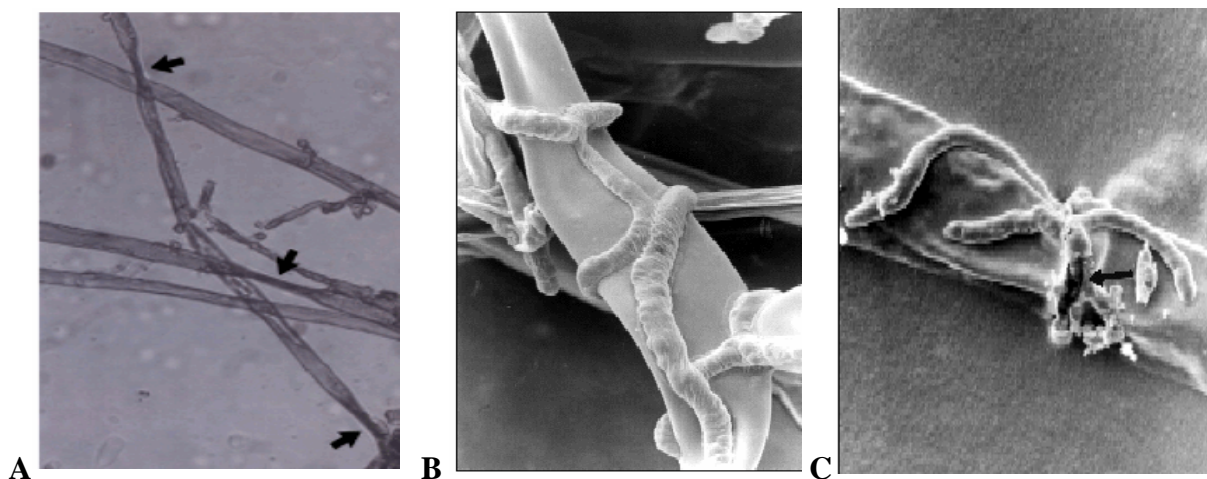
Mikromicetų sąveiką tyrėme augindami ant standžių mitybinių terpių, kuriose vienintelis anglies šaltinis buvo vienas iš substratų: gliukozė, koloidinis chitinas, chitinas, smulkinta celiuliozė, filtrinis popierius arba KMC. Auginome grynas ir mišrias kultūras, stebėdami kolonijų vystymosi dinamiką ir įvertindami slopinimo arba stimuliavimo efektus (26 pav.).



26 pav. Dviejų skirtingo aktyvumo *Trichoderma* kamienų (*T. longibrachiatum* – A ir *T. harzianum* – B) vystymosi mišrioje kultūroje su *Rhizoctonia solani* vaizdas po 11 parų auginimo (abiejose nuotraukose gerai matomas *Trichoderma* biomasės dominavimas prieš patogeno biomasę auginimo sąlygomis).

Parazituojantiems grybams yra būdinga vyniotis apie kito mikromiceto hifus, išskirianti hidrolizuojančius fermentus, tirpinančius ląstelės sienelę ir sudarančius galimybę parazito hifui prasiskverbti į šeimininko ląstelę, kurios turiniu jis vėliau maitinasi (27 pav.)

Atlikti patogeno *Alternaria alternata* ir antagonisto *Trichoderma viride* sąveikos tyrimai terpėse su skirtingais anglies šaltiniais. Terpėje su lengvai pasisavinamu anglies šaltiniu – gliukoze, greičiau augantis mikromiceto *T. viride* kamienas dominuoja ir užgožia *A. alternata* augimą. Terpėje su tirpia celiulioze – KMC, abu mikromicetai auga panašiu greičiu



27 pav. *Trichoderma harzianum* parazituojamo mikromiceto *Rhizoctonia solani* hifų pažaidos (A); *T. harzianum* hifai apgaubiantys *R. solani* hifus pradinio apaugimo metu (B) ir patogeno hifo sienelės destrukcijos pradžia (C).

pasivindami anglies šaltinį ir nekonkuruodami dėl jo. Terpėje su kristaline celiulioze vyksta stipresnė sąveika, kurią galima paaiškinti žinomu geriau išvystyta *Trichoderma* genties grybų celiuliazijų sistema. Stebint dviejų kultūrų vystymąsi terpėje, kurioje vienintelis anglies šaltinis buvo chitinas, akivaizdu, kad mikromiceto *A. alternata* tiriamas kamienas nepasižymi chitinaziniu aktyvumu arba jis yra silpnas. Tokiomis sąlygomis *T. viride* kamienas puikiai užima nišą vystymuisi, dominuoja ir, praėjus kelioms paroms, kitą mikromicetą eliminuoja iš kultūrų mišinio (28 pav. priedas).

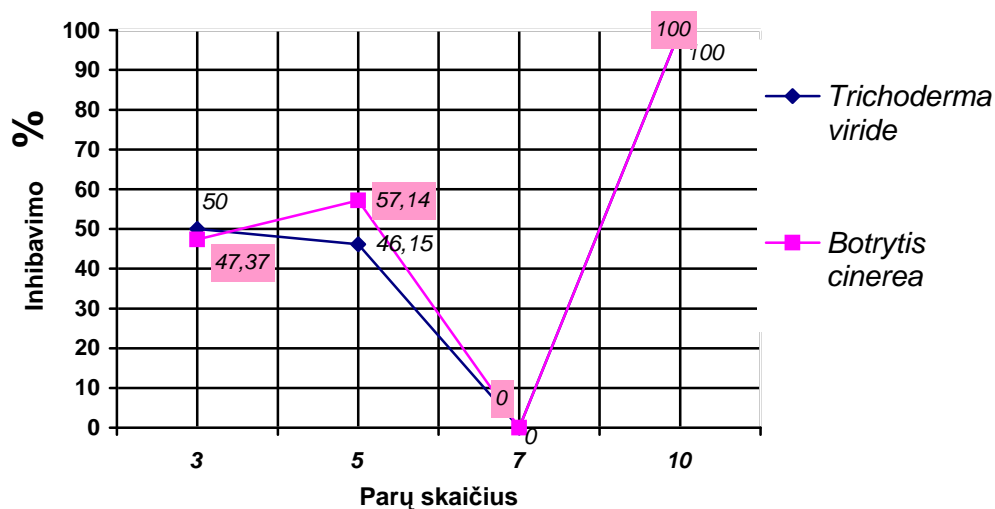
Čapeko druskų terpė su gliukoze nėra optimali *Trichoderma* genties mikromicetams vystytis, tačiau dauguma mikromicetų, tarp jų ir augalų patogenų kamienai, šią terpę toleruoja. Jos pagrindu galima stebėti, bioagento, mūsų atveju *Trichoderma viride* kamieno, efektyvumą slopinant kitų grybų vystymąsi jo vystymuisi nepalankiomis sąlygomis. Mikromiceto *A. alternata* kamienas Čapeko terpėje su gliukoze buvo nežymiai aktyvesnis nei *T. viride* kamienas (8 lentelė). Nors terpėje su tirpia celiulioze – KMC, abu kamienai slopino vienas kito vystymąsi, terpėje su kristaline celiulioze – celiuliozės miltelias, *T. viride* aktyvumas ir agresyvumas *A. alternata* atžvilgiu ženkliai padidėjo.

Jeigu mikromiceto *A. alternata* kamienas nebuvo aktyvus mikromiceto *T. viride* atžvilgiu, tai visai kita situacija stebima, kai mišrioje kultūroje *T. viride* auginama drauge su patogenišku *B. cinerea* kamieniu (5 pav., priedas). Ir terpėje su gliukoze ir terpėje su tirpia celiulioze – KMC, abu mikromicetai slopina vienas kito vystymąsi. Po 3 parų augimo KMC terpėje aktyvumas vienas kito atžvilgiu buvo vienodas (kolonijos augimą slopino 50%) (30 pav.). Po 5 vystymosi parų aktyvesnis *T. viride* kamienas, ir jo aktyvumas iki 7 paros nesikeičia, tačiau vėliau *T. viride* vystosi labai intensyviai apaugdama ir utilizuodama *B. cinerea* micelį (slopinimas – 100%). Abu šie mikromicetai yra greitai augantys ir geba utilizuoti celiuliozę,

8 lentelė. Mikromicetų *Trichoderma viride* ir *Alternaria alternata* kamienų sąveika (augimo slopinimas, %) skirtingos sudėties mitybinėse terpėse.

Mitybinės terpės	Mikromicetai	Auginimo paros			
		4	5	7	12
Alaus misos terpė	<i>Trichoderma viride</i>	0	25.0	12.27	12.27
	<i>Alternaria alternata</i>	24.5	35.56	42,78	43,57
Čapeko terpė su 2% gliukoze	<i>Trichoderma viride</i>	10,82	25.0	39.42	43,71
	<i>Alternaria alternata</i>	0	46.16	54.7	54.7
Čapeko terpė su 4% KMC	<i>Trichoderma viride</i>	31.67	38.67	41.22	43.55
	<i>Alternaria alternata</i>	42.39	50.91	62.72	62.72
Čapeko terpėje su 4% celiuliozės miltelių	<i>Trichoderma viride</i>	0	12.44	0	0
	<i>Alternaria alternata</i>	12.48	64.35	100	100
Čapeko terpė su 2% koloidinio chitino	<i>Trichoderma viride</i>	0	0	0	0
	<i>Alternaria alternata</i>	20.0	33.34	65.14	100

tačiau, tiek remiantis literatūroje aprašomais rezultatais, tiek ir rezultatais, gautais mūsų tyrimo metu, yra žinoma, kad *Trichoderma* genties grybų celiuliazinis aktyvumas yra didesnis nei *Botrytis* genties grybų. Terpėse su kristaline celiulioze ir chitinu pastebime ryškų abiejų mikromicetų kamienų biomasės sumažėjimą. Skiriasi *T. viride* augimas chitino terpėje su *B. cinerea* (5 pav., priede) palyginus su jos augimu chitino terpėje mišrioje kultūroje su *A. alternata* (28 pav., priede).



30 pav. *Trichoderma viride* ir *Botrytis cinerea* kamienų sąveika Čapeko terpėje gliukoze pakeitus 4% karboksimetilceliuliozės priedu.

Jeigu *A. alternata* nebeaugo šioje terpėje ir buvo neutrali *T. viride*, atžvilgiu, tai *B. cinerea* sugeba pasisavinti chitiną ir konkuruodamas slopina ir mikromiceto *T. viride* vystymąsi.

Nors ir silpniau augdama Čapeko terpėje su gliukoze antagonistu *T. viride* kolonijos vystymasis nebuvo slopinamas auginant šioje terpėje mišrioje kultūroje su *B. cinerea* (9 lentelė). Tiriant *Fusarium oxysporum* ir *Trichoderma viride* sąveiką skirtingos sudėties terpėse visais

atvejais *T. viride* slopina *F. oxysporum* augimą (6 pav., priedas). Stipriausia sąveika vyksta alaus misos terpėje, atsiranda pigmentacija sąveikos zonoje, parodanti ir patogeniško *F. oxysporum* kamieno gebėjimą gintis ir konkuruoti dėl anglies ir energijos šaltinio. Ypač aktyvus *T. viride* kamienas *F. oxysporum* atžvilgiu buvo alaus misos terpėje, tačiau atvirkštinė reakcija vyksta terpėje su gliukozės priedu, kur mikromiceto *F. oxysporum* kamienas išskiria antrinius metabolitus (raudoną pigmentą), aktyvius prieš bioagentą *T. viride*. Terpėje su KMC vyksta stipriausia sąveika, matoma skaidri sąveikos zona, charakteringa antagonizmui išskiriant į terpę antibiotikus (6 pav. priedas).

9 lentelė. Mikromicetų *Trichoderma viride* ir *Botrytis cinerea* kamienų sąveika (augimo slopinimas, %) skirtingos sudėties mitybinėse terpėse

Mitybinės terpės	Mikromicetai	Auginimo paros			
		4	5	7	12
Alaus misos terpė	<i>Trichoderma viride</i>	0	0	0	0
	<i>Botrytis cinerea</i>	86.12	96.0	96.0	96.0
Čapeko terpė su 2% gliukozės	<i>Trichoderma viride</i>	0	0	0	0
	<i>Botrytis cinerea</i>	51.12	100	100	100
Čapeko terpė su 4% KMC	<i>Trichoderma viride</i>	0	0	20.0	0
	<i>Botrytis cinerea</i>	0	100	75.15	100
Čapeko terpėje su 4% celiuliozės miltelių	<i>Trichoderma viride</i>	12.5	6.7	20.0	20.0
	<i>Botrytis cinerea</i>	94.45	44.45	75.05	75.0
Čapeko terpė su 2% koloidinio chitino	<i>Trichoderma viride</i>	62.27	54.55	63.64	69.24
	<i>Botrytis cinerea</i>	31.82	44.45	32.0	37.5

Tyrimų rezultatai parodė, kad atrinkto aktyvaus antagonisto – *T. viride* kamienas parodė nevienodą aktyvumą ne tik slopinant skirtingų genčių mikromicetus, bet ir slopinant tos pačios genties skirtingų mikromicetų rūšių kamienus. Mikromicetų gebėjimas vystytis ir konkurencija dėl substrato (pagrindinai anglies šaltinio) priklauso nuo rūšies ir nuo rūšies kamieno (iš kur išskirtas) savybių. Palyginę to paties *Trichoderma viride* kamieno sąveiką su dviejų, skirtingų *Fusarium* genties rūšių (*F. avenaceum* ir *F. oxysporum*) kamienais (10 ir 11 lentelės), galime stebėti eilę panašumų bei skirtumų jų reakcijoje į substrato pasikeitimą bei konkurento vystymąsi gretimame plote.

Labai palankioje tirtiems mikromicetams vystytis terpėje – alaus misos agare, *Trichoderma viride* silpnesnė prieš *Fusarium oxysporum* nei prieš *F. avenaceum* (silpniau stabdo *F. oxysporum* vystymąsi, o pati yra taip pat labiau jo slopinama). Skurdžioje (be anglies šaltinio

Čapeko terpėje) *T. viride* ir *F. oxysporum* neparodė antagonizmo, nors vystosi abu ant šios standžios terpės agarų ir Čapeko terpės elementų sąskaita. Atsiradus šioje terpėje gliukozei konkurencija užfiksuota ir yra panaši kaip ir alus misos mitybinės terpės sąlygomis. Tokie rezultatai parodo, kad šių mikromicetų kultūros intensyviai konkuruoja dėl anglies šaltinio, stabdydami vieni kitų vystymąsi.

10 lentelė. Mikromicetų *Trichoderma viride* ir *Fusarium avenaceum* kamienų sąveika sąveika (augimo slopinimas, %) skirtingos sudėties mitybinėse terpėse.

Mitybinės terpės	Mikromicetai	Auginimo paros			
		4	5	7	12
Alaus misos terpė	<i>Trichoderma viride</i>	30.0	25.0	25.0	25.0
	<i>Fusarium avenaceum</i>	26.67	37.17	37.17	37.17
Čapeko terpė su 2% gliukozės	<i>Trichoderma viride</i>	10.0	30.0	27.28	27.28
	<i>Fusarium avenaceum</i>	22.8	11.12	40.0	40.0
Čapeko terpė su 4% KMC	<i>Trichoderma viride</i>	0	0	16.67	18.46
	<i>Fusarium avenaceum</i>	0	0	0	0
Čapeko terpėje su 4% celiuliozės miltelių	<i>Trichoderma viride</i>	0	0	49.9	63.4
	<i>Fusarium avenaceum</i>	0	0	0	0
Čapeko terpė su 2% koloidinio chitino	<i>Trichoderma viride</i>	26.1	41.82	42.73	54.54
	<i>Fusarium avenaceum</i>	7.42	17.42	33.34	48.08

11 lentelė. Mikromicetų *Trichoderma viride* ir *Fusarium oxysporum* sąveika (augimo slopinimas, %) skirtingos sudėties mitybinėse terpėse.

Mitybinės terpės	Mikromicetai	Auginimo paros			
		4	5	7	12
Alaus misos terpė	<i>Trichoderma viride</i>	0	32.26	36.93	36.93
	<i>Fusarium oxysporum</i>	10.73	10.73	10.7	10.7
Čapeko terpė su 2% gliukozės	<i>Trichoderma viride</i>	42.86	42.8	53.85	53.8
	<i>Fusarium oxysporum</i>	9.01	2.2	2.0	1.53
Čapeko terpė su 4% KMC	<i>Trichoderma viride</i>	0	0	0	8.58
	<i>Fusarium oxysporum</i>	0	0	0	0
Čapeko terpėje su 4% celiuliozės miltelių	<i>Trichoderma viride</i>	0	14.3	16.5	38.0
	<i>Fusarium oxysporum</i>	0	22.73	8.6	8.6
Čapeko terpė su 2% koloidinio chitino	<i>Trichoderma viride</i>	0	3.07	24.55	25.0
	<i>Fusarium oxysporum</i>	0	0	13.34	10.0

Gliukožę Čapeko terpėje pakeitus celiulioze arba chitinu sąveika susilpnėja arba dar labiau išauga (7 pav., priedas). KMC terpėje aktyvesnis prieš *T. viride* buvo *F. avenaceum*

kamienas, o celiuliozės miltelių terpėje *F. oxysporum* kamienas (10 ir 11 lentelės). Celiuliozės terpėse aktyvumą ir konkurentiškumą praranda *T. viride* kultūra. Tik gliukozės priedas celiuliozės terpėse paskatina ir konkurenciją už celiuliozę, o tai galima būtų paaiškinti tuo, kad gliukozė tokiomis sąlygomis valdo ir celiuliazijų kompleksą. Intensyvesnis antagonizmas tarp *T. viride* ir *Fusarium* genties kamienų užfiksuotas koloidinio chitino terpėje. Intensyvesnė sąveika pastebėta šioje terpėje tarp *T. viride* ir *F. avenaceum* kultūrų. Dar ryškesni mikromicetų sąveikos skirtumai, priklausantys nuo anglies šaltinio mitybinėje terpėje, pastebimi, kai auginami mikromicetų kamienai dirvožemio ekstrakto terpėje su anksčiau minėtais priedais (7 pav., priedas). Dar skurdesnės sąlygos padeda išryškinti charakteringus kiekvienam kamienui bruožus, bei jo stiprumą sąveikos procesuose.

Šių tyrimų rezultatai parodė, kad mikromicetų tarpusavio sąveika, jų susiderinamumas, jų aktyvumas ir gebėjimas konkuruoti ar netgi parazituoti labai priklauso nuo mitybinės situacijos ir nuo pačių kamienų gentinės priklausomybės.

IŠVADOS

1. Nustatomų dirvožemio ir celiuliozės atliekų perdirbimo pavyzdžiuose mikromicetų koncentracijų dydį įtakojo išskyrimo terpėje naudojamas anglies šaltinis. Terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu – celiulioze, nustatyta išskiriamų mikromicetų koncentracija buvo nuo 10 iki 100 kartų didesnė nei standartinėje terpėje su gliukoze.

2. Bendra mikromicetų koncentracija ir gebančių augti terpėse su vieninteliu anglies šaltiniu – celiulioze, skirtinguose tyrimui naudotuose substratuose (dirvožemis ir celiuliozės perdirbimo substratai) šio tyrimo sąlygomis pasiskirstė sekančiai: didžiausia mikromicetų koncentracija buvo humusingame dirvožemyje, mažesnė celiuliozės substratuose ir mažiausia skurdžiame dirvožemyje, tačiau celiuliazinių kamienų procentas bendroje išskiriamų mikromicetų koncentracijoje didžiausias buvo celiuliozės substratuose, o mažiausias humusingame dirvožemyje.

3. Tiriant gebančių utilizuoti chitiną mikromicetų pasiskirstymą tiriamuose substratuose, nustatytas gerokai mažesnis chitinaziniu aktyvumu pasižyminčių nei celiuliazinių mikromicetų kamienų skaičius, nepriklausomai nuo išskyrimui naudojamo substrato. Lyginant humusingą ir organinėmis medžiagomis skurdų dirvožemį, chitiną utilizuojančių kamienų kiekis bendroje išskiriamų mikromicetų koncentracijoje sudarė atitinkamai 8.4 % ir 2.7 %. Auginant skirtingos sudėties terpėse nustatyta, kad išskirti mikromicetai chitiną naudojo ne kaip azoto, o kaip anglies šaltinį.

4. Iš dirvožemio išskirti mikromicetai priskirti 1550 kamienų. Potencialūs celiuliazijų producentai rasti tarp 27 genčių kamienų. Aktyviausi celiuliozės atžvilgiu buvo *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium* genčių mikromicetai, kurių kamienų didesnės dalies santykinis celiuliazinis aktyvumas buvo > 1 .

5. Tarp 269 potencialių celiuliozės utilizatorių, išskirtų iš antropogeninių – celiuliozės atliekų perdirbimo substratų, aktyviausi buvo *Penicillium funiculosum* (aktyvių kamienų procentas 27.1%), *P. simplicissimum* (15.7%), *Stachybotrys chartarum* (7.5%) ir *Aspergillus repens* (4.7%) rūšių kamienai. Bendras išskirtų iš pramoninių substratų mikromicetų kompleksas išskirtų rūšių sudėtimi ir dominuojančių mikromicetų charakteristika ryškiai skyrėsi nuo išskirtų iš dirvožemio mikromicetų komplekso.

6. Chitinaziniu aktyvumu pasižymėjo dauguma *Trichoderma* genties kamienų, beveik visi *Paecilomyces* ir *Arthrobotrys* genčių kamienai, aktyviausi buvo *Metarhizium* ir *Beuaveria* genčių mikromicetai.

7. Ištyrus 12 aktyviausių, atrinktų iš dirvožemio ir celiuliozės atliekų perdirbimo substratų pagal santykinį aktyvumą, mikromicetų kamienų endogliukanazinį (KMCliazinis) ir filtrinio popieriaus celiuliazinį (FPCliazinis) aktyvumus, nustatyti potencialiausi egzolastelinių celiuliazijų producentai – *Aspergillus niger* DPK-cl-12, *Stachybotrys chartarum* DPK-cl-100, *Trichoderma longibrachiatum* DPK-b-103, *Gliomastix murorum* var. *murorum* DPK-cl-03, *Penicillium funiculosum* DPK-cl-19, *M. verucaria* DPK-cl-06, *Clonostachys rosea* f. *rosea* (= *G. roseum*) DPK-cl-102.F

8. Pagal gebėjimą vystytis terpėse su vieninteliu anglies šaltiniu – chitinu, atrinkti mikromicetų kamienai šio tyrimo sąlygomis buvo aktyvūs antagonistai tirtų augalams patogeniškų mikromicetų kamienų atžvilgiu. Antagonistų chitinazinis aktyvumas terpėse su vieninteliu anglies šaltiniu – patogenų ląstelių sienelių preparatais, buvo artimas šio fermento aktyvumui terpėje su grynu chitinu.

9. Tyrimų rezultatai parodė, kad atrinkti mikromicetų kamienai gali būti vertinami kaip potencialūs bioagentai, gebantys konkuruoti dėl substrato (celiuliozė ir celiuliazinis aktyvumas) arba stabdyti patogeno vystymąsi išskiriant ląstelės sienelę ardančias chitinazes. Kiti kamienai, detaliau ištyrus ir nustačius fermentų charakteristikas, gali būti rekomenduojami kaip potencialūs perteklinės celiuliazės producentai.

Daiva Seletytė

.....

Darbo vadovė dr. Dalė Pečiulytė

.....

SANTRAUKA

Pagrindinis darbo tikslas buvo ištirti natūralių ir antropogeninių mikromicetų bendrijų sudėtį ir jų aktyvumą dviejų gamtinių polisacharidų – celiuliozės ir chitino atžvilgiu. Ištyrėme ir palyginome celiuliaziniu ir chitinaziniu aktyvumu pasižyminčių mikromicetų santykį dviejuose, skirtinguose (humusingas ir organinėmis medžiagomis skurdus) dirvožemiuose bei atrinkome mikromicetų kamienus, kurių fermentinius aktyvumus nustatėme laboratorinėmis sąlygomis, auginimo terpėse naudodami vienintelį anglies šaltinį polisacharidus. Didesnis dėmesys buvo skiriamas celiuliozei kaip substratui ir celiuliaziniam mikromicetų aktyvumui. Todėl palyginimui ištyrėme ir antropogeninių substratų – kartono gamybos iš popieriaus atliekų, skirtingų perdirbimo etapų medžiagų masės bei gamybos atliekų mikromicetų rinkinius bei jų aktyvumo santykį šio substrato atžvilgiu. Visą tyrimą atlikome keliais etapais, atrinkdami aktyvius mikromicetų kamienus pagal jų vystymąsi selektyviose terpėse, pagal santykinę celiuliazinį ir chitinazinį aktyvumą ir, atlikus detalesnį ištyrimą, pagal kiekybines aktyvumo charakteristikas.

Nustatyta skirtinga mikromicetų gausa dviejuose dirvožemiuose (atitinkamai 6,4 tūkstančiai ir 80 tūkstančių ksv/g sauso dirvožemio), bei iš jų išskirtų mikromicetų kamienų gebėjimas utilizuoti celiuliozę laboratorinėmis sąlygomis. Procentinė gebančių augti terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu celiulioze arba chitinu mikromicetų kamienų sudėtis taip pat buvo skirtinga ir priklausė nuo kiekvieno dirvožemio mikromicetų bendrijos struktūros ir jos organizmų aktyvumo pavyzdžių ėmimo metu. Celiuliaziniu aktyvumu pasižymintys mikromicetai sudarė $\approx 70\%$ ir 30% bendro iš humusingo ir organinėmis medžiagomis skurdaus dirvožemio išskirtų kamienų skaičiaus. Mikromicetų kompleksai kuriuos nustatėme celiuliozės atliekų perdirbimo substratuose skyrėsi nuo dirvožemio mikromicetų kompleksų, tačiau kai kurių rūšių kamienus aptikome ir vienuose ir kituose tirtuose substratuose, o jų aktyvumas celiuliozės atžvilgiu buvo akivaizdus. Nepaisant pašalinio oru plintančių mikromicetų užkrato celiuliozės perdirbimo substratuose, terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu – celiulioze, gerai vystėsi didesnioji dalis išskirtų iš šių substratų kamienų, o kai kuriuose celiuliozės perdirbimo substratuose, jų koncentracija selektyviose terpėse buvo didesnė nei standartinėse, išskyrimui iš substratų naudojamose terpėse. Nors antropogeniniuose substratuose celiuliozę hidrolizuojantys kamienai sudarė didesnę dalį bendro išskirtų kamienų kiekio, nei dirvožemiuose, dirvožemyje nustatyta didesnę celiuliozę utilizuojančių mikromicetų rūšių įvairovė.

Iš dirvožemių išskyrėme 1550 mikromicetų kamienų, kuriems priklauso 27 gentys. Aktyvių šiose gentyse mikromicetų kamienų procentinis pasiskirstymas buvo nevienodas: atitinkamai sudarė apie 42.85%, 28.57%, 79.24%, 37.51%, 26.08%, 32.69% ir 39.70% kiekvienos iš šių genčių bendo išskirtų izoliatų skaičiaus. Celiuliazinio aktyvumo vertės skyrėsi ne tik lyginant skirtingų genčių mikromicetų kamienus, bet pastebimi skirtumai užfiksuoti ir tarp

mikromicetų rūšių vienos genties ribose (pvz. *Trichoderma* genties kamienų aktyvumas). Didžiausiu santykinu celiuliaziniu aktyvumu šio tyrimo sąlygomis pasižymėjo ir buvo atrinkti kaip potencialūs perteklinių celiuliazinių producentai: *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Clonostachys*, *Gliocaldium*, *Myrothecium*, *Penicillium* ir *Trichoderma* genčių mikromicetų kamienai. Pagal kiekybinės endogliukanazės (KMCliazės) ir filtrinio popieriaus (FPCliazės) celiuliazės analizės rezultatus aktyviausi buvo *Penicilium funiculosum* (aktyvių kamienų procentas 27.1%), *P. simplicissimum* (15.7%), *Stachybotrys chartarum* (7.5%) ir *Aspergillus repens* (4.7%) rūšių mikromicetų kamienai. *Gliomastix murorum* var. *murorum* ir *Stachybotrys chartarum* kamienai išskirti iš antropogeninių sunbstratų, kiti – iš dirvožemio pavyzdžių.

Santykinu chitinaziniu aktyvumu pasižymėjo dauguma *Trichoderma* genties kamienų, beveik visi *Paecilomyces* ir *Arthrotrichum* genčių kamienai. Aktyviausi, nustačius endogliukanazės aktyvumą, buvo *Metarhizium* ir *Beuaveria* genčių mikromicetų kamienai. Celiuliazės svarbios tiek skaldant celiuliozę dirvožemyje tiek ir augalų patogenams, prasiskverbiant į augalo sienelę invazijos metu. Chitinazės svarbios antagonizmui, kurio efektyvumas priklauso ne tik nuo gebėjimo konkuruoti dėl substrato, nuo antibiotikų, stabdančių kito organizmo vystymąsi, išskyrimo, bet ir nuo hidrolitinių egzofermentų, tirpinančių parazituojamo organizmo ląstelių sienelės. Chitinazėms priskiriamas svarbiausias vaidmuo fermentinio agresyvumo procese. Rezultatai parodė, kad atrinkti šio tyrimo sąlygomis mikromicetų kamienai, galintys vystytis terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu chitinu, gerai augo terpėse, kuriose vienintelis anglies šaltinis buvo patogeniškų mikromicetų ląstelių sienelių priedai. Šių mikromicetų endogliukanazės aktyvumas buvo panašus kaip ir juos auginant terpėje su koloidiniu chitinu, kuris tiesiogiai indukuoja chitinazės sintezę. Chitinazės nebuvo indukuojamos terpėje, kurioje buvo *Pythium ultimum* sienelių priedas. Kaip žinoma, šio mikromiceto ląstelių sienelėse nėra chitino, jų standumą palaiko kitas polisacharidas – celiuliozė. Analizuojant pradinius tyrimų rezultatus, išaiškinome, kad chitinazės aktyvumas priklausė ir nuo tyrimui naudojamo patogeno rūšies (bei kamieno) bei antagonistų, kuriuos atrinkome kaip aktyvius bioagentus ir, kurių chitinazinį aktyvumą tyrėme skirtingos sudėties terpėse, savybių. Kai kuriuos skirtumus galima paaiškinti, nevienoda ląstelių sienelių preparato paruošimo kokybe. Antagonistai geriau augo ir didesnę chitinazinį aktyvumą nustatėme, terpėje su mikromicetų *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* ir *F. oxysporum* ląstelių sienelių preparatu. Visų tirtų antagonistų aktyvumas terpėje su gliukoze buvo nedidelis ir ženkliai mažesnis nei terpėse su patogenų ląstelių sienelėmis. Akivaizdu, kad chitinazės šiems, tyrimui atrinktiems aktyvių mikromicetų kamienams, gali būti svarbios parazituojant kitus mikromicetus, o šie kamienai gali būti rekomenduojami kaip potencialūs bioagentai slopinant patogeniškų mikromicetų vystymąsi.

Mišrių mikromicetų kultūrų tyrimai, parodė, kad antagonistinis aktyvumas labai priklauso nuo vystymosi substrato, mūsų tyrimo atveju, nuo to, koks polisacharidas buvo auginimo terpėje. Geras antagonisto agresyvumas patogeno atžvilgiu standartinėje terpėje su lengvai pasisavinamu anglies šaltiniu – gliukoze, sumažėjo gliukozę pakeitus vienu iš polisacharidų (karboksimetilceliulioze, celiuliozės milteliais, filtriniu popieriumi, chitinu ar koloidiniu chitinu). Kai kuriais atvejais gavome priešingą efektą, kai aktyvesniu tapo patogenas, o tokie pasikeitimai priklausė nuo anglies šaltinio terpėje.

Užfiksavome ir skirtingus endogliukanazės aktyvumus pavienių ir mišrių mikromicetų auginimo terpėse. Palyginus pavienių mikromicetų ir jų mišrios kultūros su stipriu antagonistu *Trichoderma viride* vystymąsi ir auginimo terpėje sukauptos endogliukanazės aktyvumą, akivaizdus kai kurių kamienų suderinamumas su *Trichoderma*, pasireiškiantis sinergistiniu aktyvumu terpėje esančios celiuliozės atžvilgiu. Skyrėsi pavienių ir mišrių mikromicetų kultūrų auginimo terpės rūgštingumas, nuo kurio galėjo priklausyti ir endogliukanazės aktyvumas. Ryškiausiai terpės pH keitė augdamas grynoje ir mišrioje kultūroje su *Trichoderma* mikromicetas *Aspergillus niger*. Jis yra geras organinių rūgščių producentas, ir nors abiejų mikromicetų grynų kultūrų endogliukonazinis aktyvumas buvo didelis, mišrioje jis sumažėjo ženkliai. Ieškant kultūrų derinio padidinti perteklinių egzofermentų koncentracijas, svarbu parinkti optimalias sąlygas (pH ir temperatūra), kurias sunkiau suderinti mišriose kultūrose.

Atrinkti mikromicetų kamienai, kurie gautų rezultatų analizės pagrindu gali būti laikomi potencialiais celiuliazų ar chitinazių producentais, tačiau reikalingi tolimesni detalesni kiekvieno atrinkto mikromicetų kamieno fermentų ištyrimai sudarant bendrą fermentinės sistemos ir atskirų jos komponentų charakteristiką.

SUMMARY

The main purpose of this job was to investigate the community constitution of micromicetes from natural and anthropogenic sources, also to explore their activity with two natural polisacharides – cellulose and chitin. We investigated and compared relation between cellulolytic and chitinolytic micromicetes from two soils (humus and less humus soil). Also selected strains of micromicetes with enzymatic activity from media with various polisacharides. The biggest attention was turned to cellulose and cellulolytic micromicetes, but for comparison we investigated also anthropogenic substrates – paper remake waste and different phases of this process and relation between enzymatic activity of micromicetes. The research was made with stages, picking active strains on selective media with cellulolytic and chitinolytic activities and making detailed assay according to quantitative aspect. Established different abundance of micromicetes in two soils (accordingly 6,4 thousand and 80 thousand CFU/g dry soil).

There was different percentage of micromicetes utilizing cellulose or chitin and it depended on every soil micromicete activity and community structure. Cellulolytic micromicetes composed $\approx 70\%$ and 30% of general strains from humus and lack of organic matter soils. Complexes of micromicetes from soil differ from that of anthropogenic substrates, but some of them were the same and their cellulolytic activity was patent. Despite of micromicetes infection by air in cellulose remake substrates, the biggest part of micromicetes from these substrates with cellulose source developed very well and in some cellulose degrading substrates their concentration in selective media were even bigger than is standard media.

We selected 1550 strains of micromicetes, 27 species. Percentage of active micromicetes wasn't the same, it situated next: 42.85%, 28.57%, 79.24%, 37.51%, 26.08%, 32.69% and 39.70% every from this strain of general amount of isolates. Cellulolytic activity was different not only between different strains, but in one strain line it were observed some differences too (ex. *Trichoderma* strains). The biggest cellulolytic activity by this research was observed in these strains: *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Clonostachys* < *Gliocaldium*, *Myrothecium*, *Penicillium* ir *Trichoderma*.

Looking at quantitative endoglucanase and paper cellulase analysis results, the most active were *Penicilium funiculosum* (active strains 27.1%), *P. simplicissimum* (15.7%), *Stachybotrys chartarum* (7.5%) and *Aspergillus repens* (4.7%) micromicetes. *Gliomastix murorum* var. *murorum* and *Stachybotrys chartarum* were selected from anthropogenic substrates, others – selected from soil.

Relative chitinolytic activity observed in strain *Trichoderma*, almost all *Paecilomyces* and *Arthrotrrys* strains. The most active by endoglucanase activity micromicetes were *Metarhizium* and *Beuaveria* species. Cellulases are important not only degrading cellulose in

soil, but to plant pathogens, penetrating to plant cells at invasion time. Chitinases are important to antagonism process, whose efficacy depends not only on ability to compete for substrate, on secretion of antibiotics which blocks the development of other organism, but on hydrolytic enzymes too, which melts parasitical cell walls. Chitinases are the main player in enzymatic aggression process. The results showed that selected species, by this research, of micromycetes growing in media with one carbon source – chitin, can grow in media where the only carbon source is - pathogenic micromycetes cell walls. The endoglucanase activity of these micromycetes was similar to those growing in media with colloid chitin, which directly stimulated chitinase synthesis. Chitinases weren't stimulated in media, where the carbon source was cell walls of *Pythium ultimum*. There is absence of chitin in cell walls of this micromycete, but there is cellulose. The activity of chitinase depends on species characteristic of pathogen and antagonist. Some differences are caused by quality of cell walls preparation. Antagonists showed better chitinolytic activity in media with *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* and *F. oxysporum* cell walls and the activity of all antagonists in media with glucose was lesser than in media with pathogenic cell walls. These strains can be used as bioagents against pathogenic micromycetes. In mixed micromycete culture research showed that antagonistic activity depends on development on substrate, on type of polysaccharide. The antagonistic activity in media with glucose decreased in media with carboxymethylcellulose, cellulose flour, filter paper, chitin or colloid chitin. In some cases it was different – when pathogen was more active than antagonist. This depended on carbon source in media. There were different activities of endoglucanase in separate and mixed cultures of micromycetes in media. The acidity was different too. The biggest difference of acidity was in separate and mixed cultures with *Trichoderma* and *Aspergillus niger*. The endoglucanase activity of both micromycetes was big in separate cultures and decreased noticeably in mixed cultures. To find the combination of cultures for the aim to increase the concentrations of enzymes it is important to choose optimal conditions (pH and temperature), but it is difficult to match them in mixed cultures.

Chosen strains of micromycetes can be potential producers of cellulases and chitinases, but it is needed detailed analysis of every chosen enzyme for creating characteristic of general enzymatic system and their components.

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovei dr. D. Pečiulytei už kantrybę, pagalbą, vertingus patarimus bei pamokymus.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdel-sater M. A. Antagonistic interaction between fungal pathogen and leaf surface of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Biology Sciences*, 2001, vol 4(7), pp. 834–824;
2. Adrio J.L. Fungal biotechnology. 2003, vol 6(3), pp.191-9;
3. Bagdonienė L., Bendikienė V., Kadziauskas J., Markauskas A., Sabaliauskienė V., Sasnauskienė Z., Šeputienė V. Biochemijos laboratoriniai darbai. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2006, 153 p.;
4. Bayer E.A, Belaich J.P, Shoham Y., Lamed R. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*, 2004, 58: pp. 521-554;
5. Bartnicki-Garcia S., Bartnicki D.D, Gierz G., López-Franco R., Bracker C.E. Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp Mycol.*, 1995, vol 19(2), pp.153–159;
6. Beever R.E., Plummer K.M., Wurms K.V. Novel approaches to controlling fruit pathogens. *New Zealand Plant Protection*, 2005, vol 58, pp. 68–73;
7. Benitez T., Rincon A.M., Limbon M.C., Codon A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 2004., vol 7, pp. 249–260;
8. Berto P., Jijakli M.H., Lepoivre P. Possible role of colonization and cell wall-degrading enzymes in the differential ability of three *Oudemansii atrum* strains to control *Botrytis cinerea* on necrotic strawberry leaves. *Phytopathology*, 2001, vol 91, pp.1030–1036;
9. Bhat M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 2000, pp. 355-383;
10. Bhat M.K., Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology advances*. 1997, pp. 583–620;
11. Blevea G., Grieco F., Cozzip G., Logrieco A. and Viscontib A. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int J Food Microbiol.*, 2006, vol 108(2), pp. 9-204;
12. Bolar J. P., Norelli J.L., harman G.E., brown S.K., Aldwinckle H.S. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Trans. Res.*, 2001, vol 10, pp.533–543;
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 1976, vol 72, pp. 248-254.
14. Bradner J.R., Gillings M. and Nevalainen K.M.H. Qualitative assessment of hydrolytic activities in Antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media. *World J Microbiol Biotechnol*, 1999, vol 15, pp. 31–132;
15. Brand T. W., Wohanka W., Alsanius W. Enzyme activity assays for nutrient solutions from closed irrigation systems. *Scientia Horticulturae*, 2002, vol 92, pp. 329–338;
16. Brian B., Gardener McS., Fravel D.R. Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization and Application in the USA Department of Plant Pathology. *Plant Health Progress*, 2002;
17. Brown R.M., Willison J.H.M. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo Department of Botany, 1976, vol 73, pp. 4565-4569;
18. Brunner K., Zeilinger S., Ciliento R., Woo Sh., Kubicek L.M.C.P., Mach R.L. Movement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* To Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, pp. 3959 – 3965;

19. Bulik D.A., Olczak M., Lucero H.A., Osmond B.C., Robbins P.W., Specht C.A. Chitin Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Supplementation of Growth Medium with Glucosamine and Cell Wall Stress. *Eukaryotic Cell*, 2003, pp. 886-900;
20. Cao Y. and Huimin T. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Research*, 2002, vol 337, pp.1291-1296;
21. Carlile M. J. and Watkinson S. C. The fungi. Academic Press, 1997, pp. 269–275;
22. Carlson J., Siika-aho M., Tenkanen M., Tjerneld F. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cell2A (EGIII) and Cel45A (EGV) of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 2002, vol. 99, pp. 63-78;
23. Cavaco-Paulo A., Gübitz G. Catalysis and processing. In: Cavaco-Paulo A. and Gübitz G., editors. Textile processing with enzymes, 2003, pp. 86-119;
24. Cavaglieri L., Orlando J., Rodriguez M. I., Chulze S., Etcheverry M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 2005, vol 156, pp.748 – 754;
25. Chamberlain J., Going Organic. North and South, 2001, vol12, pp. 36-46;
26. Chigaleichik A. G., Pirieva D. A. and Rylkin S. S. Chitinases from *Serratia marcescens*. *Prikladnaya Biochim. Microbiol.*, 1976, vol 12, pp. 581–586;
27. Coral G., Arikan B., Unaldi M.N., Guvenmes H. Some properties of crude carboxymethyl of *Aspergillus niger* Z10 wild-type Strain. *Turk J. Biol.*, 2002, vol 26, pp. 209–213;
28. Coughlan M. Cellulases: production, properties and applications. *Biochemical Society Transactions*, 1985, vol.13, pp. 405-406;
29. Čekanavičius V., Murauskas G. Statistika ir jos taikymai, 2000, I. Vilnius: TEV, 239 p.;
30. De Marco J.L. and Felix C.R.Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BMC Biochemistry*, 2002;
31. De Marco J.L., Lima L.H., Sousa M.V., Felix C.R.A. *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, vol16, pp.383-386;
32. Elad Y., Stewart A. Microbial control of *Botrytis* spp. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N ed. *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer, Dordrecht. 2004, pp. 223–241;
33. El-Katatny M.H., Gudelj M., Robra K.H., Elnaghy M.A., Gubitz G.M. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, vol 56, pp.137-143;
34. Elmer P., Hoyte S.M., Vanneste J.L., Reglinski T., Wood P.N., Parry F.J. Biological control of fruit pathogens. *New Zealand Plant protection*, 2005, vol 58, pp.47–54;
35. Elmer P., Hoyte SM, Marsden RM, Parry F., Reglinski T. *Epicoccum nigrum*: a biological control agent for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in New Zealand Kiwifruit. The 5 International Symposium on Kiwifruit, 2002, p.60;
36. Elmer P., Reglinski T, Wood PN, Hill RA, Marsden SM, Parry F, Taylor JT Suppression of *Botrytis* in grapes using a combination of elicitors and fungal antagonists. 8th International Congress of Plant Pathology, 2003, p.43;
37. Elmer P.A.G., Reglinski T. Control of *Botrytis* bunch rot in grapes. *Plant Pathology*, 2006, vol 55, pp.155–177;
38. Enari T.M. Microbial cellulases. In: Fogarty W.F. (ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Sciences Publishers, 1983, pp.183–223;
39. Ghose T.K. Measurement of cellulose activities, *Pure Appl. Chem.*, 1987, vol 59, pp. 257–268;

40. GOHEL V., SINGH A., VIMAL M., ASHWINI P., CHATPAR H.S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Review. – African Journal of Biotechnology*, 2006, vol 5(2), pp. 54–72;
41. Gomes R.C., L.T.A.S. Smeme(r)Do, Soares R.M.A., Alviano C.S., Linhares L.F. and Coelho R.R.R. Chitinolytic actinomycetes from a Brazilian tropical soil active against phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, pp.109-110;
42. Gooday G. W. Cell walls In the Growing Fungus. Edited by N. A. R. Gow & G. M. Gadd. London: Chapman & Hall, 1995, pp. 43–62;
43. Gopinath S. C., Anbu P., Hilda A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, 2005, vol. 46, pp.119–126;
44. Gruno M., Våljamäe P., Pettersson G., Johansson G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulase by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, vol 86, pp. 503–511;
45. Gupta C. P., Kumar R. C., Dubey R. C., Maheshwari D. K. Chitinase-mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC₁ against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. *BioControl*, 2006, vol 51, pp. 821-835;
46. Gupta R.K., Shekhar N., Bhattacharya D., Kumar D. Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Microbiol.*, 2006, vol 52(9), pp. 805–808;
47. Handelsman J. and Eric V. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The plant Cell*, 1996, vol. 8, pp.1855 – 1869;
48. Hanif A., Yasmeen A., Rajoka M. I. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 2004, vol 94, pp. 311–319;
49. Harman G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 2000, vol 84, pp. 377-393;
50. Harman G.H., Charles R.H., Viterbo A., Chet I., Lorito M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Microbiology*, 2004, vol 2, pp.43–56;
51. Hendawy H.H., Osman M.E., Sorour N.M. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicataria* by *Rahnella aquatilis*. *Microbiological Research*, 2005, vol 160, pp. 343 – 352;
52. Howell C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.*, 2003, vol 87, pp. 4–10;
53. Howell C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.*, 2003, vol 87, pp. 4–10;
54. Ikram-ul-Haq M.M.J., Khan T.S. An innovative approach for hyper production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. *African Journal of Biotechnology*, 2006, vol 5(8), pp. 609–614;
55. Inglis G.D., Kawchuk L.M. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, vol 48, pp. 60-70;
56. Innocenti G., Roberti R., Montanari M., Zakrisson E. Efficacy of microorganisms antagonists to *Rhizoctonia cerealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. *Mycological Research*, 2003, vol107, pp. 421–427.
57. Yeoh H.H., Tan T.K. and Tian K. E. Cellulolytic enzymes of fungi isolated from wood materials. *Mycopathologia*, 2004, pp. 51-55;
58. Janisiewicz W.J., Korsten L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, vol 40, pp. 411-441;

59. Javed M.M., Khan T.S. An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. *African Journal of Biotechnology*, 2006, vol 5(8), pp. 609–614;
60. Kamal L., Mathur S.N. Cellulolytic activities of *Chaetomium globosum* on different cellulosic substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, vol. 5, pp. 23–26;
61. Katatny M. H., Somitsch W., Robra K. – H., Katatny M.S. and Gubitz G.M. Production of Chitinase and α -1,3 – glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food technology biotechnol.*, 2000, vol 38 (3), pp.173 – 180;
62. Klyosov A.A. Trends in biochemistry and enzymology. *Biochemistry*, 1990, vol 9, pp.10577–10585;
63. Kluczek-Turpeinen B., Maijala P., Tuomela M., Hofrichter M., Hatakka A. Endochitinase activity of compost-dwelling fungus *Paecilomyces inflatus* is stimulated by humic acids and other low molecular mass aromatics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, vol. 21, pp. 1603–1609;
64. Kūcūk C., Kivanc M. In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. *Turk J Biol.*, 2004, vol 28, pp.111–115;
65. Lahdenpera M.-L. The mode of action of *Gliocladium catenulatum* J1446. *Verdena Infroletter*, 2000, vol 9, pp.18–19;
66. Lee R., Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Pretorius I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 2002, vol.66, pp. 506–577;
67. Lee R., Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Pretorius I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 2002, vol.66, pp. 506–577;
68. Lima L.H.C., De Marco J.L., Ulhoa C.J., Felix C.R. Synthesis of *Trichoderma chitinase* which affects the *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *Folia Microbiol.*, 1999, vol 44(1), pp. 45-49;
69. Lima L.H.C., Ulhoa C.J., Fernandes A.P., Felix C.R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1997, vol 43, pp. 31-37;
70. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, vol 66(3), pp. 506–577;
71. Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H. and Pretorius I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular biology Reviews*, 2002, vol 66(3), pp. 506-577;
72. Lorito M., Hayes C.K., Di Pietro A., Woo S.L., Harman G.E. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan β -1,3-glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 1994, vol 84, pp. 398-405;
73. Lorito M., Harman G.E., Hayes C.K., Broadway R.M., Tronsmo A., Woo S.L., DI-PIETRO A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathol.*, 1994, vol 83, pp. 302-307;
74. Lorito M.; Woo S.L.; Fernández G.I.; Colucci G.; Harman G.E.; Pintor-Toro J.A.; Mach R., Zeilinger S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, vol 60, pp. 515–522;
75. Mahomed A. Abdel – Sater Antagonistic Interaction Between Fungal Pathogen and Leaf Surface Fungi of Onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Biology Sciences*, 2001, vol 4 (7), pp. 838 – 824;

76. Manisha V. Ch. Role of cell wall in the Dimorphism of *Benjaminea poitrasii*, 2001;
77. Martin K.L., McDougall B.M., Unkles S.E., Seviour R.J. The three β -1,3-glucanases from *Acremonium blochii* strain C59 appear to be encoded by separate genes. *Mycological research*, 2006, vol 110, pp. 66–74;
78. McManus P.S., Stockwell V.O., Sundin G.W., Jones A.L. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, vol 40, pp. 1143-1165;
79. Miettinen-Oinonen A., Londesborough J., Joutsjoki V., Lantto R. and Vehmaanperä J. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* with applications in the textile industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, vol 34, pp. 332-341;
80. Monte E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol.*, 2001, vol 4, pp. 1-4;
81. Montegut D., Indictor N. and Koestler R. J. Fungal deterioration of cellulosic textiles: a review. *Int. Biodeterior.*, 1991, vol 28, pp. 209–226;
82. Nierstrasz V., Warmoeskerken M. Process engineering and industrial enzyme applications. In: Cavaco-Paulo A. and Gübitz G., editors. *Textile processing with enzymes*, 2003, pp. 120-157;
83. Nishise H. A., Ogawa Y. T. and Yamada H. Studies on microbial glycerol dehydrogenase 4: glycerol dehydrogenase and glycerol dissimilation in *Cellulomonas* sp. NT3060. *Agric. Biol. Chem.*, 1985, vol 49, pp. 629–636;
84. Okigbo R.N. Biological control of postharvest fungal rot of yam (*Dioscorea* spp.) with *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia*, 2005, vol 159, pp. 307–314;
85. Oksanan T., Pere J., Paavilainen I., Büchert J., Viikari L. Treatment of recycled craft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases. *J. Biotechnol.*, 2000, vol. 78; pp. 39–48;
86. Onsoni H., Zamani M.R., Matallebi M., Zarghami N. Identification of over producer strain of endo- β -1,4-glucanase in *Aspergillus* Species: Characterization of crude carbozymethyl cellulose. *African Journal of Biotechnology*, 2005, vol 4(1), pp. 26–30;
87. Papavizas G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopat.*, vol 23, 23-54, 1985;
88. Penttilä M., Limon C., Nevalainen H. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. In: Arora D., editor, Marcel Dekker, Inc. *Handbook of fungal biotechnology*, 2004, pp. 413-427;
89. Perez-Leblec M.I., Reyes F., Martinez M.J., Lahoz R. Cell wall degradation in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathologia*, 1982, vol 80(3), pp. 147–195;
90. Picard K., Tirilly Y. Cytological Effects of Cellulases in the Parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Environmental Microbiology*, 2000, vol 66, pp. 4305-4314;
91. Pochanavanich P., Suntornsuk W. Fungal chitosan production and its characterization. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2002, vol 35(1), pp.17–21;
92. Poulsen O. M. and Petersen L. W. Growth of *Cellulomonas* sp. ATCC 21399 on different polysaccharides as sole carbon source induction of extracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1988, vol 29, pp. 480–484;
93. Rajoka M. I. and Malik K. A. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. *Biores. Technol.*, 1997, vol 59, pp. 21–27;
94. Raven J.A. The transport and function of silicon in plants. *Biol. Rev.*, 1983, vol 58, pp. 179–207;
95. Rosslenbroich H.J., Stuebler D. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 2000, vol 19, pp. 557-561;
96. Schwarz W.H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, vol 56, pp. 634–649;

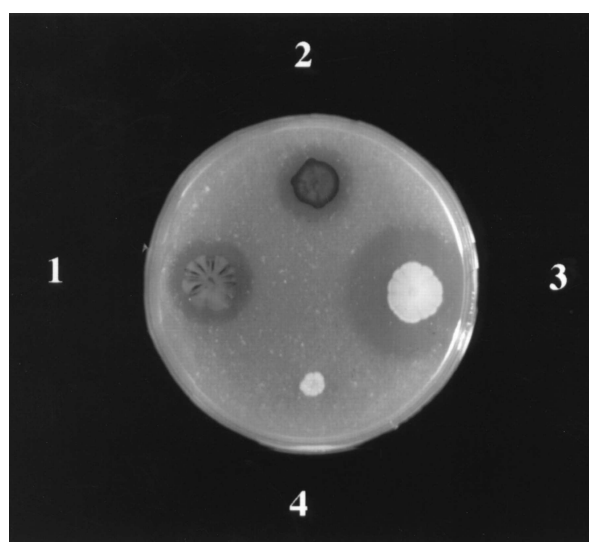
97. Sela-Buurlage M.B., Ponstein A.S., Bres-Vloemans S.A., Melchers L.S., Van Den Elzen P.J.M., Cornelissen B.J.C. Only specific tobacco (*Nicotinia tabacum*) chitinases and beta-1, 3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology*, 1999, vol 101, pp. 857–863;
98. Shekhar N., Bhattacharya D., Kumar D., and Gupta R.K. Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2 *Microbiol.*, 2006, vol 52(9), pp. 805–808;
99. Shoda M. Bacterial Control of Plant Diseases. *Japan Journal of bioscience and bioengineering*, 2000, vol 89; pp. 515–521;
100. Shternshis M.V., Beljaev A.A., Shpatova T.V., Alexander B. Duzhak A.B., Panfilova Z.I. The Effect of Chitinase on *Didymella applanata*, the Causal Agent of Raspberry Cane Spur light. *BioControl*, 2006, vol 51(3), pp. 311–322;
101. Shubakov A. A., Kucheriavykh P.S. Chitinolytic activity of filamentous fungi. *Biokhim. Mikrobiol.*, 2004, vol 40(5), pp. 517–519;
102. Sivan A. and Chet I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*, 1989, vol 135, pp. 675–682;
103. Soares A.C.F., Sousa C. da S., Garrido M, da S., Perez J.O., De Almeida N.S. Soil *Streptomyces* with *in vitro* activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Braz. J. Microbiol.*, 2006, vol 37(4), pp. 456–461;
104. Steyaert J.M., Ridway H.J., Elad Y., Stewart A. Genetic basis of mycoparasitism; a mechanism of biological control by species *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 2003, vol 31, pp. 281–291;
105. Stewart J.C., Stewart C. S., Heptinstall J. The use of tritiated cellulose in screening for cellulolytic microorganisms. *Biotechnology Letters*, 1982, vol 4, pp. 459–464;
106. Szekeres A., Hatvani L., leitgeb B. Colony morphology mutants of *Trichoderma harzianum* with increased β -1,4-N-acetyl-glucosaminidase production. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2007, vol 54(1), pp. 23–34;
107. Teeri T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.*, 1997, vol 15, pp. 160–167;
108. Thomas R. C. Composition of fungus hyphae III. The *Pythiaceae*. Ohio Agriculture Experimental Station, 1956, vol152(2), pp. 60–62;
109. Tikhonov V.E., Lopez L.V. – Llorca, Salinas J. and Jansson H-B Purification and Characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, vol 35, pp. 67 – 78;
110. Updegraff D. M. Utilization of cellulose from waste paper by *Myrothecium verrucaria*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, vol 13, pp.77–97;
111. Van Wyk J. P. H., Mohulatsi M. Biodegradation of waste-paper by cellulose from *Trichoderma viride*. *Bioresource Technolog*, 2003, vol 86, pp. 21–23;
112. Wang D., Qu Y.B., Gao P.J. The mechanism of increasing cellulase biosynthesis rate in *Trichoderma* by L-sorbose. *Acta Mycol. Sinica*, 1995, vol 14, pp.143–147;
113. White A. Children Pesticides and Cancer. *The Ecologist*, 1998, vol 28(2), pp.100–105;
114. Witkowska D.M. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* spp. And their effect on the growth of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiologica*, 2002, vol 47(3), pp. 274–282;
115. Wolffhechel H., Jensen D.F. Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* for the biological control of post-emergence damping-off and the root rot of cucumbers caused by *Pythium ultimum*. *J. Phytopathol.*, 1992, vol 136, pp. 221–230;
116. Wu T., Zivanovic S., Draughon F.A., Cdnway W.S., Sams C.E. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *J. Agric. Food Chem*, 2005, vol 53(10), pp. 3888–3894;

117. Xia G., Jin C., Zhou J., Yang S., Zhang S. and Jin C. A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ – 407 *Eur. J. Biochem.*, 2001, vol 268, pp. 4079 – 4085;
118. Громовых Т.И., Литовка Ю.А., Громовых В.С., Махова Е.Г. Эффективность действия *Trichoderma asperillum* (Штамм МГ-97) на развитие фузариоза на семенах *Larix sibirica* // *Микология и Фитопатология*, 2002, Т. 36, № 4, 70–75;
119. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1991, 303 с.
120. Чигалейчик А.Г., Пириева Д.А. Хитиназа *Serratia marcescens* ВКМ В-851. *Прикладная биохимия и микробиология*, 1981, Т. 12, вып. 4, с. 581–586;
121. www.isth.info/biocontrol.php
122. www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/26a.htm

PRIEDAS

1 lentelė. Grybų sienelės komponentai (pagal Gooday, 1995):

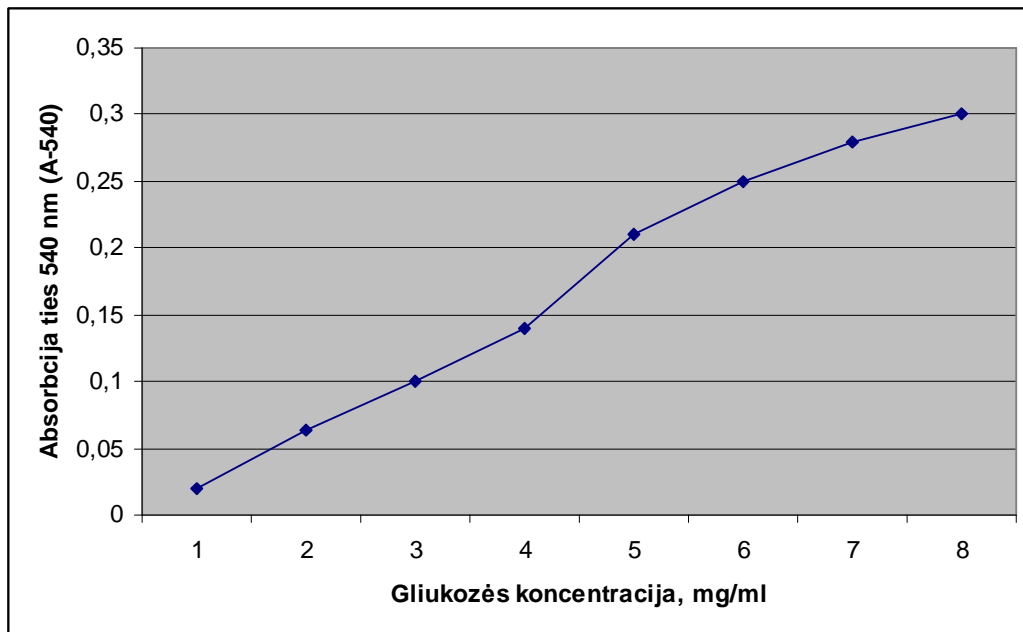
Mikromicetai	Sienelės komponentai
<i>Basidiomycota</i>	Chitinas, β -(1-3), β -(1-6) gliukanai, ksilomanoproteinai, α (1-3) gliukanai.
<i>Ascomycota</i>	Chitinas, β -(1-3), β -(1-6) gliukanai, galaktomanoproteinai, α (1-3) gliukanai.
<i>Zygomycota</i>	Chitinas, chitozanas, poligliukuroninė rūgštis, gliukuronomanoproteinai, polifosfatai.
<i>Chytridiomycota</i>	Chitinas, gliukanai.



1 pav. Chitinazinio aktyvumo vertinimas pagal sterilių zonų susidarymą mineralinėje terpėje su koloidiniu chitinu (2% drėgno chitino). Skirtingų mikroorganizmų grupių chitinazinio aktyvumo vertinimas: 1 – bakterija, 2 – aktinomicetas, 3 – mikromicetas, 4 – chitinazinis aktyvumas neužfiksuotas.

2 lentelė. Gliukozės kalibravimo kreivės sudarymas

Gliukozės koncentracija, mg/ml	Gliukozės darbinio tirpalo kiekis, ml	dd H ₂ O kiekis, ml	Skiedimas
2.0	1	4.0	1 : 5
3.3	1	2.0	1 : 3
5.0	1	1.0	1 : 2
6.7	1	0.5	1 : 1.5

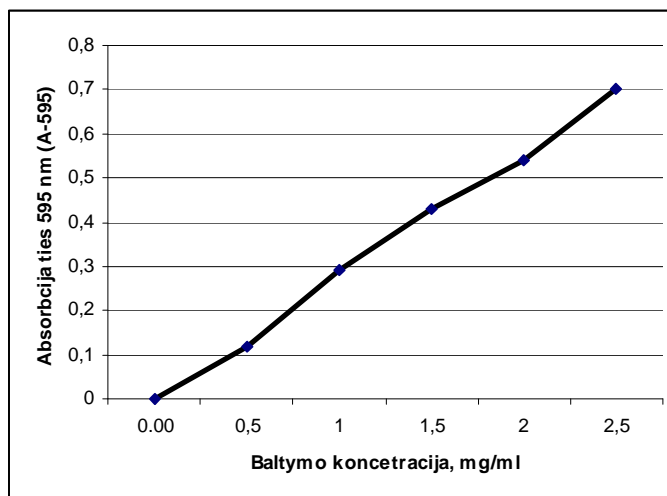


2 pav. Gliukozės koncentracijos kalibravimo kreivė

3 lentelė. Baltymo kalibravimo kreivės sudarymas

Baltymo koncentracija mg/ml	Paruoštos koncentracijos baltymo kiekis*, μ l	dd H ₂ O kiekis, μ l	Bredfordo reagento kiekis, μ l
0	0	5	250
0.4	1	4	250
0.8	2	3	250
1.2	3	2	250
0.6	4	1	250
2.0	5	0	250

*Darbinis baltymo tirpalas paruošiamas sekančiai: 0.02 g jaučio albumino ištirpiname 10 ml distiliuoto vandens. Gaunama 2 mg/ml baltymo koncentracija.



3 pav. Baltymo koncentracijos kalibravimo kreivė



Čapeko terpė + gliukozė (20%)



Č. + KMC (4%)



**Č. + kristalinė
celiuliozė (4%)**



Č. + chitinas (4%)

4 pav. Dvigubos (dual) patogeno *Alternaria alternata* ir antagonisto *Trichoderma harzianum* kultūros po 7 kultivavimo parų ant standžios Čapeko terpės su skirtingais anglies šaltiniais.



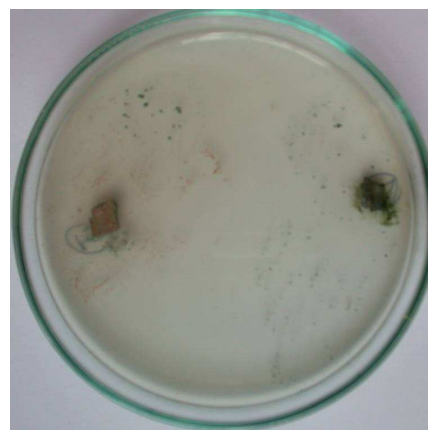
Čapeko terpė + gliukozė (20%)



Č. + KMC (4%)

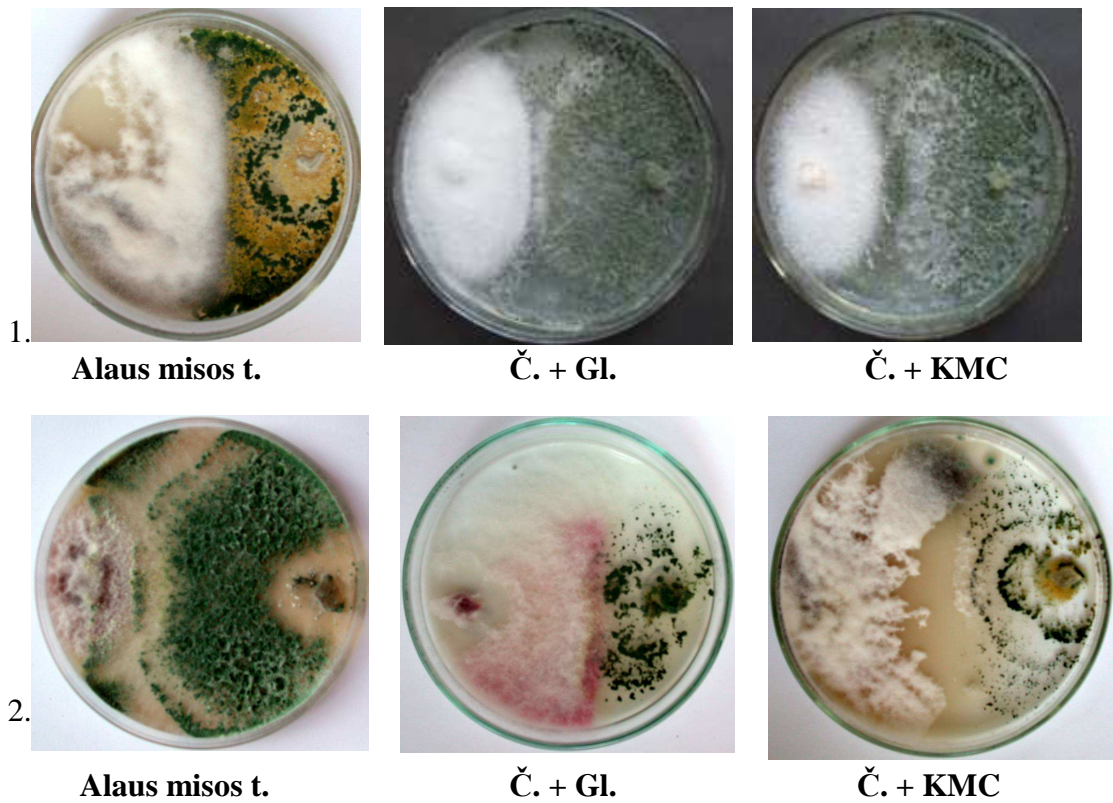


Č. + kristalinė celiuliozė (4%)

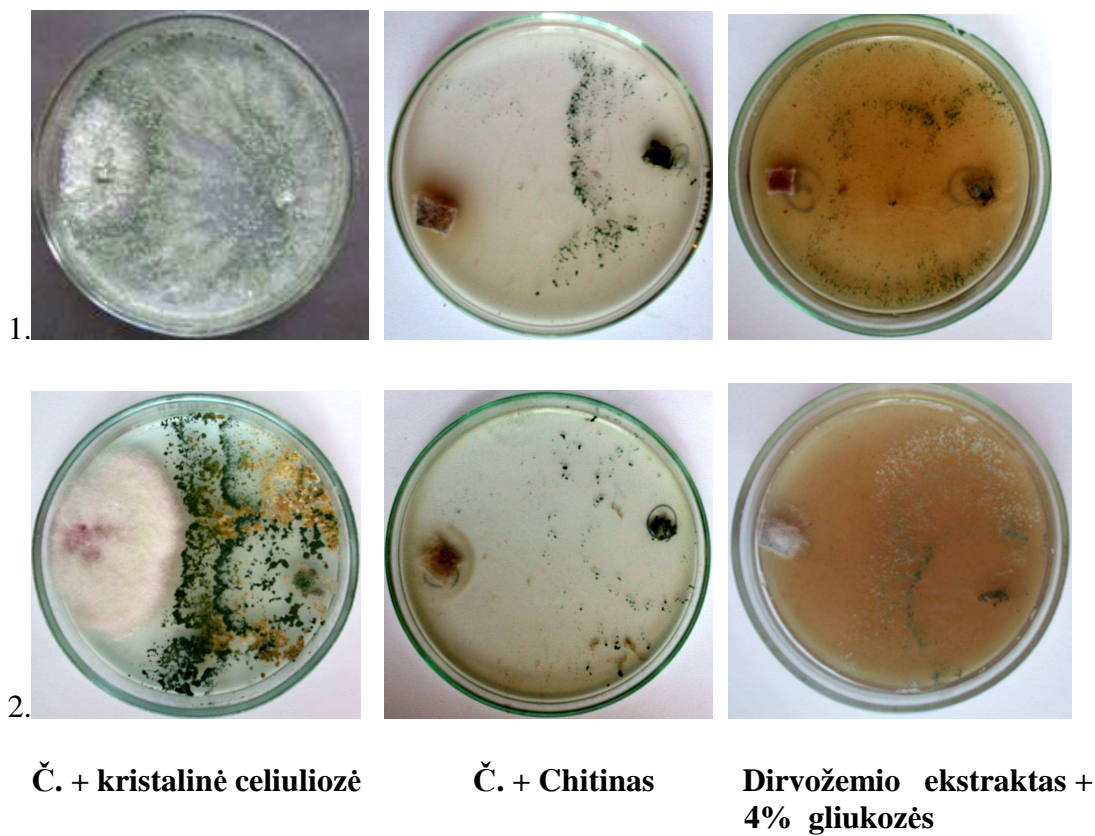


Č. + chitinas (4%)

5 pav. Dvigubos (dual) patogeno *Botrytis cinerea* ir antagonisto *Trichoderma harzianum* kultūros po 7 kultivavimo parų ant standžios Čapeko terpės su skirtingais anglies šaltiniais.



6 pav. Dvigubos (dual) patogenų *Fusarium oxysporum* (1) bei *Fusarium avenaceum* (= *Gillberella avenacea*) (2) ir antagonisto *Trichoderma harzianum* kultūros skirtingos sudėties terpėse.



7 pav. Dvigubos (dual) patogenų *Fusarium oxysporum* (1) bei *Fusarium avenaceum* (= *Gillberella avenacea*) (2) ir antagonisto *Trichoderma harzianum* kultūros skirtingos sudėties terpėse