

УДК 579.26

А.Б. Таширев, В.А. Романовская, С.О. Шилин, Н.А. Черная

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

СКРИНИНГ ДРОЖЖЕЙ-ПРОДУЦЕНТОВ МЕЛАНИНА ИЗ НАЗЕМНЫХ АНТАРКТИЧЕСКИХ БИОТОПОВ*

В настоящее время считается, что меланин перспективен для применения в медицине и фармакологии. В связи с тем, что ранее в полярных регионах были обнаружены чёрные дрожжи, нами проведен скрининг дрожжей-продуцентов меланина в антарктических биотопах. Тёмнопигментированные микроорганизмы выявлены в 30% образцов наземных биотопов на западном побережье Антарктического полуострова, на островах Аргентинского архипелага (Galindez, Skua, Corner, Barchans, Irizar, Uruguay, Cruls, Three little pig, King-Georg), а также на близлежащих к ним островах Petermann, Jalour, Berthelot; Darbois и Lippmann. В антарктических лишайниках частота встречаемости тёмнопигментированных микроорганизмов, их общее количество, а также биоразнообразие значительно выше, чем в других антарктических биотопах. Угольно-чёрные дрожжи обнаружены на накипных и кустистых лишайниках на вертикальных скалах, реже встречаются в почве, их количество составляло $1 \times 10^2 - 6 \times 10^3$ КОЕ/г образца. Из двух антарктических штаммов дрожжей, предварительно отнесенных к виду *Eophiala nigra*, выделены угольно-чёрные пигменты. По комплексу специфических химических тестов эти пигменты идентичны меланину, что подтверждается также характером УФ-спектров (в области 220–230 нм) и спектров поглощения в видимой области (400–800 нм). Выход меланина у штамма 36 составлял более 10% от количества биомассы. В целом, в наземных антарктических биотопах выявлены дрожжи, интенсивно синтезирующие меланин.

Ключевые слова: антарктические биотопы, *Eophiala nigra*, продуценты меланина.

Впервые «чёрные дрожжи» *Nadsoniella nigra* были обнаружены академиком Б.Л. Исаченко 100 лет назад в воде Арктики на глубине 5–10 м [4, 5]. Впоследствии дрожжи *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica* изолированы из Антарктики (из образца примитивной почвы, взятой с острова Хесуэлл) [8] и использованы для получения меланина [6]. Цель нашей работы – скрининг дрожжей-продуцентов меланина в наземных биотопах островов Аргентинского архипелага, а также западного побережья Антарктического полуострова. Такая постановка задачи обусловлена тем, что меланин успешно используется в медицине и фармакологии [2, 7], т.к. участвует в репарации ДНК, является модулятором таких важных систем клеточного метаболизма как фото- и радиопротекция, нейтрализует продукты перекисного окисления липидов и участвует в нейромедиаторных процессах при многочисленных патологических нарушениях функциональных структур нейронов.

Материалы и методы. Выделение антарктических микроорганизмов и изучение их свойств. Образцы для микробиологических исследований отбирали стандартными методами в наземных биотопах (на скальные биоплёнки, почва, лишайники и мхи) островов Аргентинского архипелага, а также западного побережья Антарктического полуострова. Микроорганизмы выделяли из нативных (хранение при температуре +5 °С, 10 сут.) и замороженных (хранение при -20 °С, 30 сут.) образцов. Количество микроорганизмов в исследуемых образцах определяли путём посева последовательных десятикратных разведений образцов (0,1 мл) на сусло-агар (СА). Чистые культуры изолировали общепринятыми методами и культивировали на СА (15–20 °С, 5–15 сут.).

Морфологию клеток (форма клеток, размеры, почкование, наличие внутриклеточных включений) изучали с помощью фазо-контрастной микроскопии живых клеток, образование спор и капсул определяли общепринятыми методами. Морфолого-культуральные свойства

*Работа выполнена при частичном финансировании за счет бюджетных средств для поддержки объекта национального достояния – «Коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины».

колоний, характер роста на жидких средах (сусло, глюкозо-картофельная), рост при различных pH оценивали через 5–15 суток роста.

Выделение микробных меланинов из клеточной биомассы проводили путем щелочной экстракции [9, 12]. Для этого клетки, осажденные центрифугированием (5000 g, 10 мин), дважды отмывали водой и ресуспендировали в ней до концентрации 10 г/л. К 100 мл суспензии добавляли раствор NaOH до конечной концентрации 0,5 N. Смесь автоклавировали (0,5 атм), затем центрифугировали (5000 g, 10 мин). К осадку добавляли 100 мл 0,5 N NaOH. Описанную выше процедуру экстракции меланина повторяли трижды. Оставшуюся светло-серую (почти белую) массу клеток удаляли. Полученные супернатанты объединяли и подкисляли концентрированной HCl до pH 2,0. Подкисление темно-коричневого супернатанта приводило к выпадению в осадок черных хлопьев. Осадок отделяли центрифугированием (5000 g, 10 мин), трижды отмывали водой (до нейтрального значения pH), затем дважды этиловым спиртом (96 %) и один раз ацетоном. Затем вновь растворяли в холодной 0,5 N NaOH и процедуру повторяли. Полученные пигменты высушивали до абсолютно сухой массы и хранили над P₂O₅.

Спектры пигментов изолированных антарктических пигментированных микроорганизмов определяли на спектрофотометре Specord UV VIS.

Результаты и их обсуждение. *Экологические аспекты.* Проведен поиск темнопигментированных микроорганизмов в образцах наземных биотопов западного побережья Антарктического полуострова (мыс Rasmussen, мыс Tuxen, гора Waugh), островов Аргентинского архипелага (Galindez, Skua, Corner, Barchans, Irizar, Uruguay, Cruels, Three little pig, King-Georg), а также близлежащих к ним островов: с севера – Petermann, с востока – группа островов Jalour, с юго-востока – Berthelot, и более удаленных островов: Darboux и Lippmann (экспедиция 2008 г). Количество антарктических образцов, в которых были выявлены темнопигментированные микроорганизмы, варьировало от 10 до 33 % (% от количества изученных образцов определенного биотопа) (таблица).

Т а б л и ц а

Количество антарктических образцов (экспедиция 2008 г), в которых были выявлены темнопигментированные микроорганизмы (в % от количества изученных образцов определенного биотопа)

Биотоп	Количество образцов		
	изученных	в которых выявлены темнопигментированные микроорганизмы	
		Количество	%
¹ Черные лишайники	15	5	33
² Смесь лишайников	10	2	20
³ Лишайники	10	2	20
Мох	10	2	20
Трава <i>Deschampsia antarctica</i>	10	1	10
Почва	10	1	10
Ил	5	0	0

¹Накипные лишайники на вертикальной скале (о. Galindez).

²Несколько видов лишайников: пушистый нитевидный черный лишайник, ветвистый или кустистый лишайник на скале (о. Galindez).

³Разные экологические группы лишайников серого и зеленого цветов, расположенные на мхах и камнях (острова Lippmann, Darboux, Three little pig).

Количество темнопигментированных колоний, как правило, составляло $1 \times 10^2 - 6 \times 10^3$ КОЕ в 1 г образца и было меньше общего количества [10] хемоорганотрофных микроорганизмов. Исключение – некоторые антарктические наскальные лишайники, в которых частота встречаемости темнопигментированных микроорганизмов, их общее количество, а также

биоразнообразии значительно выше, чем в других антарктических биотопах, что обусловлено повышенной устойчивостью к солнечной радиации пигментированных микроорганизмов. Экологическое значение этих микроорганизмов основано на предположении, что микробные меланины играют определённую роль в процессах формирования почвенного гумуса, поскольку по химическому строению и свойствам меланины микроорганизмов сходны с гуминовыми кислотами.

Изучение морфолого-культуральных свойств изолированных тёмнопигментированных микроорганизмов показало, что они представлены как эукариотами (мицелиальные грибы и дрожжи), так и прокариотами (актиномицеты и стрептомицеты).

Угольно-чёрные дрожжи были обнаружены в накипных и кустистых лишайниках на скалах, реже в почве. Для дальнейшей работы было отобрано два штамма чёрных дрожжей, как потенциальных продуцентов меланина (штамм 36, изолированный нами, и штамм *Exophiala nigra* УКМ Y-2299, полученный из УКМ).

Характеристика штамма 36. Изолирован из почвы острова Ирizar (Антарктика). Образуют круглые, выпуклые, гладкие, не слизистые, с маслянистым блеском, угольно-чёрного цвета колонии, размером 3-5 мм, иногда до 10 мм (рис. 1), пигмент в среду не выделяется, истинный мицелий отсутствует. При старении (20 сут.) колонии становятся матовыми, шероховатыми, образуют псевдомицелий. В жидком солодовом сусле на качалках (т.е. при наличии массообмена в культиваторах) через 3-4 суток образует осадок и хлопья, в стационарных условиях характер роста аналогичен вышесказанному, но биомасса увеличивается медленнее (10-15 сут.). Клетки полиморфные, овальные, размером до 8-10 мкм, почкующиеся. Очень редко почкующиеся клетки образуют цепочки, что приводит к образованию псевдомицелия. Истинный мицелий не обнаружен. Хемоорганотрофы, аэробы, способны расти в широком температурном диапазоне (10°C-30°C) при pH 5.0-7.0.

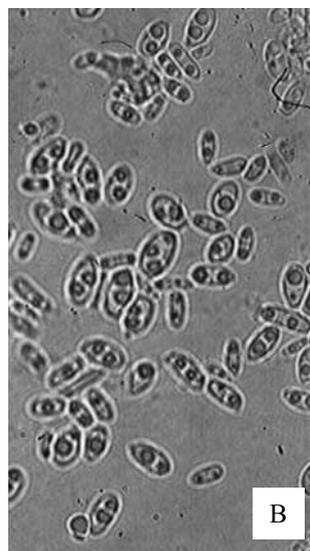
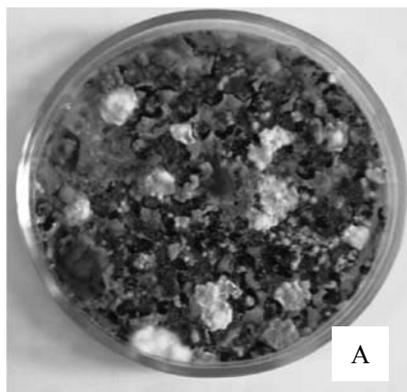


Рис. 1. Антарктический штамм дрожжей 36 (выращен на сусло-агаре, 15 сут., 20°C, pH 5.5-6.0)

А – колонии после посева почвы (разведение 10-1);

Б – колонии чистой культуры;

В – клетки, × 700.

Штамм 36 по основным диагностическим свойствам подобен штамму УКМ Y-2299, который был изолирован из образца накипных лишайников на вертикальных скалах острова Галиндез (Антарктика) и депонирован в УКМ как *Exophiala nigra* (Issatsch.) Haase et de Hoog 1999.

В целом, так называемые «черные дрожжи» (класс *Euascomyces*) – это группа несовершенных дрожжеподобных грибов аскомицетового аффинитета, характеризующихся образованием черных или бурых либо чернеющих со временем колоний за счет синтеза меланинов. К ним относятся представители родов *Exophiala*, *Aureobasidium*, *Hormonema*, *Botryomyces*, *Phaeotheca*, *Sarcinomyces*, *Phialophora*, *Rhinoctadiella*, *Phaeococcomyces*. Образование аскопор у них наблюдается редко, в связи с чем их систематика строится в основном на способах образования конидий [1]. Авторы, предложившие данную трактовку, считают, что многие роды этих грибов формальны, то есть заведомо филогенетически гетерогенны и не соответствуют точно известным телеоморфам.

Характеристика пигмента. При культивировании в жидком солодовом сусле (рН 5.5–6.0) штамм 36 синтезирует водонерастворимый внутриклеточный угольно-чёрный пигмент. Клетки хорошо осаждаются при центрифугировании в диапазоне 1000–5000 об/мин. В супернатанте пигмент отсутствует. На глюкозо-картофельной жидкой среде пигментация менее выражена, чем на солодовом сусле. После выращивания штамма 36 в жидком солодовом сусле (рН 5.5–6.0, 5 сут.) пигмент был экстрагирован и высушен.

Пигмент антарктического штамма 36 нерастворим в воде, однако растворяется в щёлочи. В органических растворителях (эфир, ацетон, хлороформ, бензол, н-бутанол) пигмент нерастворим. В этаноле – нерастворим или слабо растворим. В тетрагидрофуране (растворитель так называемых меланоидинов) пигмент не растворялся. Считается, что меланины не растворяются в концентрированных кислотах. Действительно, меланин, синтезируемый антарктическим штаммом 36, не растворялся в концентрированной HCl, однако он растворялся в других концентрированных кислотах (H₂SO₄ и HNO₃). В разбавленных кислотах меланины не растворялись.

По комплексу вышеуказанных специфических тестов экстрагированный пигмент штамма 36 идентичен меланину, синтезируемому штаммом УКМ Y-2299, а также подобен меланину таких микроорганизмов как *Nadsoniella nigra var. hesuelica* 365 [9] и *Cladosporium* sp. 396 [3, 11].

Чтобы определить интенсивность синтеза меланина, щелочную экстракцию пигмента из биомассы штамма 36 проводили трижды (до полного извлечения пигмента из клеток). Далее меланин и параллельно оставшуюся светло-серую дрожжевую биомассу высушивали до абсолютно сухой массы и взвешивали на аналитических весах. Соответствующие расчеты показали, что выход меланина составлял более 10 % от абсолютно сухой дрожжевой биомассы, что свидетельствует о высокой интенсивности синтеза меланина у штамма 36.

Характер УФ-спектров различных фракций пигмента штамма 36, растворённых в NaOH (0,5 N) и аммиаке (2 %) практически не отличались. Максимальное поглощение находилось в области 220–230 нм (рис. 2). Спектр поглощения пигмента штамма 36 в видимой области (400–800 нм) имел форму практически прямой линии (без резкого снижения). Для сравнения были взяты несколько фракций меланина, синтезируемого *Exophiala nigra* УКМ Y-2299. Показано, что характер УФ-спектров и спектров поглощения в видимой области (400–800 нм) различных фракций пигмента штамма 36 и УКМ Y-2299 идентичны. Аналогичные спектры показаны ранее для меланинового пигмента *Nadsoniella nigra* штамм 365 [9]. На основании полученных результатов мы полагаем, что антарктический штамм 36 синтезирует меланины.

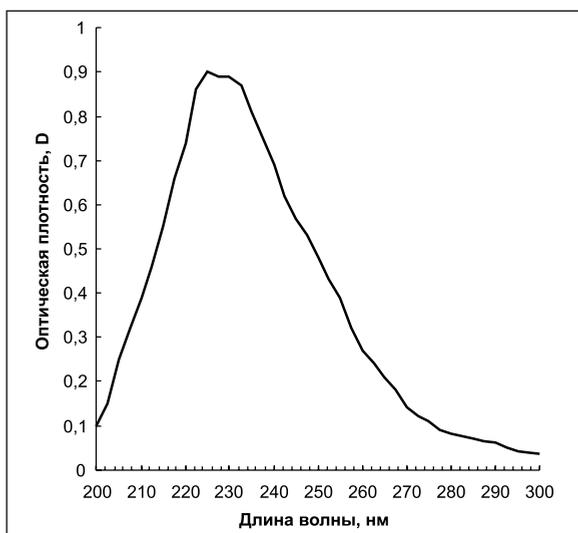


Рис. 2. Область максимального поглощения меланина, выделенного из штамма 36, в УФ-области спектра.

В целом, полученные результаты показали, что в антарктических лишайниках частота встречаемости тёмнопигментированных микроорганизмов, их общее количество, а также биоразнообразие значительно выше, чем в других антарктических биотопах. Скрининг дрожжей-продуцентов меланина в наземных антарктических биотопах позволил выявить штаммы с высокой интенсивностью синтеза меланина.

О.Б. Таширеву, В.О. Романовська С.О., Шилін, Н.А. Черная

Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

СКРИНІНГ ДРІЖДЖІВ-ПРОДУЦЕНТІВ МЕЛАНІНУ ІЗ НАЗЕМНИХ АНТАРКТИЧНИХ БІОТОПІВ

Резюме

В даний час вчені вважають, що меланін може використовуватись у медицині і фармакології. Раніше в полярних регіонах було виявлено чорні дріжджі, тому нами проведено скринінг дріжджів-продуцентів меланіну в антарктичних біотопах. Темнопигментовані мікроорганізми виявлено в 30 % зразків наземних біотопів на західному узбережжі Антарктичного півострова, на островах Аргентинського архіпелагу (Galindez, Skua, Corner, Barchans, Irizar, Uruguay, Cruls, Three little pig, King-Georg), а також на островах Petermann, Jalour, Berthelot, Darboux и Lippmann. В антарктичних лишайниках частота виявлення темнопигментованих мікроорганізмів, їх загальна кількість а також біорізноманіття значно вище, ніж в інших антарктичних біотопах. Вугільно-чорні дріжджі знайдено на накипних й кустих лишайниках на вертикальних скелях, інколи вони зустрічаються у ґрунтах, їх кількість складала $1 \times 10^2 - 6 \times 10^3$ /г зразка. Із двох антарктичних штамів дріжджів, які за попередніми даними подібні *Exophiala nigra*, екстраговано вугільно-чорні пігменти. За комплексом специфічних хімічних тестів ці пігменти ідентичні меланіну, що підтверджено характером УФ-спектрів (в області 220–230 нм) й спектрів поглинання у видимій області (400–800 нм). Вихід меланіну у штама 36 складав 10 % від кількості біомаси. Загалом, в наземних антарктичних біотопах виявлено дріжджі, які інтенсивно синтезують меланін.

Ключові слова: Антарктичні біотопи, *Exophiala nigra*, продуценти меланіну.

SCREENING OF YEAST-PRODUCERS OF MELANIN IN THE ANTARCTIC TERRESTRIAL BIOTOPES

S u m m a r y

Now it is considered, that melanin is promising for application in medicine and pharmacology. Since black yeast were found in polar regions before, we have carried out screening of yeast-producers of melanin in the Antarctic biotopes. Dark pigmented microorganisms are revealed in 30 % of samples from terrestrial biotopes at the western coast of the Antarctic peninsula, on islands of the Argentina archipelago (Galindez, Skua, Corner, Barchans, Irizar, Uruguay, Cruls, Three little pigs, King-George), and also on the neighbouring islands Petermann, Jalour, Berthelot, Darboux and Lippmann. In the Antarctic lichens the occurrence frequency of dark pigmented microorganisms, their total number and biodiversity are significantly higher, than in other Antarctic biotopes. Coal-black yeast are found on the crustose and bushy lichens on vertical rocks, they occur less often in soil, their quantity made $1 \times 10^2 - 6 \times 10^3/g$ of a sample. Coal-black pigments were isolated from two Antarctic strains of yeast. These pigments are identical to melanin according to a complex of specific chemical tests, that is also confirmed by the character of UV-spectra (220-230 nm) and absorption spectra in the visible area (400–800 nm). The output of synthesized pigment / g in strain 36 made more than 10 % of biomass amount. So, the yeast synthesizing intensively melanin are revealed in the Antarctic terrestrial biotopes.

The paper is presented in Russian.

K e y w o r d s: Antarctic biotopes, *Exophiala nigra*, producers of melanin.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Romanovskaya V.A., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 221 с.
2. Борцевская М.И., Васильева С.М. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопросы медицинской химии. – 1999. – 45, № 1. – С. 47–53.
3. Жданова Н.Н., Свищук А.А., Шмыгун М.П., Бондарь А.И. О защитном действии пигмента, выделенного из гриба *Cladosporium* sp. // Микробиология. – 1970. – 39, №4. – С. 603–607.
4. Исаченко Б.Л. Исследования надъ бактериями Севернаго Ледовитаго Океана. – Петроградъ: Типографія В.О. Киршбаума, 1914. – 297 с.
5. Исаченко Б.Л. Избранные труды. – Москва-Ленинград: Изд. Академии наук СССР, 1951. – Т. 1. – 408 с.
6. Лях С.П. Патент RU (11) 2069696 (13) С1. Пролуцент противоопухолевого меланинодержачащаго прелпарата «Астромеланин». Опул. 27.11.1996.
7. Лях С.П., Рубан Е.Л. Микробные меланины. – Москва: Наука, 1972. – 238 с.
8. Лях С.П., Рубан Е.Л. Антарктические «черные дрожжи» *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica* (характеристика и идентификация штамма 365) // Известия АН СССР. Сер. биол. – 1970. – № 4. – С. 581–592.
9. Рубан Е.Л., Лях С.П., Хрулева И.М., Титова И.А. Меланиновые пигменты *Nadsoniella nigra* // Известия АН СССР. Сер. Биол. – 1969. – № 1–3. – С. 134–148.
10. Ташырев А.Б., Романовская В.А., Сиома И.Б., Усенко В.П., Ташырева А.А., Матвеева Н.А., Рокитко П.В., Копытов Ю.П., Серединин Е.С., Мизин Д.А., Подгорский В.С. Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и CrO_4^{2-} // Доповіді НАН України. – 2008. – № 1. – С. 169–176.
11. Шмыгун М.П., Жданова Н.М., Свищук А.А. Про належність темного пігменту *Oidiodendron cerealis* до меланіну // Мікробіол. журн. – 1975. – 37, № 6. – С. 700–702.
12. Bainbridge B.W, Bull A.T., Pirt S.J., Rowley B.I. Trinci A.P.J. Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolizing cultures of *Aspergillus nidulans* // Trans. Brit. Soc. – 1971. – 56, No 3. – P. 371–385.

Отримано 10.11.2008