

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ДАРХАНОВА
Татьяна Андреевна

МИКРОМИЦЕТЫ БУРЯТИИ
И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Специальности: 03.02.12 - микология,
14.03.07 - химиотерапия и антибиотики

Автореферат на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2010

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова и в секторе коллекции культур Государственного научного центра по антибиотикам

Научные руководители

доктор биологических наук
Бибикова Маргарита Васильевна
кандидат биологических наук
Александровна Алина Витальевна

Официальные оппоненты

доктор биологических наук
Терехова Вера Александровна
кандидат биологических наук
Тренин Алексей Сергеевич

Ведущая организация

Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН

Защита диссертации состоится 10 декабря 2010 года в 15:30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.46 при Биологическом факультете МГУ имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ, Биологический факультет (аудитория М-1).

Тел./факс: (495)939-39-70

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Автореферат разослан 10 ноября 2010 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.А. Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Изучение биоразнообразия – одно из приоритетных направлений современной биологии. Сообщества почвообитающих грибов являются относительно мало изученным компонентом биоценозов (Hawksworth, Rossman, 1997; Gams 2007), всестороннее исследование которого имеет важное теоретическое и практическое значение (Zak, Visser, 1996; Hawksworth, 2004). В настоящее время грибы рассматриваются как наиболее перспективные продуценты соединений с разнообразной биологической активностью (Bérdu, 2005).

Проблемой медикаментозного лечения инфекционных заболеваний является постоянный рост устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым в медицинской практике антибиотикам (Bérdu, 2005). В связи с этим ведется интенсивный поиск и создание новых препаратов, активных, прежде всего, в отношении клинических резистентных штаммов. В настоящее время проводятся исследования возможности создания препаратов с новыми механизмами действия, оказывающие влияние на системы кворум-сенсинг (QS) и вирулентность патогенных микроорганизмов (Hentzer et al., 2003). Развитие биотехнологии, основанной на использовании потенциала микроорганизмов в получении лекарственных препаратов, является стратегическим направлением современной мировой фармакологии (Newman, 2003).

При проведении поисковых исследований особое внимание уделяют микроорганизмам, выделенным из экстремальных местообитаний и из экологически чистых районов, мало исследованных к настоящему времени (Bérdu, 2005; Пивкин, 2010). Республика Бурятия является регионом, почвенная микобиота которого на сегодняшний день крайне слабо изучена.

Цель и задачи исследования. Цель работы – изучение разнообразия почвообитающих микроскопических грибов Республики Бурятия и оценка их потенциала как продуцентов биологически активных веществ для фармакологии. Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

- 1) изучение видового состава и создание коллекции сапротрофных и нематофаговых микромицетов, выделяемых из почвы и смежных с ней субстратов;
- 2) определение спектра антимикробной активности соединений, продуцируемых изучаемыми штаммами грибов;

- 3) поиск продуцентов ингибиторов системы кворум-сенсинг, регулирующей факторы вирулентности бактерий;
- 4) оценка физико-химических и биологических свойств отобранных соединений.

Научная новизна. Полученные данные о видовом разнообразии сапротрофных и нематофаговых микромицетов имеют фундаментальное значение для дальнейших исследований микобиоты Бурятии. В результате проведенных исследований выявлено 88 видов почвенных микромицетов, принадлежащих к 33 родам. Показано, что 38 штаммов из 57 исследуемых (66%) являются продуцентами биологически активных соединений. Обнаружены продуценты антибиотиков, активных в отношении клинически важных возбудителей инфекционных заболеваний. Был получен продуцент циклоспорина с необычным соотношением компонентного состава. Выявлены 12 штаммов, продуцирующих ингибиторы сигнальной системы кворум-сенсинг грамотрицательных бактерий, среди которых штаммы *Aspergillus ustus* № 21, *Penicillium chermesinum* № 26 проявили наибольшую активность. Показана их способность к подавлению факторов вирулентности клинического штамма *Pseudomonas aeruginosa* 71. Отобраны нематофаговые гифомицеты, продуцирующие соединения с фибринолитической и плазминоген-активаторной активностями.

Научно-практическая значимость. Отобраны штаммы, образующие антибиотики, соединения с фибринолитической и плазминоген-активаторной активностями, ингибиторы факторов вирулентности патогенных грамотрицательных бактерий. Полученные культуры представляют интерес для биотехнологии как продуценты биологически активных соединений. Редкие и практически значимые штаммы переданы в коллекцию Государственного Научного Центра по антибиотикам (ГНЦ по антибиотикам, г. Москва), во Всесоюзную Коллекцию Микроорганизмов при Институте Биохимии и Физиологии Микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН, г. Пущино) и в коллекцию Государственного Научного Центра Прикладной Микробиологии и Биотехнологии (ФГУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск).

Апробация работы. Результаты исследования были доложены на Всероссийской конференции «Биоразнообразие экосистем внутренней Азии» (Улан-Удэ, 2006), на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2008, 2010). Материалы

работы были представлены на втором международном съезде микологов (Москва, 2005), на международной научно-практической конференции «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005), на междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2009, 2010), на научном молодежном семинаре «Smithy of Ideas, 2010» (Вильнюс, Литва, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на страницах, состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений, содержит таблиц и рисунка. Список литературы включает источники, из них на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы.

В данной главе приведены литературные сведения об экологии, физиологии почвенных сапротрофных и нематофаговых микромицетов, об изучении их на территории Бурятии. Представлены литературные данные по скринингу новых антибиотиков и фармакологически активных соединений. Рассмотрены литературные источники, посвященные изучению системы кворум-сенсинг микроорганизмов.

Глава 2. Материалы и методы исследования.

Регион исследования. Республика Бурятия расположена в центре евроазиатского континента, в южной части Восточной Сибири, занимает значительную часть водосборного бассейна оз. Байкал. Территория Бурятии характеризуется значительной приподнятостью над уровнем моря и преимущественно горным рельефом (Бурятия..., 1997). Климат резко-континентальный. Среднегодовая температура воздуха колеблется в пределах от 0 °С до минус 3 °С. Средняя температура летом составляет плюс 18.5 °С, зимой-минус 22 °С. Среднегодовое количество осадков варьирует от 265 до 416 мм в год (Цыбжитов, Цыбжитов, 2000).

Изучение видового разнообразия грибов. Материал был собран в августе-сентябре 2005 и 2006 гг в лесной зоне на территории Заиграевского и Прибайкальского районов Бурятии. Территория, где проводился сбор почвенных образцов, характеризуется дерновыми лесными почвами (Цыбжитов, Цыбжитов, 2000). Было собрано 110 образцов почвы и связанных с ней субстратов. В 2005

году было собрано 70 образцов: подстилка – 10, мох – 10, трухлявая древесина (осина, ель) – 30, старая трава – 10, копромы – 10. В 2006 году – 40 образцов по 10 образцов четырех типов субстрата: верхний горизонт почвы, мох, древесина и подстилка.

Выделение нематофаговых гифомицетов проводили на голодный агар в присутствии нематод *Caenorabditis elegans*, *Panagrellus redivivus* (Мехтиева, 1979). Выделение сапротрофных микромицетов проводили методом серийных почвенных разведений С. Ваксмана в модификации Д.Г. Звягинцева (Методы..., 1991) на среду Чапека и агаризованное пивное сусло. Для количественной характеристики микобиоты использовали показатели численности колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 грамм сухого материала. Представленность видов оценивали по показателям пространственной частоты встречаемости и относительного обилия видов, по которым рассчитывали индексы разнообразия Шеннона (H') и доминирования Симпсона (1/D), выравненность (E).

Идентификацию проводили на питательных средах, рекомендуемых для конкретных групп грибов, с использованием определителей (Raper, Fennel, 1965; Thom, Raper, 1968; Ellis, 1971, 1976; Pitt, 1979; Arx 1981; Ramirez 1982; Hoog et al. 2000; Domsch et al. 2007, и др.). Наименования видов унифицированы по базе данных CABI Bioscience Databases (<http://www.indexfungorum.org>).

Исследование биологической активности штаммов грибов.

Объектами исследования служили 57 штаммов грибов, относящихся к 52 видам из 23 родов.

Погруженное культивирование грибных культур проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл со средой А-9 (Бибикова и др., 1991) на круговой качалке с частотой вращения от $3,3 \text{ с}^{-1}$ до $4,3 \text{ с}^{-1}$ при $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 7, 14 суток.

Выделение комплексов биологически активных веществ осуществляли из культуральной жидкости и биомассы мицелия, их отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 минут. Биологически активные вещества извлекали из мицелиальной массы ацетоном и из культуральной жидкости - этилацетатом. Концентрировали на вакуум-выпарной установке (ИР - 1).

Определение антимикробной активности осуществляли методом диффузии в агар (Нетрусов, 2005) в отношении тест-культур: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 43300 (метициллинрезистентный штамм, MRSA), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* var. *mycoides* 537, *Escherichia coli* ATCC 25922,

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Aspergillus niger* 137a, *Candida albicans* CBS 8836 и клинические изоляты *C. albicans* 616, *C. krusei* 600 М, *C. krusei* 32/1.

Изучение антигрибного комплекса штамма *Tolypocladium inflatum* № 2.

Идентификацию антибиотика проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Sylufol 254 UV (Kavalier, Чехия), в системе растворителей бензол - ацетон (2:1). Контролем служил комплекс циклоспоринов А, В, С штамма *T. inflatum* 106 (Бибикова и др., 1989). Применяли проявление в УФ-свете при длине волны 254 нм, парах йода и перманганате калия. Проводили биопроявление активных фракций, путем наложения пластинок на агаризованную среду, содержащую тест-культуру *A. niger* 137a. Работа выполнена совместно со с.н.с. И.А. Спиридоновой (ГНЦ по антибиотикам).

Качественный и количественный анализ комплекса циклоспоринов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Исследование выполнено совместно со с.н.с. А.Н. Даниленко (Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН).

Ингибирование системы кворум-сенсинг и факторов вирулентности бактерий. Кворум-сенсинг система грамотрицательной бактерии *Chromobacterium violaceum* регулирует образование фиолетового пигмента виолацеина. Для постановки эксперимента использовали природный штамм *C. violacium* 7 и мутантный штамм *C. violacium* CV026, неспособный синтезировать N-ацилгомосеринлактоны (АНЛ, сигнальные молекулы, аутоиндукторы). Ингибирование системы кворум-сенсинг анализировали по отсутствию пигментации тест-культур вокруг лунок с экстрактами исследуемых штаммов.

В дальнейшем исследовали способность отобранных штаммов (*Aspergillus ustus* №21, *Penicillium chermesinum* №26) ингибировать факторы вирулентности клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa* 71. Ингибирование оценивали по способности тестируемых культур подавлять стафилолитическую активность протеазы Las А и образование пигмента пиоцианина. Использовали ацетоновые экстракты из мицелия.

Ингибирование стафилолитической активности *Pseudomonas aeruginosa* 71.

Суспензию клеточных стенок *S. aureus* ATCC 29213 смешивали с супернатантом *P. aeruginosa* 71. К полученной смеси добавляли испытуемые экстракты, контролем служила смесь без экстрактов. Измеряли оптическую плотность с помощью автоматизированной системы Bioscreen («Labsystems»,

Финляндия) при длине волны 600 нм. Степень стафилолитической активности протеазы Las A оценивали по снижению оптической плотности в контроле, ингибирование – по стабильности оптической плотности относительно контроля.

Способность исследуемых штаммов ингибировать стафилолитическую активность *P. aeruginosa* 71 оценивали также на твердой среде Мюллер-Хинтон агар (МХА). В питательную среду вносили исследуемые экстракты и суспензию клеточных стенок *S. aureus* ATCC 29213, затем на агаризованную среду наносили штрихом тест-культуру *P. aeruginosa* 71. Стафилолитическую активность оценивали по диаметру просветления агара вокруг тест-культуры, а ее ингибирование - по отсутствию зоны просветления (Kessler et al., 1997; Schaber et al., 2004).

Ингибирование образования пигмента пиоцианина *Pseudomonas aeruginosa* 71. Тест-культуру инкубировали в присутствии исследуемых экстрактов в жидкой среде Кинг А при 37°C в течение 20-24 ч. В контроле тест-культуру растили без добавления экстрактов. После инкубации *P. aeruginosa* 71 пигмент, содержащийся в супернатанте, последовательно экстрагировали в хлороформ и соляную кислоту. Интенсивность окраски экстрагента (оптическую плотность) измеряли при длине волны 540 нм с помощью анализатора Bioscreen. Уровень образования пиоцианина в экстрактах оценивали по изменению оптической плотности к контролю, принятому за 100 % (Schaber et al., 2004). Работа проведена совместно с к.б.н. Н.Э. Грамматиковой (ГНЦ по антибиотикам).

Метод оценки подавления образования биопленок *Pseudomonas aeruginosa* 71. Тест-культуру инкубировали в жидкой среде Мюллер-Хинтон в течение 24 часов при температуре 37°C, затем вносили исследуемые экстракты и инкубировали тест-культуру в присутствии экстрактов последующие 24 ч. Образовавшиеся биопленки промывали буфером и окрашивали красителем кристаллвиолетом. Извлечение красителя из биопленок осуществляли смесью ацетон-этанол (1:4). Интенсивность окраски экстрагента (оптическую плотность) определяли при длине волны 540 нм с помощью спектрофотометра Graphicord UV-240 («Shimadzu», Япония). Плотность биопленок, полученных в присутствии исследуемых веществ, оценивали по отношению к контролю (интактной биопленке), принятому за 100% (Hu et al., 2006).

Изучение биологически активных компонентов штаммов *Aspergillus ustus* №21 и *Penicillium chermesinum* №26. Исследовали этилацетатный и ацетоновый

экстракты отобранных штаммов. Разделение фракций проводили методом ТСХ на пластинах Silufol 254 UV, в системе петролейный эфир-ацетон (1:1). В среду Мюллер-Хинтон агар вносили аутоиндукторы и суспензию *C. violaceum* CV026. Биопроявление компонентов фракций осуществляли наложением пластин на агаризованную среду. Присутствие активных фракций определяли по зоне отсутствия пигментации выросшей тест-культуры. Проводили определение УФ спектра активных фракций на спектрофотометре Graphicord UV-240.

Метод оценки гемолитической активности биологически активных соединений. Гемолитическую активность исследовали на 5% кровяном агаре. Ацетоновые экстракты из мицелия вносили по 100 мкл в лунки. Инкубировали в термостате в течение 1 часа при 37 °С. Активность оценивали по диаметру зон гемолиза вокруг лунки.

Метод оценки фибринолитической и активаторной активности соединений. Нематофаговые гифомицеты растили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 100 мл жидкости, на качалке со скоростью вращения 200 об/мин. и температуре 23-27 °С в течение 14 суток. Способность лизировать фибрин и активировать плазминоген определяли в культуральной жидкости на искусственно созданной основе тромба (фибриновая пластина), с использованием тромбина и фибриногена бычьей крови (Astrup, Mullertz, 1952 цит. по: Шаркова, Максимов, 1999). Работа выполнена совместно со с.н.с. Т.С. Шарковой (МГУ имени М.В.Ломоносова).

Глава 3. Результаты и обсуждение

1. Биоразнообразие сапротрофных и нематофаговых микромицетов

При анализе 110 образцов почвы и связанных с ней субстратов, отобранных в лесной зоне республики Бурятия, обнаружено 88 видов микроскопических грибов, принадлежащих к 33 родам. К отделу *Zygomycota* относятся 6 видов: *Absidia coerulea* Bainier, *Mortierella alpina* Peyronel, *M. elongata* Linnem, *Mucor plumbeus* Bonord., *Mucor* sp., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. Представители отдела *Ascomycota*, формирующие плодовые тела, представлены двумя видами: *Chaetomium perlucidum* Sergeeva и *C. cochlioides* Palliser. Основное разнообразие видов представлено анаморфными аскомицетами (80 видов): светлоокрашенные гифомицеты – *Aspergillus cervinus* Masee, *A. fumigatus* Fresen., *A. nidulans* (Eidam) G. Winter, *A. ustus* (Bainier) Thom, Church, *A. versicolor* (Vuill.) Tirab, *Arthrobotrys*

cladodes Drechsler, *A. oligospora* Fresenius, *A. oviformis* Soprunov, *A. superba* Corda, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Epicoccum nigrum* Link, *Fusarium sambucinum* Fuckel, *Gamsylella geophyropaga* (Drechsler) M. Scholler, Hagedorn, A. Rubner, *Geomyces pannorum* (Link) Sigler, Carmich., *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (J.C. Gilman et E.V. Abbott) Schroers, *Gonatobotryum parasiticum* (Thaxt.) Jane Walker et Minter, *Paecilomyces marquandii* (Masse) Hughes, *Penicillium aculeatum* Raper, Fennell, *P. albidum* Sopp, *P. aurantiogriseum* Westling, *P. aurantiogriseum* var. *viridicatum*, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. canescens* Sopp, *P. chermesinum* Biourge, *P. citrinum* Sopp, *P. glabrum* (Wehmer) Westling, *P. funiculosum* Thom, *P. nalgiovense* Laxa, *P. janczewskii* Zalesky, *P. paxilli* Bainier, *P. pinetorum* Chr., Backus, *P. purpurogenum* Stoll, *P. raistrickii* Sm., *P. restrictum* Gilman, Abbott, *P. roseopurpureum* Dierckx, *P. roqueforti* Thom, *P. rubrum* Grassberger, *P. simplicissimum* (Oudem.) Thom., *P. spinulosum* Thom, *P. thomii* Maire, *P. variabile* Mey, *P. velutinum* Beyma, *P. waksmanii* Zalesky, *Tolypocladium geodes* W. Gams; *T. inflatum* W. Gams, *T. microsporum* (Jaap) Bissett, *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf., Nirenberg, *T. atroviride* Karst., *T. hamatum* (Bonord.) Bainier, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *T. spirale* Bissett, *T. viride* Pers; темноокрашенные гифомицеты – *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) Vries, *C. herbarum* (Pers.) Link, *C. macrocarpum* Preuss, *Gilmaniella humicola* Barron, *Humicola grisea* Traaen, *Myrothecium roridum* Tode, *Thysanophora penicillioides* (Roum.) Kendr., *Ulocladium atrum* Preuss, *U. chartarum* (Preuss) Simmons; целомицеты – *Phoma eupyrena* Sacc., *P. glomerata* (Corda) Wollenw., Hochapfel, *P. leveillei* Boerema, Bollen, *P. medicaginis* Malbr., Roum, *P. putaminum* Hollós, *Truncatella angustata* (Pers.) Hughes. Ряд культур по морфологическим признакам удалось идентифицировать только до уровня рода: *Acremonium* sp. *Arthrobotrys* sp.1, *Cladosporium* sp., *Coniothyrium* sp., *Dactylella* sp., *Dactylaria* sp.1, *Dactylaria* sp.2, *Oidiodendron* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp.1, *Phoma* sp.2, *Ulocladium* sp. Также были выделены неспорулирующие культуры 13 морфологических типов.

Наиболее богат видами род *Penicillium* (25 видов из 88, 28%), хотя его относительная доля несколько ниже, чем характерно для почв умеренных широт, доля рода *Aspergillus* (5 видов, что составляет 6%), напротив, более значительна (Сизова, 1953; Мишустин, Пушкинская 1960; Мирчинк, 1988; Christensen et al., 2000; Klich, 2002). Среди видов рода *Penicillium* наиболее часто и обильно встречались *P. janczewskii*, *P. aurantiogriseum*, *P. funiculosum*, *P. rubrum*,

P. aculeatum. Высоким видовым разнообразием отличались роды *Phoma* и *Trichoderma*, представленные каждый 7 видами. Остальные, обнаруженные нами рода включали четыре и менее видов (рис. 1).

Хотя большинство обнаруженных почвенных микромицетов являются убиквистами - космополитами, микобиота изученных местообитаний имеет ряд особенностей. Относительно высокое разнообразие и представленность рода *Aspergillus* при сниженной доле рода *Penicillium* сближает этот регион с более южными областями. Выявление характерного для тундровых

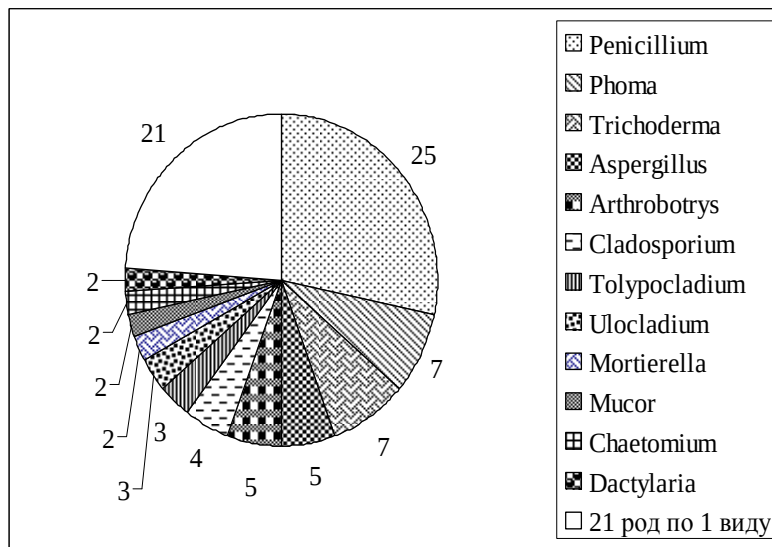


Рис.1. Соотношение количества видов в родах почвенных микромицетов, обнаруженных в образцах, собранных на территории Республики Бурятия.

и таежных местообитаний рода *Tolypocladium*, представленного тремя видами, и сравнительно низкое видовое богатство в целом, напротив, придает микобиоте северные черты (Bissett, 1983; Кирцидели, 1996). Это может объясняться климатическими условиями исследуемого региона, для которого характерны низкий уровень выпадения осадков и глубокое промерзание почвы. Интересной особенностью является обнаружение в лесной подстилке хозяйственно значимого вида *Penicillium roquefortii*, крайне редко встречаемого в европейской части России и микопаразитического гриба *Gonatobotrys parasiticum*.

Нематофаговые гифомицеты, требующие специальных методов выделения, обнаружены во всех исследованных видах субстрата с частотой встречаемости от 10 до 70 % и представлены 9 видами: *Arthrobotrys cladodes*, *A. oligospora*, *A. oviformis*, *A. superba*, *Arthrobotrys* sp.1, *Dactylaria* sp.1, *Dactylaria* sp.2, *Dactylella* sp., *Gamsylella gephyropaga*. Наибольшая частота встречаемости отмечена для штаммов *A. oligospora* (30-70%) и *A. cladodes* (30-60%).

На площадке, заложенной в 2006 г. на территории Заиграевского района в елово-березовом лесу, были отобраны образцы из верхнего горизонта почвы, подстилки, мха и разлагающейся древесины с целью сравнения видового разнообразия. При анализе этих субстратов было выявлено 58 видов

сапротрофных микромицетов. Наибольшие значения индекса видового разнообразия Шеннона (H) и обратной формы индекса доминирования Симпсона (1/D) получены нами для древесины (H = 2.97; 1/D = 16.04) и почвы (H = 2.78; 1/D = 12.13). Наименьшие значения отмечены для подстилки (H = 2.42; 1/D = 5.86) и мха (H = 2.32; 1/D = 8.18) (табл. 1).

В почве наиболее частыми видами были: *Acremonium* sp., *Aspergillus ustus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Trichoderma spirale*, равно часто в подстилке и почве встречался *Geomyces pannorum*. Для подстилки были характерны виды *Beauveria bassiana*, *P. funiculosum*, *P. janczewskii*, *P. simplicissimum*, для древесины обычны *Arthrobotrys cladodes*, *Clonostachys rosea*, *P. aculeatum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, в образцах мха характерных видов не было обнаружено, чаще других выделялись *B. bassiana* и *T. harzianum*.

Таблица 1

Количественные данные и показатели разнообразия комплекса микромицетов в разных субстратах на экспериментальной площадке

Тип субстрата:	Почва	Подстилка	Древесина	Мох
Количество образцов	10	10	10	10
Количество обнаруженных видов	24	31	31	20
Среднее количество видов в образце	6.9±2.4	8.1±3.5	6.8±3.5	3.6±1.6
Количество спор на 1 г воздушно сухой почвы (тыс.)	15.2±10.4	37.8±16.1	30.9±16.1	109.7±80.7
Индекс разнообразия Шеннона (H')	2.78	2.42	2.97	2.32
Выравненность (E)	0.86	0.70	0.86	0.77
Обратная форма индекса доминирования Симпсона 1/D	12.13	5.86	16.04	8.18

2. Биологическая активность исследуемых микромицетов

Исследование биологической активности проводили у 57 штаммов, относящихся к 52 видам из 23 родов: *Absidia coerulea* №4, *Alternaria alternata* №14, *Arthrobotrys cladodes* №48, *A. oligospora* №45, *A. oviformis* №44, *A. superba* №32a, *A. superba* №46, *Aspergillus cervinus* №19, *A. nidulans* №20, *A. versicolor* №22, *A. ustus* №21, *A. versicolor* №22, *Beauveria bassiana* №37, *Chaetomium perlucidum* №12, *Cladosporium cladosporioides* №15, *C. herbarum* №16, *Clonostachys rosea* f.

catenulata №1, *Dactylella* sp. №38a, *Fusarium sambucinum* №10, *Gamsylella geophyropaga* №47, *Geomyces pannorum* №13, *Gonatobotryum parasiticum* №7, *Humicola grisea* №17, *Paecilomyces marquandii* №3, *Penicillium aculeatum* №23, *P. albidum* №24, *P. aurantiogriseum* №28, *P. aurantiogriseum* var. *viridicatum* №24a, *P. canescens* №25, *P. chermesinum* №26, *P. chrysogenum* №25a, *P. chrysogenum* №28a, *P. citrinum* №16a, *P. citrinum* №27, *P. citrinum* №49, *P. funiculosum* №30, *P. glabrum* №29, *P. nalgiovense* №31, *P. spinulosum* №33, *P. paxilli* №32, *P. raistrickii* №34, *P. restrictum* №50, *P. roqueforti* №36, *P. roseopurpureum* №35, *P. rubrum* №38, *P. simplicissimum* №39, *P. spinulosum* №40, *P. thomii* №42, *P. variable* №11, *P. waksmanii* №43, *Phialophora* sp. №41, *Phoma eupyrena* №9, *Tolypocladium inflatum* №2, *T.microsporium* №5, *Thysanophora penicillioides* №8, *Truncatella angustata* №6, *Ulocladium atrum* №18.

2.1. Спектр антибиотической активности исследуемых грибов

Антибиотическая активность была выявлена у 34 культур, что составляет 60% от общего числа исследуемых штаммов. Из которых 20 культур, продуцируют соединения, подавляющие рост только бактерий, 7 - грибов и 7 образуют соединения с антибактериальной и антигрибной активностями.

Наибольшее число штаммов (22) подавляло рост грамположительных бактерий, 11 штаммов подавляли рост грамотрицательных бактерий (табл. 2). Среди исследованных культур наибольший интерес представляют штаммы, подавляющие рост *S. aureus* 43300 (MRSA), резистентного к метициллину и другим бета-лактамам антибиотикам: *Penicillium restrictum* №50, *Gamsylella geophyropaga* №47, *Arthrobotrys superba* №32a, *P. chrysogenum* №28a, *Humicola grisea* №17 и *Ulocladium atrum* №18. Интересны штаммы, обладающие избирательной активностью в отношении грамотрицательных бактерий: *P. simplicissimum* №40, *P. glabrum* №29, *Beauveria bassiana* №37, *P. waksmanii* №43, *A. cladodes* №48 (табл. 3).

Антигрибная активность была обнаружена у 14 штаммов (табл. 4). Культуры *Penicillium variable* №11, *P. aculeatum* №23, *P. albidum* №24, *Phoma eupyrena* №9 представляют интерес для дальнейшего исследования как продуценты антибиотиков с избирательной активностью в отношении *A. niger*.

В качестве тест-культур нами были использованы клинические изоляты *Candida albicans* 616 и *C. krusei* 32/1, *C. krusei* 600M. Показано, что штаммы *Tolypocladium inflatum* 2 и *T.microsporium* 5 подавляют рост *C. krusei* 600M.

Отмечено, что дрожжи *C. krusei* часто отличаются природной резистентностью к широко применяемым средствам лечения кандидозов (Samaranayake, 1997).

В результате исследования были выявлены продуценты антибиотиков, активных в отношении большинства исследуемых тест-организмов, при этом антибиотические соединения были обнаружены преимущественно в культуральной жидкости.

Таблица 2

Штаммы грибов, активные в отношении грамположительных бактерий

Штамм	Диаметр зоны подавления роста для культуральной жидкости / экстракта из мицелия (мм)							
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		<i>B.cereus</i> var. <i>mycoides</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		<i>S. aureus</i> ATCC43300 (MRSA)	
	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки
<i>Absidia coerulea</i> №4		0/11					22/0	
<i>A. superba</i> №32a					12/0		12/0	
<i>Aspergillus nidulans</i> №20		12/0		0/18				
<i>A. ustus</i> №21				22/0				
<i>A.versicolor</i> №22				19/0				18/0
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> №1	12/12							
<i>Chaetomium perlucidum</i> №12					19/0			
<i>Cladosporium cladosporioides</i> №15						17/0		
<i>Gamsylella gephyropaga</i> №47					27/0		13/0	
<i>Paecilomyces marquandii</i> №3	11/13	13/15						
<i>P. chrysogenum</i> №25	0/19				23/0			
<i>P. citrinum</i> №27	0/12							
<i>P. aurantiogriseum</i> №28	0/16	10/0						
<i>P. chrysogenum</i> №28a					0/16		0/20	
<i>P. roqueforti</i> №36	13/22	14/28						
<i>P. citrinum</i> №49		14/10						
<i>P. restrictum</i> №50					14/0		13/0	
<i>Phialophora</i> sp. №41			25/0		28.5/0			
<i>Tolypocladium inflatum</i> №2	19/15	13/10		22/0				
<i>T.microsporum</i> №5				18/0				
<i>Humicola grisea</i> №17	12/12	10/14	0/18.5		25/20	16/0	17/20	
<i>Ulocladium atrum</i> №18	13.5/13	10/0	0/12		23/15	17/0	18/20	

Примечание. Диаметр лунки - 9 мм.

Таблица 3

Штаммы грибов, активные в отношении грамотрицательных бактерий

Штамм	Диаметр зоны подавления роста для культуральной жидкости / экстракта из мицелия (мм)			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки
<i>Arthrotrichum cladodes</i> №48			0/12	
<i>Beauveria bassiana</i> №37		12/0		
<i>Chaetomium perlucidum</i> №12			18/0	
<i>Gamsylella gephyropaga</i> №47			0/12	
<i>P. glabrum</i> №29		15/0		
<i>Penicillium chrysogenum</i> №28a	0/10		0/20	
<i>P. citrinum</i> №49				20/0
<i>P. restrictum</i> №50				0/13
<i>P. spinulosum</i> №40	10/0	22/0	14/0	
<i>P. waksmanii</i> №43		11.5/0		
<i>Tolypocladium inflatum</i> №2		11/0		

Примечание. Диаметр лунки -9 мм.

Таблица 4

Штаммы микромицетов, активные в отношении грибов

Штамм	Диаметр зоны подавления роста для культуральной жидкости / экстракта из мицелия (мм)					
	<i>Candida albicans</i> CBS 8836		<i>Candida krusei</i> 600M		<i>Aspergillus niger</i> 137a	
	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> №1					0/26	
<i>Fusarium sambucinum</i> №10		28/0				
<i>Gamsylella gephyropaga</i> №47	0/11					
<i>Humicola grisea</i> №17	0/15	13/0			16/17	
<i>P. aculeatum</i> №23						0/13
<i>P. albidum</i> №24						0/14
<i>P. nalgiovense</i> №31		18/0				
<i>P. roquefortii</i> №36					24/18	13/18
<i>P. variable</i> №11						13/0
<i>Phoma eupyrena</i> №9					12/0	
<i>Tolypocladium inflatum</i> №2		14/0		13/0	31/28	26/16
<i>T. microsporum</i> №5		12/0	12/0	20/0		0/10
<i>Truncatella angustata</i> №6						0/10
<i>Ulocladium atrum</i> №18					12/0	11.5/0

Примечание. Диаметр лунки - 9 мм.

2.2. Идентификация антигрибного антибиотика, продуцируемого штаммом *Tolypocladium inflatum* № 2

Штамм *Tolypocladium inflatum* № 2 обладает хорошо выраженной антигрибной активностью в отношении тест-культуры *Aspergillus niger* 137a (зона подавления роста составила 16 – 31 мм), подавляет рост эталонного штамма *Candida albicans* CBS 8836 (14 мм) и клинического изолята *C. krusei* 600 M (13 мм).



Рис. 2. Конидиальное спороношение *Tolypocladium inflatum* № 2

Обнаружена антибактериальная активность у штамма *T. inflatum* № 2 в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (13-19 мм), *B. cereus* var. *mycoides* (22 мм) и грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (11 мм).

Подробное описание морфологии *T. inflatum* № 2 было проведено с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии («Hitachi» S-405 A) (рис. 2).

Высокоактивный антигрибной антибиотик извлекали из культуральной жидкости гриба этилацетатом и из биомассы - ацетоном. Полученные экстракты анализировали методом ТСХ в сравнении с контролем циклоспоринов А, В и С штамма *T. inflatum* 106 (Бибикова и др., 1989).

Биологически активные компоненты фракции А подавляли рост *A. niger* 137a. Показано, что эта фракция имела хроматографическую подвижность, аналогичную циклоспорином в данной системе растворителей (рис. 3).

Компоненты фракций В1-3 подавляли рост грамположительных бактерий, но не обладали антигрибной активностью. Компоненты фракции С не обладали ни антигрибной, ни антибактериальной активностями.

Анализ комплекса циклоспоринов, проведенный методом ВЭЖХ, показал, что содержание циклоспоринона А в мицелии и культуральной жидкости составляет 54 и 67%, циклоспоринона В - 39.7 и 10%, С - 3.2 и 23%, (Leu4) - 3.1% в биомассе.

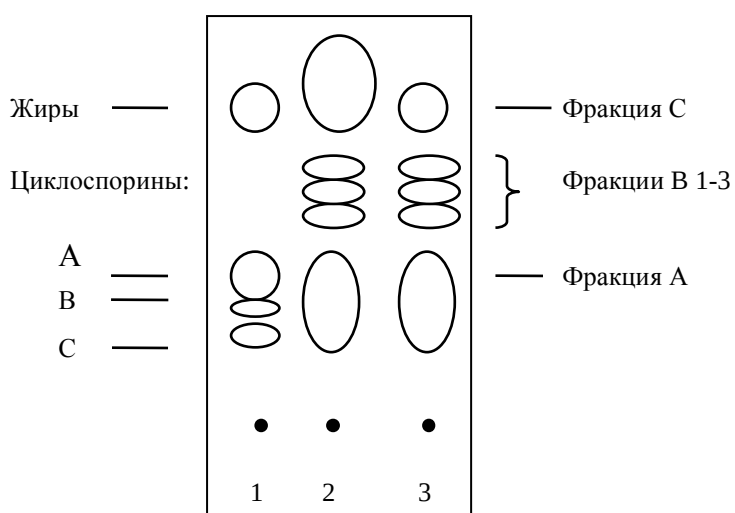


Рис. 3. Схема хроматографической подвижности биологически активных компонентов штамма *Tolypocladium inflatum* № 2 в системе растворителей бензол:ацетон.

1. контроль - циклоспорины А,В,С и жиры штамма *T. inflatum* 106;
2. экстракт из мицелия *T. Inflatum* №2;
3. экстракт из культуральной жидкости *T. inflatum* №2.

Полученные данные показывают, что исследуемый штамм *T. inflatum* №2 продуцирует комплекс циклоспоринов, однако, соотношение компонентов в комплексе значительно отличается от описанных в литературе. Большинство описанных в литературе продуцентов циклоспоринов образуют комплексы, в которых циклоспорины А, В и С составляют 40-70%; 10-15%; 20-30% соответственно. Остальные циклоспорины находятся в следовых количествах (Von Wartburg, Traber, 1986; Бибикова и др., 1989, Buchta et al., 1998).

Содержание циклоспорино А штамма *T. inflatum* №2 соответствует большинству описанных продуцентов, однако содержание в биомассе продуцента циклоспорино В является значительно более высоким, а содержание циклоспорино С очень низким. Отличает этот штамм и заметное количество циклоспорино (Leu 4)Cs.

2.3. Анализ ингибирования системы кворум-сенсинг и факторов вирулентности бактерий

Кворум-сенсинг (QS) - это способность микроорганизмов регулировать экспрессию тех или иных генов в зависимости от плотности популяции. Передача информации между клетками микроорганизмов осуществляется сигнальными веществами различной природы. У грамотрицательных бактерий это аутоиндукторы N-ацилгомосеринлактоны (AHL). Система QS регулирует синтез факторов вирулентности патогенных бактерий (Hentzer et al., 2003) и формирование биопленок (Davies et al., 1998).

2.3.1. Анализ ингибирования образования пигмента виолацеина у природного штамма *Chromobacterium violaceum* 7 и мутантного штамма *C. violaceum* CV026

Природный штамм *Chromobacterium violaceum* 7 образует фиолетовый пигмент виолацеин. Синтез пигмента регулируется системой QS, которая включает AHL, белок регулятор LasR и ген синтазы AHL, последний регулирует синтез аутоиндукторов. Сигнальные молекулы продуцируются бактерией и свободно диффундируют из клетки в окружающую среду. При достижении определенной концентрации в среде аутоиндукторы проникают в бактериальные клетки, связываются с LasR и активируют ген синтазы AHL, что приводит к их массовой продукции. Дальнейшее увеличение концентрации AHL приводит к ингибированию их образования. Механизм действия ингибиторов на систему QS бактерий может определяться деградацией молекулы AHL ингибитором, конкурентным связыванием ингибитора с белком регулятором LasR, либо способностью ингибитора инактивировать ген синтазы AHL (Rasmussen, Givskov, 2006). Мутантный штамм *C. violaceum* CV026 имеет инактивированный ген синтазы AHL, что приводит к неспособности синтезировать AHL и образовать пигмент (McClean et al., 1997). Образование виолацеина индуцировали внося в среду культивирования химически синтезированные AHL.

11 штаммов грибов проявили способность подавлять образование пигмента виолацеина у природного штамма *C. violaceum* 7: *Aspergillus ustus* №21, *Beauveria bassiana* № 37, *Cladosporium cladosporioides* №15, *Humicola grisea* №17, *Penicillium chermesinum* № 26, *P. chrysogenum* №28, *P. rubrum* №38, *P. spinulosum* №40, *P. steckii* №49, *Phialophora* №41, *Tolypocladium microsporum* №5. Способность подавлять образование пигмента у мутантного штамма *C. violaceum* CV026 в присутствии экзогенно внесенных аутоиндукторов обнаружена только у культур *Aspergillus ustus* №21, *P. chermesinum* №26 и *Arthrotrix oviformis* №44. Исследуемые экстракты образовывали вокруг лунок зоны подавления пигментации: *A. oviformis* №44 - 15 мм, *P. chermesinum* №26 - 20 мм и *A. ustus* №21 - 25 мм.

Для дальнейшей работы нами были отобраны штаммы *Aspergillus ustus* №21 и *P. chermesinum* №26, проявившие способность подавлять образование пигмента виолацеина у обеих тест-культур. Возможно, что отобранные штаммы образуют соединения, которые либо инактивируют сигнальные молекулы, либо взаимодействуют с белком - мишенью LasR.

2.3.2. Ингибирование стафилолитической активности *Pseudomonas aeruginosa* 71

Протеаза LasA относится к внеклеточным протеазам, является одним из факторов патогенности *Pseudomonas aeruginosa* 71, способствует инвазии в эпителиальные клетки. Штаммы с инактивированным геном протеазы LasA теряют способность к инвазии, а также способность образовывать биопленки.

Экспериментально было показано, что протеаза LasA расщепляет пептидогликановые мостики клеточной стенки *Staphylococcus aureus*. Это является методической основой для оценки активности протеазы LasA (Kessler et al., 1997). В основе эксперимента лежит возможность определить стафилолитическую активность протеазы по степени разрушения клеточных стенок стафилококка.

Использовали ацетоновые экстракты из мицелия штаммов *Aspergillus ustus* №21, *Penicillium chermesinum* №26.

При постановке эксперимента в жидкой среде, количество разрушенных протеазой клеточных стенок составило 26 % от исходной величины и со временем достигло 37 %. В присутствии исследуемых экстрактов разрушения клеточных стенок *S. aureus* ATCC 29213 не наблюдалось (рис. 4).

На агаризованной питательной среде тест-культура *P. aeruginosa* 71 лизировала клеточные стенки *S. aureus* ATCC 29213, содержащиеся в среде. Зона просветления питательного агара составила 35 мм. В присутствии исследуемых экстрактов наблюдали уменьшение зоны просветления.

В присутствии экстракта №21 в концентрации 25 мкг/мл зона просветления составила 15 мм, при внесении 50 мкг/мл и выше экстракт продуцента *A. ustus* №21 полностью подавлял разрушение клеточных стенок. В присутствии

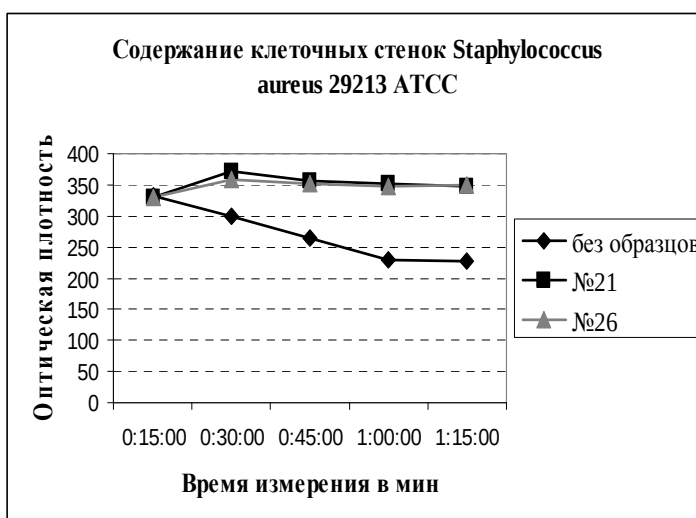


Рис. 4. Стафилолитическая активность *Pseudomonas aeruginosa* 71 и ее ингибирование в присутствии экстрактов из мицелия штаммов *Aspergillus ustus* №21, *Penicillium chermesinum* №26 (330 мкг/мл).

экстракта №26 зона просветления составила 20 мм, при внесении 50 и 100 мкг/мл зона просветления составила 10 мм.

Полученные данные показывают, что исследуемые штаммы *Aspergillus ustus* №21 и *Penicillium chermesinum* №26 способны ингибировать стафилолитическую активность клинического изолята *P. aeruginosa* 71.

2.3.3. Ингибирование пиоцианазной активности *Pseudomonas aeruginosa* №71

Пигмент пиоцианин, является фактором вирулентности *P. aeruginosa*, вызывает воспаление тканей макроорганизма (Gallagher et al., 2002), обладает антибиотической активностью.

Экстракт из мицелия штамма *A.ustus* №21 в концентрации 100 – 200 мкг/мл ингибировал образование пиоцианина на 39 – 57 %, однако при снижении концентрации экстракта до 50 мкг/мл подавление роста не было отмечено, а при концентрации экстракта 12.5 мкг/мл уровень образования пиоцианина был выше контроля и достигал 144%. Экстракт штамма *P. chermesinum* №26 оказывал ингибирующее действие в меньшей степени (табл. 5).

Представляет несомненный интерес дальнейшее изучение активного начала экстракта №21. Интересен тот факт, что наряду с ингибированием компоненты экстракта штамма *A. ustus* №21 обладали и обратным свойством, они активировали образование пиоцианина *P. aeruginosa* 71.

Из литературных данных известно, что фураноновые соединения обладают способностью в разных концентрациях как ингибировать, так и активировать проявление факторов вирулентности (Hentzer et al, 2003).

Таблица 5

Образование пиоцианина в присутствии экстрактов грибных культур

Концентрация экстракта в мкг/мл	Уровень образования пиоцианина по отношению к контролю в %	
	<i>Aspergillus ustus</i> №21	<i>Penicillium chermesinum</i> №26
12.5	144	88
25	117	73
50	100	91
100	61	77
200	43	77
Контроль	100	100

2.3.4. Оценка способности отобранных экстрактов подавлять образование биопленок у штамма *Pseudomonas aeruginosa* 71

Экстракты из мицелия культур *Aspergillus ustus* №21 и *Penicillium chermesinum* №26 были исследованы на способность подавлять образование биопленок клинического изолята *P. aeruginosa* 71.

Исследуемые экстракты в концентрациях 50 и 100 мкг/мл подавляли образование биопленок. Внесение экстракта №21 приводило к снижению плотности биопленок относительно контроля на 26 и 33% соответственно. В присутствии экстракта №26 плотность биопленок снижалась на 34 и 42% (рис. 5).

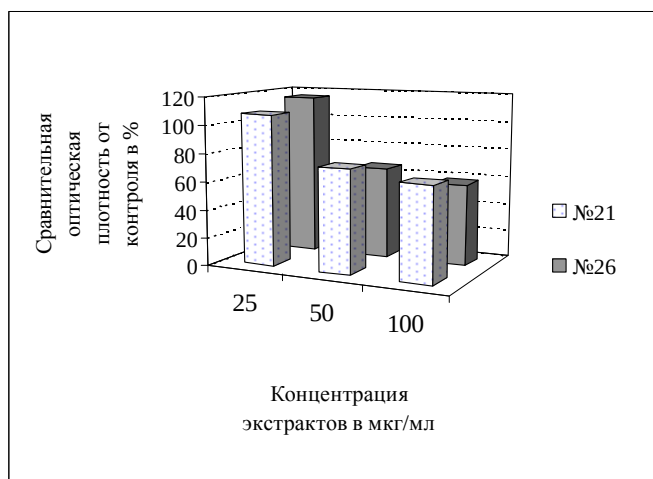


Рис. 5. Ингибирующее действие экстрактов штаммов *Aspergillus ustus* №21 и *Penicillium chermesinum* №26 на формирование биоплёнки штаммом *Pseudomonas aeruginosa* 71.

2.3.5. Анализ комплексов биологически активных веществ *Aspergillus ustus* № 21 и *Penicillium chermesinum* № 26

Методом ТСХ были проанализированы экстракты из мицелия штаммов №21 и №26. Значения показателя подвижности компонентов R_f фракции штамма *A. ustus* №21 составили: А-0.19, В-0.23, С-0.3, D-0.44, Е-0.77. Значения R_f для фракций штамма *P. chermesinum* №26 составили: А-0.19, В-0.6, С-0.88 (рис. 6).

Было показано, что компоненты фракций А,В,С,D штамма *A. ustus* №21 и фракций А,В *P. chermesinum* №26 подавляли рост *C. violaceum* CV026. Фракции Е и С не оказывали какой либо активности на тест-культуру.

Было обнаружено, что образование пигментации у *C. violaceum* CV026 подавляют компоненты, находящиеся на линии старта хроматограммы и не обладающие подвижностью в данной системе растворителей, что свидетельствует о их гидрофильности.

Антибиотик патулин, образующийся многими культурами рода *Penicillium* spp., известен как ингибитор кворум-сенсинг бактерий (Rasmussen et

al., 2005), имеет максимум поглощения УФ-света при 276 нм и восстанавливает перманганат калия (Korzybski et al., 1969).

Исследуемые компоненты экстрактов №21 и №26 не восстанавливали перманганат калия и имели иные УФ спектры поглощения.

Нами показано, что активные компоненты экстракта из мицелия штамма *A. ustus* №21 имеют максимум поглощения при длинах волн 260-265 нм и экстракта из культуральной жидкости - 285 нм. Активные компоненты экстракта из мицелия штамма *P. chermesinum* №26 имеют максимум поглощения при длине волны 205 нм и при 265 нм в экстракте из культуральной жидкости.

В результате полученных данных можно сказать, что штаммы *A. ustus* №21, *P. chermesinum* №26 образуют различные соединения, обладающие способностью ингибировать QS и данные соединения не являются патулином.

2.4. Оценка гемолитической активности экстрактов

Нами были исследованы экстракты из мицелия 57 культур. Гемолитическая активность была обнаружена у штаммов *Penicillium restrictum* №50 и *P. aurantiogriseum* var. *viridicatum* №24a. Диаметр зоны гемолиза вокруг лунки составил 23 и 17 мм соответственно. Штаммы *A. ustus* №21 и *P. chermesinum* №26 не проявляли гемолитической активности.

Таким образом, культуры *A. ustus* №21 и *P. chermesinum* №26, способные ингибировать кворум-сенсинг бактерий, не вызывают гемолиз эритроцитов.

2.5. Оценка фибринолитической активности нематофаговых гифомицетов

Нематофаговый гифомицет *Arthrobotrys longa* Mecht. продуцирует протеиназный комплекс, обладающий фибринолитической и активаторной

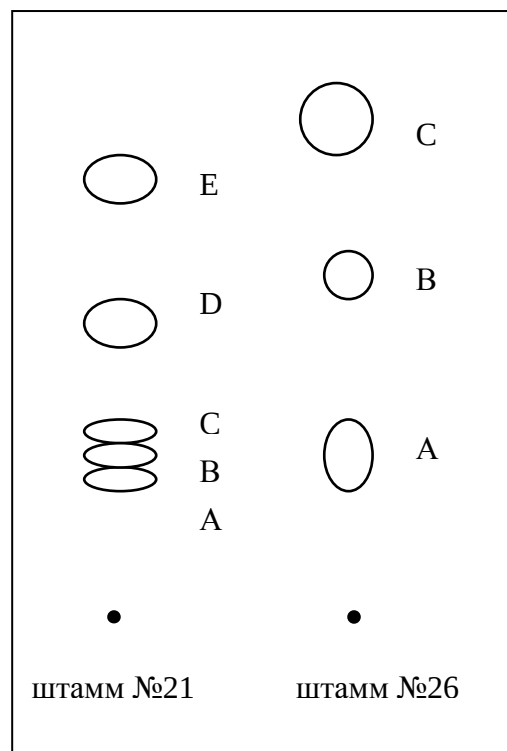


Рис. 6. Схема хроматографической подвижности биологически активных компонентов штаммов *A. ustus* №21, *P. chermesinum* №26 в системе растворителей петролейный эфир: ацетон.

активностями (активирует плазминоген крови) (Шаркова и др., 1988; Шаркова, Максимов, 1999).

Нами обнаружена способность лизировать тромбы крови экстрактами штаммов *A. oligospora* №45 и *A. cladodes* №48. Зоны фибринолитической и активаторной активностей для *A. oligospora* №45 составили 25 и 16 мм², их отношение составило 64%, для штамма *A. cladodes* №48 - 30 и 21 мм², 70% соответственно. Таким образом, показано, что исследуемые штаммы продуцируют соединения, способные лизировать фибрин крови, а также образуют вещества, которые способствуют превращению плазминогена в плазмин и растворению фибрина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе видового состава микроскопических грибов, выделенных из образцов почвы и смежных с нею субстратов, собранных на территории Республики Бурятии выделено 88 видов из 33 родов. Первичный поиск, проведенный среди 57 штаммов, относящихся к 52 видам из 23 родов, показал, что 66% (38 штаммов) микромицетов являются продуцентами антибиотических соединений различного спектра действия, комплекса циклоспоринов, ингибиторов системы кворум-сенсинг. Отмечены культуры, высокоактивные в отношении метициллинрезистентного стафилококка, культуры, обладающие избирательной активностью в отношении грамотрицательных бактерий, в отношении *Aspergillus niger*, *Candida* spp., в том числе клинического изолята. Обнаружены штаммы, обладающие широким спектром действия. Выделенный нами штамм *Tolypocladium inflatum* № 2 продуцирует комплекс циклоспоринов с неописанным ранее соотношением компонентного состава. Культура представляет интерес как для изучения свойств отдельных циклоспоринов, так и может быть использована для разработки аналогов циклоспоринола А. Представленные в работе данные подтверждают, что образование комплекса циклоспоринов является дополнительным признаком при идентификации грибов рода *Tolypocladium*. Способность культуры продуцировать те или иные соединения позволяет четко дифференцировать грибы родов *Tolypocladium* и *Beauveria* и является таксономическим признаком (Kadlec et al., 1994). Выявлены культуры нематофаговых гифомицетов, продуцирующие соединения, с фибринолитической и активаторной активностями.

Широкий пул биологически активных веществ, образуемый грибами способствует успеху микроскопических грибов в конкурентной борьбе за

субстрат и определяет их ведущую роль в формировании микробных комплексов. Одной из таких особенностей является ингибирование системы кворум-сенсинг бактерий, которая выявлена у 12 штаммов из 57 исследованных. Штаммы *Aspergillus ustus* № 21 и *Penicillium chermesinum* № 26 проявили наибольшую активность в ингибировании системы кворум-сенсинг и способность подавлять факторы вирулентности клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa* 71.

Таким образом, изучение микроскопических грибов Бурятии позволило выявить широкое разнообразие грибов-продуцентов различных биологически активных соединений.

ВЫВОДЫ

1. На территории Республики Бурятия выявлено 88 видов, принадлежащих к 33 родам из отделов Zygomycota, Ascomycota и группы анаморфных грибов. Наиболее богат видами род *Penicillium*. Из них наиболее обильны *P. janczewskii*, *P. aurantiogriseum*, *P. funiculosum*, *P. rubrum*, *P. aculeatum*. Широко представлены виды родов *Trichoderma* и *Phoma*. Обнаружено 9 видов нематофаговых гифомицетов, из которых часто встречались *Arthrobotrys oligospora* и *A. cladodes*.
2. Отобраны штаммы, продуцирующие антибактериальные вещества широкого и узкого спектра действия, а также антигрибные антибиотики. 6 штаммов обладали антибиотической активностью в отношении метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* 43300 (MRSA) и *S. aureus* ATCC 29213. Отобрано 5 штаммов, активных в отношении грамотрицательных бактерий. Установлена антигрибная активность у 14 штаммов, из которых, отобрано 2 штамма, подавляющие рост клинического изолята *Candida krusei* 600M.
3. Отобран штамм *Tolypocladium inflatum* № 2, продуцирующий комплекс циклоспоринов с необычным соотношением компонентного состава. Содержание циклоспоринов А, В и С *T. inflatum* № 2 составляет 54-67%, 10-39.7% и 3.2-23% соответственно, установлено заметное количество циклоспорина (Leu 4) Cs (3.1%).
4. Показана способность 12 штаммов ингибировать систему кворум-сенсинг у бактерии *Chromobacterium violaceum*.

5. Показана способность штаммов *Aspergillus ustus* № 21, *Penicillium chermesinum* № 26 образовывать соединения, ингибирующие систему кворум-сенсинг и факторы вирулентности грамотрицательных бактерий:
- подавляют синтез виолацеина штаммов *Chromobacterium violaceum* 7 и *C. violaceum* CV026;
 - ингибируют образование фактора вирулентности пигмента пиоцианина клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa* 71;
 - подавляют активность протеазы LasA, определяющей высокую вирулентность *Pseudomonas aeruginosa* 71;
 - подавляют образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa* 71.
6. Показана способность *Arthrobotrys oligospora* № 45 и *A. cladodes* № 48 продуцировать соединения, осуществляющие фибринолиз тромбов крови, то есть проявляющие фибринолитическую и плазминоген-активаторную активности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендуемых ВАК

1. Бибикова М.В., Дарханова Т.А., Спиридонова И.А., Даниленко А.Н., Катлинский А.В. Комплекс циклоспоринов продуцируемый штаммом *Tolypocladium inflatum* Gams, выделенным из почвы Бурятии // Антибиотики и химиотерапия. 2009. Т. 54. № 9-10. С. 6 -9.
2. Дарханова Т.А., Грамматикова Н.Э., Александрова А.В., Бибикова М.В. Микромицеты Бурятии как продуценты биологически активных веществ // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. Вып. 3. С. 217-224.
3. Дарханова Т.А., Александрова А.В. Почвенные микромицеты лесных местообитаний Республики Бурятия // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. Вып. 6. С. 507-515.
4. Грамматикова Н.Э., Дарханова Т.А., Бибикова М.В. Образование мицелиальными грибами Бурятии ингибиторов – факторов вирулентности бактерий // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45. Вып. 1. (в печати).

Материалы и тезисы конференций

5. Дарханова Т.А., Александрова А.В. Нематофаговые гифомицеты и их некоторые биологические особенности // Биоразнообразие экосистем

внутренней Азии. Материалы международной конференции. Улан-Удэ, 2006. С. 116.

6. **Дарханова Т.А.** Видовое богатство почвенных микромицетов Республики Бурятия // Ломоносов–2008. Тезисы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Москва, 2008. С. 119-120.
7. **Дарханова Т.А.,** Александрова А.В. Нематофаговые гифомицеты, их взаимодействие с почвенной микрофлорой // Современная микология в России. Тезисы докладов второго съезда микологов России. Москва, 2008. С. 62-63.
8. Бибикова М.В., Спиридонова И.А., Даниленко А.Н., **Дарханова Т.А.,** Катлинский А.В. Сравнение компонентного состава комплексов циклоспорина, продуцируемых различными штаммами *Tolypocladium* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. № 2. Труды I междисциплинарного микологического форума. Т. 2. Москва, 2009. С. 162-163.
9. Бибикова М.В., **Дарханова Т.А.** *Penicillium roqueforti* 36, выделенный из почвы Бурятии // Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы Московского международного конгресса. Москва, 2008. С. 51.
10. **Дарханова Т.А.,** Бибикова М.В., Грамматикова Н.Э. Микромицеты Бурятии как продуценты биологически активных соединений // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 1. Труды II междисциплинарного микологического форума. Москва, 2010. С. 246-247.
11. **Дарханова Т.А.** Спектр антимикробной активности микромицетов Бурятии // Ломоносов–2010. Тезисы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Москва, 2010. С. 150-151.

Благодарность. Я выражаю искреннюю благодарность научным руководителям Маргарите Васильевне Бибиковой и Алине Витальевне Александровой за неоценимую помощь и всестороннюю поддержку при выполнении работы. Большое спасибо Ирине Ивановне Сидоровой, Марине Леонидовне Георгиевой за полезные советы, Тамаре Сергеевне Шарковой, Ольге Владимировне Камзолкиной, Наталии Эдуардовне Грамматиковой и Инне Анатольевне Спиридоновой за помощь при постановке некоторых экспериментов. Я искренне признательна всему коллективу кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ и коллективу сектора коллекции культур ГНЦА по антибиотикам.