

УДК 579.26+579.22

**РІЗНОМАНІТТЯ АНТАРКТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ – ПОТЕНЦІЙНИХ ПРОДУЦЕНТІВ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ СПОЛУК****Т. О. Кондратюк, Т. В. Берегова, Л. І. Остапченко***Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Володимирська, 64/13,  
e-mail: takbiofak@ukr.net*

**Реферат.** Пошук нових продуцентів біологічно-активних сполук, які можуть широко застосовуватися в різних галузях людської діяльності, інтенсивно ведеться серед різноманіття мікроорганізмів, місця існування яких пов'язані з екстремальними умовами, зокрема в Антарктиді. Проведення відповідних досліджень з цього актуального питання становило мету даної роботи. Із досліджених зразків мохів, лишайників, ґрунту та каміння, отриманих у 18–20-й Українських антарктичних експедиціях (о. Галіндез, о. Піттерман, о. Ялур), ізольовано 25 чистих культур мікроскопічних грибів (види родів *Mortiriella*, *Mucor*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhodotorula* та ін.). Серед них *Pseudogymnoascus pannorum* та *Mucor circinelloides* характеризуються яскраво вираженою активністю до синтезу комплексу ліпідів. Ізольовано також 8 чистих культур бактерій, що синтезують біологічно-активні речовини, здатні пригнічувати ріст інших мікроорганізмів (проявляють яскраво виражені антагоністичні властивості). Колекцію технологічно перспективних штамів мікроорганізмів поповнено новими видами мікроскопічних грибів та бактерій – продуцентів біологічно активних сполук.

**Разнообразие антарктических микроорганизмов – потенциальных продуцентов биологически-активных соединений****Т. А. Кондратюк, Т. В. Береговая, Л. И. Остапченко**

**Реферат.** Поиск новых продуцентов биологически-активных соединений, которые могут широко использоваться в разных сферах человеческой деятельности, интенсивно ведется среди разнообразия микроорганизмов, места существования которых связаны с экстремальными условиями, в частности в Антарктиде. Проведение соответствующих научных исследований в этом актуальном направлении составляло цель данной работы. Изучение образцов мхов, лишайников, ґрунта и камней с антарктических островов Галіндез, Піттерман, Ялур (18–20-я Украинские антарктические экспедиции) позволило выделить 25 чистых культур микроскопических грибов (виды родов *Mortiriella*, *Mucor*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhodotorula* и др.). Среди них *Pseudogymnoascus pannorum* и *Mucor circinelloides* характеризуются ярко выраженной активностью синтезировать комплекс липидов. Изолировано также 8 чистых культур бактерий, которые синтезируют биологически-активные вещества, способные угнетать рост других микроорганизмов (проявляют ярко выраженные антагонистические свойства). Коллекцию технологически перспективных штаммов микроорганизмов пополнили новыми видами микроскопических грибов и бактерий – продуцентов биологически-активных соединений.

**Diversity of Antarctic microorganisms – potential producers of biologically active substances**

T. O. Kondratiuk, T. V. Bereгова, L. I. Ostapchenko

**Abstract.** Search for new producers of biologically active compounds that can be widely used in various fields of human activity is intense among the variety of organisms, habitats of which are connected with the extreme conditions of existence, including Antarctica. The purpose of this work was conducting relevant research on this topical issue. 25 isolation of pure cultures of microscopic fungi (species of *Mortiriella*, *Mucor*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhodotorula* etc.) were obtained from the samples of mosses, lichens, soil and stones obtained from 18-20th Ukrainian Antarctic expedition (Galindez, Pitterman and Yalur Islands). Among them *Pseudogymnoascus pannorum* and *Mucor circinelloides* are characterized by a pronounced activity to the synthesis of complex of biologically active lipids. 8 pure cultures of bacteria were also isolated that synthesize biologically active substances which can inhibit the growth of other microorganisms (pronounced antagonistic properties were observed). Collection of technologically advanced microorganisms replenished with new strains of microscopic fungi and bacteria - producers of biologically active compounds.

**Key words:** Antarctic microorganisms, collection of technologically advanced microorganisms

## 1. Вступ

Розвиток біотехнології, що заснована на використанні потенціалу мікроорганізмів в отриманні біологічно активних сполук (БАС), є одним із стратегічних напрямків сучасної світової науки. В основу стратегії пошуку нових продуцентів БАС покладено наступні принципи: специфічність (екстремальність) місцєіснування виду (штаму), в тому числі приналежність до регіону, з якого раніше вже було виділено продуценти; таксономічне положення виду (штаму), його культурально-морфологічні, фізіологічні, біохімічні та молекулярно-генетичні особливості. Вказані особливості мікроскопічних грибів екстремальних місцєіснують, які зберігають життєздатність та розвиваються за умов дії екстремальних факторів довкілля, зокрема Антарктики, досліджуються з метою з'ясування адаптаційних механізмів цих мікроорганізмів до умов існування та продукування ними БАС [Kostadinova et al., 2009; Margesin et al., 2005; Nai et al., 2013]. Отже, серед мікроскопічних грибів, продуцентів БАС, на особливу увагу заслуговують ті, які можуть зберігати життєздатність і розвиватися в екстремальних умовах, зокрема в Антарктиці [Henríquez et al., 2013; Svahn et al., 2015], оскільки вони є потужними потенційними джерелами метаболітів із протимікробною та антифунгальною активністю, що можуть бути об'єктами фармацевтичної індустрії. З'ясовано, що метаболіти міцеліальних грибів Антарктики здатні інгібувати ріст *Staphylococcus aureus* [Henríquez et al., 2013]. Шведськими дослідниками отримано новий антифунгальний метаболіт амфотеріцин, який проявляє активність щодо дріжджоподібних грибів *Candida albicans*. Продуцентом амфотеріцину є міцеліальний грибок Антарктики *Penicillium nalgiovense* Laxa, отриманий з антарктичних зразків [Svahn et al., 2015]. Встановлено також, що 12 видів грибів роду *Penicillium*, ізольованих з екологічних ніш Арктики та Антарктики, є продуцентами БАС різних структурних типів (зокрема, ергоалкалоїдів), яким притаманні антибактеріальні, антифунгальні, протипухлинні та інші властивості [Антипова, 2009]. Для мікроскопічних міцеліальних грибів *Geomyces pannorum*, виділених із біотопів Антарктики, показана підвищена ліпогенна активність. Таку особливість метаболізму цих мікроміцетів пов'язують із стратегією виживання в умовах дії стресових (екстремальних) факторів довкілля [Копова et al., 2009]. Широких перспектив зазнає здатність грибів до «суперсинтезу» ліпідів у технічних галузях, зокрема для отримання біодизелю з використанням відходів сільського господарства, харчової промисловості тощо [Феофилова, 2007; Ткачевская и др., 2007]. Для бактерій, виділених з антарктичних зразків, встановлена здатність проявляти антибактеріальну та антифунгальну активність, синтезувати ряд сполук, перспективних для використання у біотехнологічній індустрії (фармацевтичній, харчовій галузях тощо). Екзополісахариди цих мікроорганізмів можуть використовуватися як біосурфактанти в процесах детоксикації ґрунтів, забруднених нафтопродуктами [Poli et al., 2010; Anitori, 2012; Pava et al., 2013; Asencio et al., 2014]. Отже, з огляду на актуальність висвітлених вище питань, метою нашої роботи є пошук продуцентів БАС серед різноманіття антарктичних мікроорганізмів (бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів), встановлення їх біологічних особливостей та поповнення колекції технологічно перспективних штамів мікроорганізмів новими видами.

## 2. Матеріали та методи досліджень

Матеріалом для проведення наших досліджень слугували зразки мохів, лишайників, ґрунту та каміння (з островів Галіндез, Піттерман, Ялур), отриманих у 18–20-й Українських антарктичних експедиціях (рис. 1).



Рис. 1. Зразки моху, ґрунту та лишайників, що використовували для досліджень

Виділення чистих культур мікроорганізмів з антарктичних зразків здійснювали із застосуванням стандартних мікробіологічних методів культивування на агаризованих та рідких живильних середовищах: Malt extract agar (MEA), Malt extract broth (MEB), Nutrient Agar (NA), Nutrient broth (NB), агар Чапека–Докса, картопляно-глюкозний агар (КГА) [Samson et al., 2004], середовище Сабуро, триптіказо-соевий бульон (ТСБ) та ін. (виробництва «Фармактив», Україна; Merck KGaA, Німеччина; Hi Media Laboratories, Індія та ін.). Оцінку росту на агаризованих середовищах проводили візуально (констатували наявність або відсутність колоній мікроорганізмів в накопичувальних культурах). Застосовували сучасні методи ідентифікації ізольованих мікроорганізмів та визначення їх особливостей (культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних). Визначення фізіолого-біохімічних характеристик та ідентифікацію культур бактерій проведено з використанням відповідних ID-карток та мікробіологічного аналізатору «Vitek-2» («Bio Merieux», Франція). Морфологічні особливості мікроорганізмів (дослідження клітин та спор) визначали із застосуванням бінокулярних мікроскопів Primo Star компанії Carl Zeiss. Використовували також тринокулярний мікроскоп Primo Star компанії Carl Zeiss (оснащений відповідною відео-фотокамерою) для фотографування препаратів, вимірювання необхідних параметрів (діаметру клітин та спор мікроорганізмів, відстані між клітинами тощо) здійснювали за допомогою морфометричної комп'ютерної програми AxioVision 4.8 (Carl Zeiss). Застосовували також сканувальну електронну мікроскопію (SEM JSM-6060 LA, Японія).

## 3. Результати та обговорення

Із досліджених зразків мохів, лишайників, ґрунту та каміння, отриманих у 18–20-й Українських антарктичних експедиціях, ізольовано 25 чистих культур мікроскопічних грибів, що віднесено до відділів Zygomycota (види родів *Mortiriella*, *Mucor*), Ascomycota (*Eurotium* sp.) та групи *Anamorphice-fungi* (представники родів *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Geomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhodotorula*). Серед них на особливу увагу заслуговують мікроскопічні гриби із яскраво вираженою активністю до синтезу комплексу біологічно активних ліпідів, жирних кислот. Це – *Geomyces pannorum* (Link) Sigler & J.W. Carmich. (сьогодні входить як синонім до *Pseudogymnoascus pannorum* (Link) Minnis & D.R. Lindner)) та представник порядку Mucorales *Mucor circinelloides* Tiegh. (рис. 2, 3).

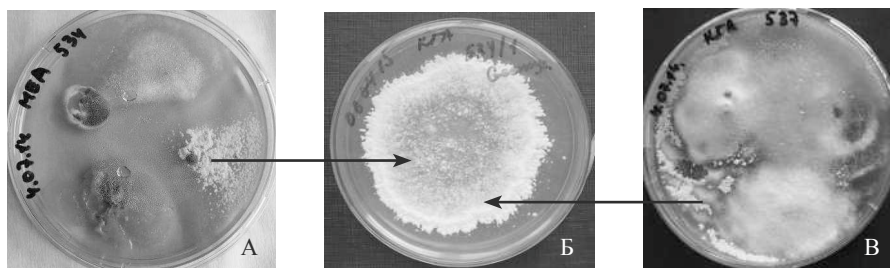


Рис. 2. Мікроскопічні гриби *Pseudogymnoascus pannorum* (А, В – в накопичувальній культурі, Б – чиста культура), ізольовані із антарктичних проб мохів.

Встановлено, що мікроскопічні гриби *Mucor circinelloides* та *Pseudogymnoascus pannorum* виявили здатність синтезувати та накопичувати ліпіди у гіфах у вигляді ліпідних гранул, включень (рис. 3). Встановивши жирнокислотний склад ліпідів цих грибів на різноманітних живильних середовищах, можна визначити оптимальні умови для синтезу біологічно важливих ліпідів. Останні можуть використовуватися для синтезу антибіотиків, як енергетичні джерела (біодізель), для створення медичних препаратів, що вміщують есенціальні жирні кислоти та убіхінон Q-9. Можливість культивування цих мікроорганізмів на відходах сільськогосподарської та харчової промисловості робить їх застосування зручним та економічно вигідним [Tauk-Tornisielo et al., 2009; Bhanja et al., 2014].

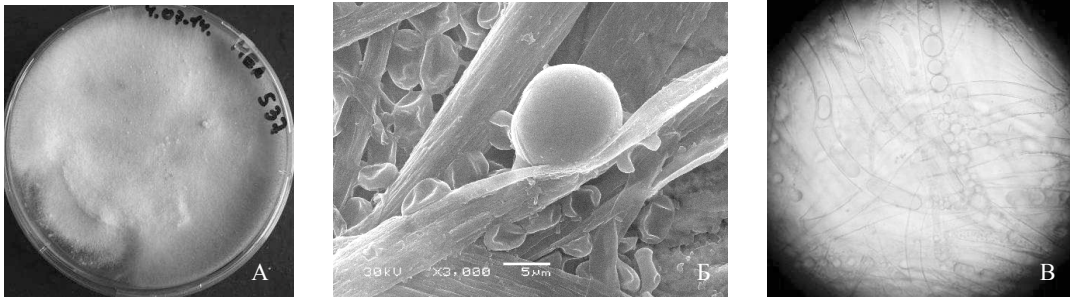


Рис. 3. Мікроскопічні гриби *Mucor circinelloides* (А, Б) із антарктичних проб мохів, В – гранули ліпідів в гіфах *M. circinelloides*,  $\times 400$

Із досліджених антарктичних зразків ізольовано також мікроскопічні гриби роду *Penicillium*, відомі, зокрема, тим, що є продуцентами 380 вторинних метаболітів з біологічною активністю (рис. 4). Особливий практичний інтерес представляють алкалоїди грибів роду *Penicillium*, які знайшли широке застосування в медицині [Антипова, 2009].

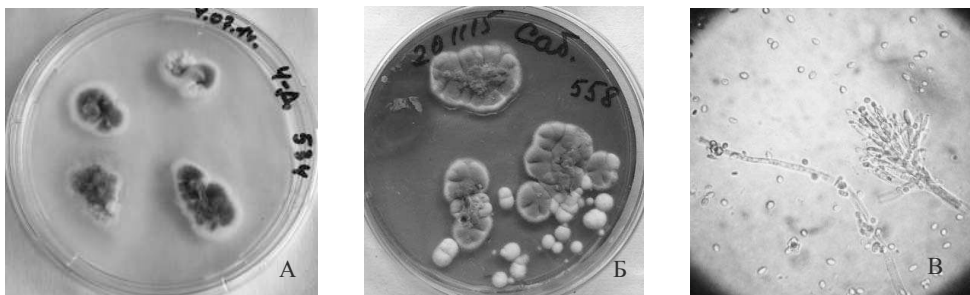


Рис. 4. Гриби роду *Penicillium*, ізольовані із антарктичних проб ґрунту (А) та мохів (Б). В -  $\times 400$

У процесі роботи із антарктичними зразками ми враховували візуально добре помітні стерильні зони навколо мікроорганізмів в накопичувальних культурах (рис. 5).

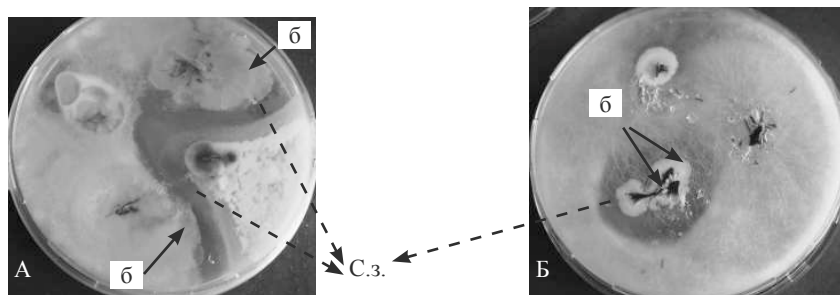


Рис. 5. Бактерії із антарктичних зразків у накопичувальних культурах (А, Б – зворотній бік чашок Петрі); б – колонії бактерій, що пригнічують ріст міцеліальних грибів; С. з. – стерильні зони, які утворились навколо колоній бактерій-антагоністів.

Із досліджених зразків нами виділено 8 чистих культур бактерій, що синтезують біологічно-активні речовини, здатні пригнічувати ріст інших мікроорганізмів (проявляють яскраво виражені антагоністичні властивості). Встановлено, що серед виділених бактерій є грампозитивні та грамнегативні палички, споруутворювальні види (рис. 6).

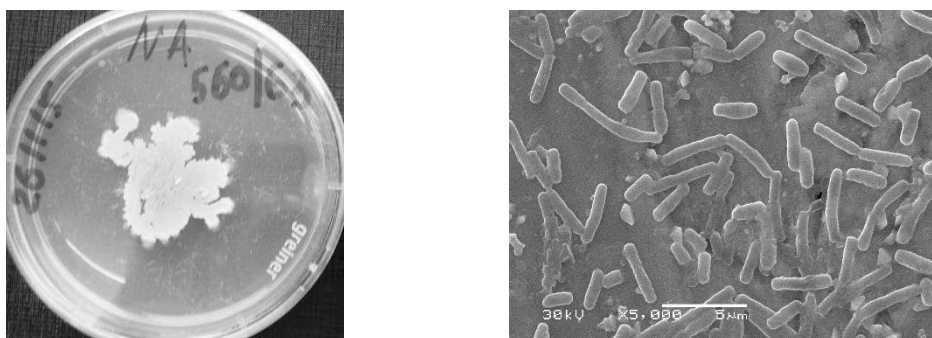


Рис. 6. Чиста культура споруутворювальних бактерій, ізолюваних з антарктичних зразків

За допомогою мікробіологічного аналізатора Vitek-2 в ізолюваних бактеріальних культурах виявлено низку фізіолого-біохімічних особливостей (таблиця).

Таблиця

Фізіолого-біохімічні особливості бактерій, ізолюваних з антарктичних зразків

Ферменти, що продукують ізолювані бактерії	Виділені культури бактерій (№№ ізолятів)			
	537/1В	537/1В*	534/1В	534/2В
β-ксилозидаза	+	+	–	–
гліцин-ариламідаза	+	–	–	–
β-глюкозидаза	+	+	+	+
γ-глутаміл-трансфераза	–	–	+	–
уреаза	–	–	+	+
фосфатаза	–	–	+	+
Здатність до асиміляції субстратів				
D-мальтоза	–	–	+	–
піруват	+	+	–	–
D-маніт	+	+	+	–
D-трегалоза	+	+	+	–
фосфорилхолін	–	+	–	–
D-рибоза	–	+	–	–
Продуктування H <sub>2</sub> S	–	–	+	+
Ріст при 6,5% NaCl	+	+	–	–

Встановлені морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості дозволили охарактеризувати таксономічну приналежність двох культур бактерій: *Bacillus sp.* (ізолят 537/1В) та *Sphingobacterium thalporphilum* (ізолят 534/2В).

Отримані нами дані щодо антагоністичних властивостей бактерій роду *Bacillus* узгоджуються з результатами досліджень інших авторів, які вивчали представників цього роду бактерій, ізольованих з різних середовищ з екстремальними умовами існування [Ali et al., 2014]. Щодо представників роду *Sphingobacterium*, виділених із екстремальних місцевостей, то дані бактерії представляють інтерес як потенційні продуценти каротиноїдів, зокрема бета-каротину, та сфінгофосфоліпідів [Jagannadham et al., 2000; Kaneshiro et al., 1996]. Встановлено, що психротолерантні бактерії *Sphingobacterium antarcticus* за температури 5° С синтезують каротиноїди в значно більших кількостях, ніж мезофільні *S. multivorum* за температури 25° С [Jagannadham et al., 2000]. Отже, представники роду *Sphingobacterium*, виділені нами із антарктичних зразків, представляють інтерес як потенційні продуценти БАС.

#### 4. Висновки

У результаті проведених нами досліджень колекцію технологічно перспективних штамів мікроорганізмів поповнено новими видами мікроскопічних грибів та бактерій – продуцентів БАС.

Отримані нами результати та дані літератури вказують на необхідність проведення подальших досліджень із встановлення хімічної структури БАС ізольованих мікроорганізмів.

**Подяки.** Автори висловлюють подяку В. І. Сапсаю (Київ) за допомогу в проведенні досліджень на скануючому електронному мікроскопі, П. П. Зелений та О. О. Морганко – за допомогу в проведенні досліджень з використанням мікробіологічного аналізатора Vitek-2 та в процедурі фарбування за Грамом; Національному Антарктичному центру МОН України – за фінансову підтримку в проведенні досліджень (Договір № 15ДФ036-06/Н/12-2015).

#### Список літератури

1. Антипова Т. В. Штаммы-реликты грибов рода *Penicillium* как продуценты вторичных метаболитов // Автореф. дис. к.б.н. – 2009. – 22 с.
2. Феофилова Е. П. Новые биотехнологии получения биологически активных веществ из мицелиальных грибов // Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. IX. – С. 195 – 196.
3. Ткачевская Е. П., Конова И. В., Сергеева Я. С. и др. Новые направления практического использования олеагенных грибных микроорганизмов (р. *Cunninghamella* и др.) в получении биодизеля и для модификации синтетических полимеров // Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. IX. – С. 190 – 194.
4. Ali S., Hameed S., Imran A. et al. Genetic, physiological and biochemical characterization of *Bacillus* sp. strain RMB7 exhibiting plant growth promoting and broad spectrum antifungal activities // Microb. Cell Fact. – 2014. – V. 13. – P. 144 – 159.
5. Asencio Geraldine, Lavin Paris, Alegria Karen et al. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria // Electron. J. Biotechnol. – 2014. – [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-34582014000100001-calibre\\_link-54V.17.-no.1.-P.1-5](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582014000100001-calibre_link-54V.17.-no.1.-P.1-5).
6. Bhanja A., Minde G., Magdum S., Kalyanraman V. Comparative studies of oleaginous fungal strains (*Mucor circinelloides* and *Trichoderma reesei*) for effective wastewater treatment and bio-oil production // Biotechnol. Res. Int. – 2014. – Vol. (2014). – P. 1 – 7.
7. Henriquez M., Chaves R., Vagal. Antarctic fungi: Sources of new chemical substances with antibacterial properties // Chilean Antarctic Bulletin. – 2013. – 13 (1–2). – P. 12.
8. Jagannadham M. V., Chattopadhyay M. K., Subbalakshmi C. et al. Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus* and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum* // Arch. Microbiol. – 2000. – 173 (5–6). – P. 418 – 24.
9. Kaneshiro T., Nakamura L.K., Bagby M.O. Oleic acid transformations by selected strains of *Sphingobacterium thalophilum* and *Bacillus cereus* from composted manure // Current microbiology – 1996. – V. 31, Is. 1. – P. 62–67.
10. Konova I. V., Sergeeva E., Galanina L.A. et al. Lipid synthesis by *Geomyces pannorum* under the impact of stress factors // Mikrobiologiya. – 2009 – V. 78 (1). – P. 52 – 58.

11. **Kostadinova N.**, Krumova E., Tosi S. et al. Isolation and Identification of Filamentous Fungi from Island Livingston, Antarctica // *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, Special Issue: XI Anniversary scientific conference. – 2009. – V. 23, Supplement 1. – P. 267 – 270.
12. **Margesin R.**, Fauser V., Fonteyne P. A. Characterization of cold-active pectate lyases from psychrophilic *Mrakia frigida*. // R. Margesin, // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2005. – **40** (6). – P. 453 – 459.
13. **Nai C.**, Wong H. Y., Pannenbecker A. et al. Nutritional physiology of a rock-inhabiting, model microcolonial fungus from an ancestral lineage of the Chaetothyriales (Ascomycetes) // *Fungal Genet. Biol.* – 2013. – 56. – P. 54 – 66.
14. **Papa R.**, Parrilli E., Sannino F. et al. Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-34582014000100001-calibre\\_link-54](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582014000100001-calibre_link-54) // *Res. Microbiol.* – 2013. – 164 (5). – P. 450 – 456.
15. **Poli Annarita**, Anzelmo Gianluca, Nicolaus Barbara. Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological Activities // *Mar Drugs*. – 2010. – 8(6). – P. 1779 – 1802.
16. **Roberto Paul Anitori**. Extremophiles: Microbiology and Biotechnology. – 2012. – 300 p.
17. **Samson R. A.**, Hoekstra E. S., Frisvad J. C. Introduction to food and airborne fungi. 7 th edit. – Wageningen, the Netherlands, printed by Ponsen and Looyen, 2004. – 389 p.
18. **Svahn S. K.**, Olsen B., Bohlin L. et al. *Penicillium nalgiovense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B // *Fungal Biology and Biotechnology*. – 2015. – 1. – P. 2 – 11.
19. **Tauk-Tornisielo S.M.**, Arasato L.S., de Almeida A.F. et al. Lipid formation and  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus sp.*, grown on vegetable oil // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2009. – Vol. 40. – P. 342 – 345.