

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИ-
ТУТ ПО ИЗЫСКАНИЮ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

имени Г.Ф. Гаузе» РАН
(ФГБНУ «НИИНА»)

Лаборатория химического изучения
биологически активных соединений микробного происхождения

Реферат

по дисциплине:

«Экстремальные формы микроорганизмов в биотехнологии»

на тему:

«Алкалофилия грибов»

Выполнил(а): Баранова А.А.

Аспирант: 1 год обучения

Руководитель: в.н.с., д.б.н.



Садыкова В.С.

Москва 2016г.

Содержание

Введение.....	3
Экология и местообитание.....	4
Биохимическая адаптация к условиям среды.....	7
Биологическая активность алкалофильных микроорганизмов и перспективы их использования в биотехнологии.....	8
Заключение.....	12
Список использованной литературы.....	13

Введение

За последние годы из содовых озер мира и, в частности, из озер Забайкалья и Монголии выделяются новые микроорганизмы, обладающие различными функциональными свойствами.

Значения реакции среды различных природных вод и растворов, где развиваются микроорганизмы (от рН 1-2 в кислых источниках и рудничных стоков до рН 10 в содовых озерах), покрывают почти весь теоретический возможный диапазон значений рН (0-14).

По отношению к рН среды микроорганизмы подразделяют на ряд физиологических групп:

- Нейтрофилы развиваются при значении рН близком к нейтральному, рН 6-8 (пресноводные озера и реки, многие почвы, внутренняя среда, растительных и животных организмов).
- Ацидофилы - организмы, растущие в кислой среде (рН<6). Примером служат молочнокислые и уксуснокислые бактерии, многие грибы.
- Алкалофильные микроорганизмы предпочитают значения рН 8,5 и выше.

В данной работе будет рассмотрена проблема алкалофилии у грибов.

Микробное сообщество содовых озер представлено функциональными группировками продуцентов и деструкторов.

Деструкционная часть микробного сообщества содово-соленых экосистем представлена галоалкалофильными микроорганизмами, относящимися к разным систематическим группам и физиологически являющимися аэробами и анаэробами и в большинстве своем предполагает бактерии и цианобактерии и т.д.

В мировой литературе практически отсутствуют данные об исследовании алкалофилии у грибов. Отдельные сведения, касающиеся развития грибов в щелочной среде, опубликовали японские ученые в 90-х годах XX века.

Большой интерес ученых привлекают механизмы биохимической адаптации микроорганизмов в щелочных условиях среды, а также использование биологически активных веществ, продуцируемых алкалофилами, в области биотехнологии.

Экология и местообитание

Характерной особенностью содово-соленых озер является высокая концентрация солей и щелочные условия. Это создает экстремальные условия для развития биоты в водной толще и донных отложениях. Физико-химические условия гиперсоленых содовых водоемов препятствуют развитию в них эукариотного сообщества, при этом прокариотная микробная популяция представлена крайне разнообразно.

Существуют различные классификации микроорганизмов по отношению к рН. По Вигелю, к алкалофилам относят микроорганизмы с оптимумом $\text{pH} > 8,5$ и максимальным $\text{pH} > 10$. Выделяют также группы факультативных алкалофилов с минимальным $\text{pH} < 8$ и облигатных алкалофилов с минимальным $\text{pH} > 8$. К алкалотолерантам относятся организмы с оптимумом $\text{pH} < 8,5$ и максимальным $\text{pH} > 9$ [23].

Хорикоши называет алкалофильными микроорганизмы, которые растут при щелочных значениях рН с оптимумом роста выше 8 (обычно между 9 и 10), способны к культивированию при значениях $\text{pH} > 11$, но не растут или растут медленно при значениях рН, близких к нейтральной.

Облигатные алкалофилы неспособны к росту при нейтральных значениях рН среды и обычно не растут при $\text{pH} < 8$.

Алкалотолерантные организмы способны расти при щелочных значениях, но имеют оптимум для роста в кислой или нейтральной областях [8, 11].

Щелочные местообитания широко распространены в природе, но в отличие от кислых, гораздо менее изучены.

К подщелачиванию среды приводят дезаминирование белков и аминокислот аммонификаторами, разложение мочевины уробактериями, а так же фотоассимиляция CO_2 . Наибольшие масштабы имеет карбонат/бикарбонатная система, обеспечивающая постоянство pH в Мировом океане [3].

Щелочные содовые озера и содовые пустыни широко распространены, хотя и мало изучены, вероятно, из-за недоступности в большинстве случаев. Эти среды характеризуются присутствием больших количеств карбоната натрия (или комплексов этих солей) и образуются путем испарительного концентрирования. В ходе формирования щелочной среды, другие соли (особенно NaCl) также концентрируются, и как правило, порождая среды, щелочные и несколько засоленные [9].

В качестве примера содового озера можно представить озеро Моно, которое является бессточным, находящимся в центральной Калифорнии, к востоку от гор Сьерра-Невада. Оно содержит в высоких концентрациях растворенные карбонаты, хлориды и сульфаты. Из-за своей высокой солености (pH 7,5 – 9,7), озеро Моно иногда сравнивают с Мертвым морем. Были исследованы образцов воды, грунта и почвы. Пробы воды не содержали грибов, тогда как из осадочных пород и почвы выделили 67 видов. Большинство видов присутствовали повсеместно в зависимости от среды и температуры изоляции. Можно предположить, что некоторые виды присутствовали в качестве неактивных структур, в то время как некоторые другие, изолированные при pH 8 на среде, обогащенной Na^+ и Ca^{2+} , могут быть адаптированы в растущей форме, к щелочным и солевым условиям [22].

Сильно щелочные подземные воды (с высоким содержанием Ca^{2+}) встречаются крайне редко. Тем не менее, такие грунтовые воды, где сильно щелочные условия сохраняются (pH >11) были идентифицированы в различных геологических местах в Калифорнии, Оман, Югославии, на Кипре и Иордании. Этот тип щелочных подземных вод по гидрохимическим характеристикам напоминает условия образования пор в бетоне. А так как бетон является

основным структурным компонентом многих хранилищ долговременного хранения, то такой тип грунтовой воды представляет большой интерес [9].

Кроме того известно, что промышленные процессы созданные человеком, такие как производство бетона и бумаги, создают щелочные отходы, которые являются потенциальными местообитаниями для алкалофильных грибов. Возможность обнаружить алкалофильные и алкалотолерантные грибы в лесных почвах, а также в почвах, подвергшихся окультуриванию (вспахивание, внесение удобрений и т.д.), поднимался в научной литературе, однако не был подтвержден экспериментально. Известно, что локальные временные щелочные условия в почве могут создаваться повсеместно в результате хозяйственной деятельности человека (загрязнение нефтепродуктами, отходами целлюлозно-бумажной промышленности, внесение удобрений) [2, 12].

Из щелочных почв Индонезии были выделены изоляты грибов из двух различных типов почв с использованием щелочной (pH 9,7) и слегка кислой среды (pH 6). Большинство грибов были алкалофилы или алкалотолеранты, которые могут расти при pH 10. Алкалофилами были изоляты *Acremonium alternatum* (Link), *A. Furcatum* (Moreau & F. Moreau ex Gams), *Gliocladium cibotii* (J.F.H. Veyma), *Phialophora geniculate* (Emden), *Stachylidium bicolor* (Link) и *Stilbella annulata* (Berk. & M.A. Curtis). Способность расти в щелочных условиях, а также в кислых условиях, было распространено у многих видов *Acremonium* [17]. Так из образцов известковых почв pH (7,7 – 8,8), расположенных в пещерах сталактитов Японии, учеными были выделены алкалофильные виды *Acremonium sp.* и *Chrysosporium sp.* Все изоляты четырех видов *Acremonium* и двух видов *Chrysosporium* хорошо росли в щелочных условиях и тем самым были объявлены алкалофилами [18].

К экстремальным алкалофилам можно отнести и группу галоалкалофильных микроорганизмов. Для развития им необходимы не только щелочные условия (pH \geq 9,0), но также высокие концентрации NaCl (\geq 33%). Галоалкалофилы найдены в экстремальных средах обитания, таких как щелочные озера в Восточной Африке, Соединенных Штатах и Российской Федера-

ции. Сообщества микроорганизмов, живущие при pH 10.0 и степени минерализации 10%, представлены различными родами бактерий, археобактерий и цианобактерий [12].

Так же (Kladwang et al. (2003)) выделил ряд алкалотолерантных видов в Таиланде и (Elíades и et al. (2006)) сообщили о восьми видах алкалофильных и алкалотолерантных почвенных грибах из Аргентины, таксономически распространенных *Bionectriaceae* (Samuels & Rossman), *Trichocomaceae* (E. Fisch), *Sporormiaceae* (Munk), *Ceratostomataceae* (G. Winter) и *Sordariaceae* (G. Winter). Однако информация по биоразнообразию алкалофильных мицелиальных грибах является дефицитной [5, 13].

Биохимическая адаптация к условиям среды

Большой интерес ученых привлекают механизмы биохимической адаптации микроорганизмов в щелочных условиях среды.

Алкалофильные микроорганизмы имеют эффективные механизмы для поддержания внутриклеточного ионного гомеостаза и значения pH, близкой к нейтральной внутри клетки [14].

Особенности организации алкалофильных и алкалотолерантных организмов, которые обеспечивают им жизнь в экстремальных условиях:

1. На молекулярном уровне
 - a) Синтез солеустойчивых белков.
 - b) Повышение кислотных и снижение гидрофобных аминокислотных остатков.
2. На клеточном уровне
 - a) Синтез осмолитов и транспорт из внешней среды.
 - b) Изменение Na^+ АТФ-азы и работа Na^+/H^+ , (K^+/H^+) антипортера на повышение/понижение pH мембраны клетки.
 - c) Повышение количества COO^- групп

Хорошо известно, что не только цитоплазматическая мембрана но также клеточная стенка имеет функция защитного барьера от экстремальных условий окружающей среды в алкалофильных клетках. Клеточная стенка содержит (большое количество отрицательно заряженных карбоксильных групп что отталкивают OH^- и адсорбируют протоны и Na^+) [16].

Впервые отмечено явление облигатной алкалофилии у видов рода *Sodiomyces* (Grum-Grzhimaylo, Debets & Bilanenko) и *Thielavia* (Zopf), обитающих в щелочных почвах со стабильно высокими значениями pH (выше 10). Была дана подробная характеристика микобиоты щелочных засоленных почв. В результате исследования было обнаружено, что в щелочных засоленных почвах могут присутствовать как алкалофильные, так и алкалотолерантные микромицеты.

Биологическая активность алкалофильных микроорганизмов и перспективы их использования в биотехнологии

Для успешного роста и жизнедеятельности в экстремальных условиях организмы могут вырабатывать оригинальные метаболиты, некоторые из которых активно исследуются.

В настоящее время практически ничего не известно не только о таксономическом составе группы галоалкалофильных (галоалкалотолерантных) грибов, но и об особенностях их обмена, в том числе и о продуцируемых ими вторичных метаболитах. В то же время ферменты алкалофильных бактерий широко используются в биотехнологии, в производствах, где создаются щелочные условия.

В промышленной биотехнологии используются более 30 различных видов грибковых ферментов. Например, α -амилазы *Aspergillus niger*, *A. oryzae*; целлюлазы из *Humicola insolens* (Cooney & R. Emers), *Penicillium sunicalo*; глюкоамилазы из *A. phoenicis*, *Rhizopus delemar* (Boidin ex Wehmer

& Hanzawa); глюкозооксидазы из *A.niger*; лакказы из *Coriolus versicolor* ((L.) Quél); пектиназа от *A. niger*, *A. oryzae* и протеазы из *A. melleus* [19].

Идеальный промышленный фермент должен обладать высокой стабильностью и высокой активностью в широком диапазоне реакционных условий. Это обуславливает привлекательность поиска и исследования алкалотолерантных грибов как возможных продуцентов ценных для человека вторичных метаболитов, активность которых могла бы превысить таковую у бактерий (целлюлаз, ксиланаз, протеаз, липаз).

Целлюлазы расщепляют целлюлозу - самый распространенный биополимер на нашей планете и главный компонент клеточных стенок у растений, катализируют разложение растительных полисахаридов. Целлюлозолитические ферменты имеют широкий спектр применения в ферментативном осахаривании целлюлозы, содержащейся в промышленных и сельскохозяйственных отходах, в первичной очистке сточных вод, в целлюлозно-бумажной промышленности, производства протопластов, генной инженерии и т.д. [4]. Большинство целлюлаз обладают оптимальной активностью при кислых рН (4.0-5.0) [20]. Однако, последние достижения требуют использования целлюлаз активных в нейтральных и щелочных значениях рН.

Так 600 различных природных штаммов алкалотолерантных микромицетов, принадлежащих к 4 классам, 38 родов и 119 видов были испытаны на их способность продуцировать нейтральные и щелочные целлюлазы. Сделан вывод, что 72 % всех исследованных штаммов производят целлюлазы при нейтральных и щелочных значениях рН. Но наибольшее количество продуцентов нейтральных и щелочных целлюлаз относятся к следующим классам: гифомицеты (рода *Acremonium*, *Alternaria*, *Cylindrocarpon*, *Fuzarium*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Myrothecium*, *Ulocladium*, *Gliocladium*), аскомицеты (рода *Chaetomium*) и целомицеты (рода *Phoma*, *Microsphaeropsis*, *Aposphaeria*) [21].

Пробы, собранные из разных мест обитания в Таиланде, (в общей сложности 324 штамма) были обследованы на наличие ферментов, действу-

ющих в щелочных значениях pH. Были проанализированы активности: арабиназ, амилаз, галактоназ и протеаз. Алкалотолерантные грибы, выделенные из древесной щепы в щелочной и кислой средах обитания были хорошими источниками для производства щелочных ферментов. Этот скрининг показывает, что существует популяция грибов, способные переносить высокую pH [13].

Так же нельзя забывать об антибиотиках, продуцируемых микроскопическими грибами. Антибиотической активностью обладали микромицеты, выделенные из образцов щелочных засоленных почв Центральной Азии (Кулундинская степь, Кункурская степь, Забайкалье, северо-восточная Монголия) и Африки (Танзания).

Выделенные алкалофильные и галотолерантные изоляты грибов способны продуцировать антибиотические вещества, обладающие как антибактериальной активностью с широким и узким спектром действия, так и антифунгальной активностью. Исследованные изоляты оказались наиболее активными в отношении *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Aspergillus niger* и практически неактивными в отношении *Candida albicans* ((C.P. Robin) Berkhout) и *Escherichia coli* [1].

Одними из активных антибиотических веществ, продуцируемых грибами можно назвать пептаиболы.

Пептаиболы - антибиотики пептиды, как правило, из 15 ± 20 остатков. Отличительная особенность этого класса пептидных антибиотиков это наличие большого количества остатков аминокислотной кислоты (Aib). Эти пептиды обладают спиральной конформацией, гидрофильны с одной стороны, и гидрофобны, с другой стороны. Таким образом, механизм действия пептаиболов связан с изменением липидных компонентов мембран, нарушением гидрофобных трансмембранных спиралей вокруг центральной поры и формирование каналов оттока ионов через цитоплазматическую мембрану. Это механизм антибактериальной активности и токсичности, проявляемой этой группой антибиотиков [7].

Согласно существующим на сегодняшний день моделям, каналы формируются из агрегатов молекул антибиотика, стабилизированных водородными связями между остатками Gin и Нур .

У сапротрофных микромицетов синтез таких пептидов связан с механизмами антагонизма, а у фитопатогенных грибов они играют роль сигнальных молекул.

Примерами пептидных антибиотиков полученные из алкалофильных микромицетов могут служить пептаиболы выделенные из микромицеты из рода *Acremonium*.

Пептид, XR586, был выделен при ферментации *A. persicinum* ((Nicot W. Gams) XR586 показывает многие структурные и конформационные особенности, общие с пептаиболами, особенно с зервамицином. Пептид XR586, был выделен из ооспор гриба, из в тропическом образце почвы, собранной в 1989 года. Структурные исследования показали, что этот пептид во многими схож с пептаиболами. [7]

Из *A. tubakii* (W. Gams) был выделена новая группа антибиотиков пептаиболов - цефаиболы. Основным компонентом смеси цефаиболов, образующимся в избытке у дикого штамма, был цефаибол А, ярким биологическим свойством которого является выраженное глистогонное действие и активность против эктопаразитов (мухи, клопы). Цефаиболы обладают бактерицидным действием. Выявлено ингибирующее действие против грамположительных бактерий, но бездействие против грамотрицательных бактерий. Была показана активность против *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma mycoides* [15].

Заключение

Сравнивая физиологические и биохимические качества изолятов одного вида, но с разными типами адаптации к щелочным условиям можно больше узнать о механизмах алкалофилии у грибов. Для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований необходимо более полное представление о разнообразии и распространении таких грибов.

Открытие новых алкалофильных и алкалотолерантных продуцентов открывает широкие перспективы для поиска не только ферментов но и новых антибиотиков, а так же использование их в биотехнологии.

Список использованной литературы

1. Георгиева М.Л., Антимикробная активность новых алкалофильных и галотолерантных грибов из щелочных засоленных почв/ Георгиева М.Л., Толстых И.В., Биланенко Е.Н., Грум-Гржимайло А.А., Коновалова О.П., Катруха Г.С., Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее: Всероссийский симпозиум с международным участием. Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова. Биологический факультет. 27-29 января 2011 г. – 31с.
2. Заварзин Г.А. Алкалофильное микробное сообщество как аналог наземной биоты протерозоя. Эволюция биосферы и биоразнообразие к 70-летию А.Ю. Розанова. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2006 - 97-119с.
3. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. Вузов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 272с.
4. Bhat, M., Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications/ Bhat, M., Bhat, S., *Biotechnol. Adv.* 15, 1997 - 583-620.
5. Eliades L.A, Contribution to the study of alkalophilic and alkali-tolerant ascomycota from Argentina/ Eliades L.A., Cabello M.N., Voget C.E. *Darwiniana* 44, 2006 - 64–73.
6. Gadd, G.M., Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist* 18, 2004 - 60-70.
7. Gary J. Sharman, Structural elucidation of XR586, a peptaibol-like antibiotic from *Acremonium persicinum*/ Gary J. Sharman, Andrew C. Try, Dudley H. Williams□, A. Martyn Ainsworth□, Richard Beneyto□, Trevor M. Gibson□, Carole McNicholas□, Didier V. Renno□, Neil Robinson□, Keith A. Wood□ and Stephen K. Wrigley, *Biochem. J.* 320, 1996 - 723-728.
8. W.D. Grant, Alkaline Environments/ W.D. Grant, B.E. Jones, *Encyclopedia of Microbiology*, 2000 - 126-133.

9. W.D. Grant Alkaliphiles: ecology, diversity and applications/ W.D. Grant, W.E. Mwachia, B.E. Jones, FEMS Microbiology Reviews 75, 1990 - 255-270.
10. A.A. Grum-Grzhimaylo, Sodiomyces alkalinus, a new holomorphic alkaliphilic ascomycete within the Plectosphaerellaceae/ A.A. Grum-Grzhimaylo, A.J.M. Debets, A.D. van Diepeningen, M.L. Georgieva, E.N. Bilanenko Persoonia. 31, 2013 - 147–158.
11. Horikoshi, K. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology / Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 1999 - 735–750.
12. Jones, B.E, Microbial diversity of soda lakes/ Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W., and Owenson, G.G.. Extremophiles, 1998, vol. 2, pp. 191– 200.
13. Kladwang W, Alkaline-tolerant fungi from Thailand/ Kladwang W., Bhumiratana A., Hywel-Jones N. Fungal Diversity 13, 2003 - 69–83.
14. Krulwich, T.A., pH homeostasis and ATP synthesis: studies of two processes that necessitate inward proton translocation in extremely alkaliphilic Bacillus species/ Krulwich, T.A., Ito, M., Hicks, D.B., Gilmour, R., and Guffanti, A.A. Extremophiles 2, 1998 - 217.
15. Matthias Schiell, Cephaibols, New Peptaibol Antibiotics with Anthelmintic Properties from Acremonium tuhakii DSM12774/ Joachim Hofmann, Michael Kurz, Frank Rainer Schmidt, Laszlo Vertesy, Martin Vogel, Joachim Wink and Gerhard Seiberta, THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS VOL. 54 NO. 3, 2001- 220-233.
16. E. V. Morozkina, Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review)/ E. V. Morozkina, E. S. Slutskaia, T. V. Fedorova, T. I. Tugayb, L. I. Golubevaa, O. V. Korolevaa. Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 46, No. 1, 2010 - 1–14.
17. Nagai, K. Studies on the distribution of alkaliphilic and alkali-tolerant soil fungi I / Nagai, K., Skai, T., Rantiatmodjo, R.M., Suzuki, K., Gams, W. and Okda, G. Mycoscience 36, 1995. - 247- 256.

18. Nagai, K. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi II: Fungal flora in two limestone caves in Japan/ Nagai, K., Suzuki, K. and Okada, G. *Mycoscience* 39, 1998. - 293- 298.
19. R.I. Nielsen, *Enzymes from Fungi: their Technology and Uses*/ R.I. Nielsen, K. Oxenbøll. *Mycologist* May 1998, Volume 12, Part 2.
20. Nevalainen, H., Penttilä, M.: Molecular biology of cellulolytic fungi, 1995 - 303-319, In: *The Mycota II. Genetics and Biotechnology* (KUCK, ed.), Springer-Verlag.
21. I. V. Solovyeva, Occurrence of Neutral and Alkaline Cellulases among Alkali-tolerant Micromycetes/ V. Solovyeva, O. N. Okunev, E. G. Kryukova, G. A. Kochkina, *System. Appl. Microbiol.* 22, 1999 - 546-550.
22. Régine Steiman First survey of fungi in hypersaline soil and water of Mono Lake area (California)/ Régine Steiman, Larry Ford, Véronique Ducros, Jean-Luc Lafond, Pascale Guiraud, *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 2004 - 69–83.
23. Wiegel J. Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles/ *Extremophiles* 2, 1998 - 257-267.