

1  
2           **СПОСОБНОСТЬ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ К ОБРАЗОВАНИЮ**  
3           **АНТИГРИБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ОТБОР ИХ ПРОДУЦЕНТОВ**

4   © А.В. Кураков<sup>\*1</sup>, А.Е. Куварина\*\*, А.А. Баранова\*\*, А.С. Тренин\*\*,  
5   О.П. Бычкова\*\*, В.С. Садыкова\*\*

6           \*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

7           \*\*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых  
8           антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

9  
10 **Аннотация**

11       Методом агаровых блоков оценена способность к продукции антигрибных  
12       соединений среди микроскопических грибов отдела Ascomycota с акцентом на порядки  
13       Eurotiales и Hypocreales. Высокая, умеренная и низкая антимикотическая активность  
14       установлена у 35, 239 и 640 из 934 штаммов, соответственно. Значительно чаще  
15       высокую и умеренную активность проявляли представители порядка Hypocreales (рода  
16       *Trichoderma*, *Acremonium*, *Emericellopsis*, *Acrostalagmus*, *Tolypocladium*, *Stachybotrys*,  
17       *Purpureocillium*), чем грибы порядка Eurotiales (рода *Penicillium*, *Aspergillus*,  
18       *Paecilomyces*, *Eupenicillium*, *Fennellia*). Большинство изолятов с высокой и умеренной  
19       антигрибной активностью были выделены из верхних гумусовых горизонтов почв  
20       (преимущественно лесостепной и степной зоны), верховых торфяников и растительных  
21       остатков. Штаммы с хорошей активностью обнаружены и среди грибов из  
22       экстремальных местообитаний (в родах *Emericellopsis*, *Acrostalagmus*, *Tolypocladium*,  
23       *Bipolaris*, *Verticillium*). Из наиболее активных штаммов грибов рода *Trichoderma* на  
24       основе определения спектра и активности продукции антибиотических соединений и  
25       усвоения 95 органических соединений отобран перспективный продуцент  
26       антимикотиков *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228.

27  
28 **Ключевые слова:** антигрибная активность, микроскопические грибы, отбор  
29       продуцентов антибиотиков, *Trichoderma*

30  
31  
32 The ability to produce antifungal compounds among the microscopic fungi of the division  
33 Ascomycota with emphasis on the order Eurotiales and Hypocreales by the method of agar  
34 blocks was evaluated. High, moderate and low antimycotic activity was established at 35, 239  
35 and 640 strains from 934 tested strains, respectively. The representatives of the order  
36 Hypocreales of the genera *Trichoderma*, *Acremonium*, *Emericellopsis*, *Acrostalagmus*,  
37 *Tolypocladium*, *Stachybotrys*, *Purpureocillium*, demonstrated significantly more high activity

1 compared to fungi of order Eurotiales (the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*,  
2 *Eupenicillium*, *Fennellia*). The majority of isolates with high and moderate antifungal activity  
3 was isolated from the upper humus horizons of soils (mostly forest-steppe and steppe zones),  
4 in bogs of peat and plant residues. Strains with good activity were also detected among fungi  
5 of extreme habitats (representatives of genera *Emericellopsis*, *Acrostalagmus*, *Tolypocladium*,  
6 *Bipolaris*, *Verticillium*). Between active strains of fungi of the genus *Trichoderma* on the  
7 basis of the spectrum and activity of production of antibiotic compounds and the assimilation  
8 of 95 organic compounds was selected *T. citrinoviride* VKPM F-1228 - promising producer  
9 of antifungals.

10

11 Keywords: antifungal activity, microscopic fungi, screening, producers, antibiotics  
12 *Trichoderma*

13

14 Новые антимикотики необходимы во многих сферах деятельности человека -  
15 для защиты от грибного повреждения материалов, продуктов и кормов, для создания  
16 дезинфектантов, фунгицидов и лекарств, присадок в топливо. Микроскопические  
17 грибы отдела Ascomycota и таких его порядков, как Eurotiales и Eurocreales,  
18 представляют особый интерес. Среди представителей обнаружены культуры и на их  
19 основе получены продуценты важнейших антибактериальных препаратов  
20 (пенициллина - штаммов *Penicillium chrysogenum*), иммуносупрессоров (циклоспорина  
21 - *Tolypocladium inflatum*), антибиотиков против дрожжевых и мицелиальных грибов  
22 (гризеофульвина - *Penicillium nigricans*, эхинокандинов - *Aspergillus aculeatus* и *A.*  
23 *nidulans*, зервамицин ПВ - *Emericellopsis salmosynnemata*) (Егоров, 2004; Berdy, 2012;  
24 Abid et al., 2014). Расшифровка области геномов у грибов этой систематической  
25 группы, ответственных за синтез нерибосомальных пептидсинтаз (NRPSs),  
26 поликетидных синтаз (PKSs) и терпеновых синтаз (ТЭС) свидетельствует о  
27 существовании у них еще не выявленных соединений, в том числе с антигрибной  
28 активностью (Balde et al., 2010; Krasnoff et al., 2005; Mendoza-Figueroa et al., 2014).  
29 Высокая токсичность многих антимикотиков, их небольшое разнообразие и  
30 отмечаемое в последние годы развитие у грибов к ним резистентности вынуждает вести  
31 поиск продуцентов новых антигрибных соединений (Тренин, 2015). Эта работа  
32 становится много эффективней, если базируется на знании из каких экотопов  
33 проводить выделение и среди каких систематических групп микроорганизмов вести  
34 скрининг нужных штаммов.

35 Целью работы была оценка распространенности среди микроскопических грибов, с  
36 акцентом на аскомицеты порядков Eurotiales и Eurocreales, способности к  
37 образованию антигрибных соединений, создание на этой основе коллекции  
38 перспективных штаммов и отбор из нее продуцентов антимикотиков.

39

## 1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2           Способность проявлять антимикотическую активность и ее степень выраженности  
3 была определена у 934 штаммов микроскопических грибов, из них коллекционных - 209  
4 (из коллекции кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова) и  
5 свежевыделенных изолятов - 725. Для подавляющего большинства свежевыделенных  
6 изолятов была предварительно проведена идентификация по культурально-  
7 морфологическим признакам до рода или вида, коллекционных штаммов – до вида.  
8 Современное таксономическое положение видов дано по базам данных: The MycoBank  
9 Fungal databases (<http://www.mycobank.org>) и GABI Bioscience Databases Index Fungorum  
10 ([speciesfungorum.org](http://speciesfungorum.org)). В работе использовали микромицеты отдела Ascomycota,  
11 преимущественно, порядков Eurotiales и Нурочреales. Виды даны по телеоморфной  
12 стадии, если они формировали половые структуры при выделении и последующем  
13 культивировании на питательных средах, для остальных аскомицетов названия видов  
14 приведены по анаморфной стадии.

15           Для всех штаммов был известен источник выделения. Они были изолированы из  
16 образцов верхних горизонтов (подстилок, гумусовых, торфяных или пахотных  
17 горизонтов) почв зонального ряда, примитивных почв на вечной мерзлоте, засоленных  
18 и щелочных грунтов и почв, верховых торфяников, выветренных горных пород,  
19 травянистых и древесных остатков, поврежденных книг, плодовых тел грибов, с  
20 поверхности живых растений, зеленых мхов и семян, отобранных в различных  
21 регионах и экотопах, включая экстремальные местообитания. Их список включал  
22 почвы и засоленные грунты побережья Сиваша и соленого озера в г. Феодосия (Крым),  
23 соровые солончаки Казахстана, почвы лесных биоценозов Карадахского заповедника  
24 (Крым), тропических лесов Вьетнама и Португалии (о. Мадейра), примитивные и  
25 торфяные почвы Оймяконского района Якутии, выщелоченный и обыкновенный  
26 чернозем Воронежской и Липецкой областей, темно-каштановые почвы  
27 Краснодарского края, дерново-подзолистые почвы и верховые болота Центрально-  
28 Лесного заповедника (Тверская область), лесных биоценозов бассейна реки Енисей и  
29 ряда других. Выделение микромицетов проводили методом посева водных разведений  
30 или мелкозема на среду Чапека и 3% неохмеленный сусло-агар.

31           Оценку распространения среди микромицетов способности к образованию  
32 антимикотиков и скрининг штаммов-продуцентов антибиотиков проводили методом  
33 агаровых блоков с культурой условно-патогенного штамма *Aspergillus niger* 2K из  
34 коллекции кафедры микологии МГУ им. М.В. Ломоносова и распыления почвенной  
35 суспензии на поверхность сусло-агара с той же тест-культурой (Егоров, 2004,

1 Kawaguchi et al., 2012). Выбор тест-культуры, обусловлен его широкой  
2 распространенностью в различных местообитаниях, и значимостью как агента  
3 биоповреждений, возбудителя корневых гнилей и микозов (Лугаускас и др., 1987;  
4 Domsh et al., 1997, Schuster et al., 2002; ). Высокоактивными считали культуры, у  
5 которых зона задержки роста *A. niger* 2К составляла 25 мм и более, умеренно  
6 активными - с зоной 10-25 мм и слабоактивными - с зоной менее 10 мм.

7 У штаммов, отобранных методом блоков (с зоной подавления *Aspergillus niger* 2К  
8 более 20-25 мм), оценивали активность образования антимикотических веществ в  
9 жидкой среде Сабуро. Те из них, которые согласно методу диффузии дисков, проявляли  
10 высокую антимикотическую активность составляли коллекцию для дальнейшего  
11 скрининга продуцентов антигрибных соединений.

12 Из 9 штаммов рода *Trichoderma* из этой коллекции был проведен отбор  
13 перспективных продуцентов антимикотиков. У них была исследована интенсивность  
14 утилизации 95 органических соединений и ингибирующая активность на широком  
15 наборе тест-культур. Все они были идентифицированы на основе анализа  
16 нуклеотидной последовательности участков ITS 5,8s РНК.

17 Интенсивность утилизации органических соединений этими штаммами  
18 определяли методом Biolog Phenotype MicroArray (PM) system (Tanzer et al., 2003;  
19 Druzhinina, 2006). Как - кратко – 1-2 предложения про БИОЛОГ- кж раскапывали ...

20 Спектр антимикотической активности штаммов определяли при росте на 3-х  
21 жидких средах (Сабуро, сусло и Чапеке) методом дисков с тест-культурами  
22 мицелиальных и дрожжевых микроскопических грибов из коллекции культур ФГБНУ  
23 «НИИНА». Эти виды представляют собой широкий набор тест-организмов  
24 микроскопических грибов, в которую включены условно-патогенные и токсичные  
25 виды, виды, вызывающие биоповреждения различных материалов, в том числе  
26 используемых для упаковки продуктов, фитопатогены злаковых и возбудители  
27 плесневения зерна (Лугаускас и др. 1987, Domsh et al., 1997). Условно-патогенные  
28 грибы принадлежали к микромицетам р. *Aspergillus*: *A. oryzae* 1К, *A. niger* 2К, *A. fisheri*  
29 3К, *A. terreus* 4К, *A. fumigatus* 5К, *A. ustus* 6К, *A. flavus* 7К, *A. nidulans* 8К, *A. niger* INA  
30 00760; дрожжевые условно-патогенные грибы: *Candida albicans* ATCC 2091, *C.*  
31 *tropicalis* INA 00763, *Saccharomyces cerevisiae* INA S1; фитопатогенный вид *Fusarium*  
32 *oxysporum* VKM F-140; токсигенные виды рода *Penicillium*: *P. chrysogenum*, *P.*  
33 *nalgiovence*.. Использовали стерильные бумажные диски (бумага фильтровальная Ф  
34 ГОСТ 12026-76), смоченные в этилацетатных и бутанольных экстрактах из  
35 культуральной жидкости и высушенные в стерильных условиях. Контролем

1 чувствительности тест-организма служили стандартные диски с амфотерицином В  
2 («НИИ Пастера», 40 мкг/мл) и ампициллином («НИИ Пастера», 10 мкг/мл).

3 Минимальную подавляющую концентрацию определяли на *A. niger* INA 00760,  
4 *C. albicans* ATCC 2091, *C. tropicalis* INA 00763, *S.cerevisiae* INA S1, а также штаммах  
5 грамположительных бактерий - *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NCTC  
6 8340, *Staphylococcus aureus* ATCC 21027 и грамотрицательных бактерий – *Escherichia*  
7 *coli* ATCC 25922 ФГБНУ «НИИНА». Для определения МИК в жидких средах  
8 использовали суспензию инокулята тест-организмов в стерильном физиологическом  
9 растворе, доводя до оптической плотности 0.09 для бактерий и 0.11 для грибов.  
10 Эксперименты проводили в стерильных 96-луночных плоскодонных планшетах. Для  
11 этого в лунки каждого планшета вносили сначала по 100 мкл тестируемых экстрактов,  
12 а затем по 100 мкл раствора инокулята тест-культуры. Планшеты инкубировали при 35  
13 °С без встряхивания. Оценку роста культур проводили визуально микроскопированием.  
14 МПК считывали при 24 часов для бактерий и дрожжевых грибов и 48 часов – для  
15 *A. niger*. МПК определяли как минимальную концентрацию экстракта, полностью  
16 предотвращающую рост тест-организма.

17 Токсикологическая оценка отобранных штаммов р. *Trichoderma* была проведена в  
18 испытательном центре (аттестат аккредитации РОСС RU.0001.21ПУ01 до 21.03.2016  
19 г.), по исследованиям для целей добровольной сертификации, декларирования пищевой  
20 продукции и сырья, кормов, воды, выполнения предприятиями программы  
21 производственного контроля (г. Красноярск) и было получено заключение о том, что  
22 данные штаммы не обладают токсичностью и зоопатогенностью для теплокровных  
23 животных и человека.

24 Эксперименты были проведены в 3 – 5 повторностях. Оценка достоверности  
25 различий средних значений дана по критерию Стьюдента для уровня вероятности не  
26 менее 95% с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 10.0.

## 27 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 28 *Распространенность среди микроскопических грибов способности к образованию* 29 *антимикотиков*

30 Из 934 протестированных изолятов микроскопических грибов отдела  
31 Ascomycota 288 штаммов принадлежало к порядку Eurotiales, 219 – Hypocreales и 41  
32 штамм к другим таксонам этого отдела - порядкам Onygenales, Pleosporales, Sordariales,  
33 Capnodiales, Coniochartiales, Chaetosphaeriales, Microascales, Helotiales и Incertae sedis  
34 (табл. 1). Всего было протестировано 197 штаммов, относящихся к 78 видам, 319  
35 штаммов было идентифицированных до 9 родов. 386 изолятов не относилось к

1 вышеуказанным таксонам, и так как среди них не было обнаружено высоко активных  
 2 продуцентов, их дальнейшую идентификацию не проводили. Умеренная и высокая  
 3 антимикотическая активность установлена у 239 штаммов (25,6 %) и 35 штаммов (3,7  
 4 %), остальные 640 штаммов (68,5 %) относились к слабоактивным культурам.

5 Если не исключать штаммы со слабой активностью, то можно констатировать,  
 6 что способностью к образованию антигрибных соединений обладает подавляющее  
 7 большинство изолятов микромицетов исследованных таксонов аскомицетов.

8

9 Таблица 1 – Распространение антимикотической активности среди  
 10 микроскопических грибов различных таксонов отдела Ascomycota

Таксон	Число штаммов	Из них			
		Неактивные	Слабо активные	Умеренно активные	Высоко активные
Порядок <b>Hypocreales</b> (семейства: <i>Bionectriaceae</i> , <i>Hypocreaceae</i> , <i>Nectriaceae</i> , <i>Ophiocordycipitaceae</i> , <i>Incertae sedis</i> – идентифицировано 124 штамма до 31 вида и 95 штаммов до 6 родов)	219	0* / 0**	67 / 30	118 / 54	34 / 16
Порядок <b>Eurotiales</b> (сем- во <i>Trichocomaceae</i> – 64 штамма идентифицировано до 38 видов и 224 штамма до 3 родов)	288	0 / 0	175 / 60	112 / 39	1 / 0,2
Другие порядки ( <i>Onygenales</i> , <i>Pleosporales</i> , <i>Sordariales</i> , <i>Capnodiales</i> , <i>Coniochartiales</i> , <i>Chaetosphaeriales</i> , <i>Microascales</i> , <i>Helotiales</i> , <i>Incertae sedis</i> ) идентифицировано до 9 видов	41	0 / 0	32 / 78	9 / 22	0 / 0

11 \* - число штаммов, \*\* - доля штаммов с указанной активностью к общему числу  
 12 штаммов из данной таксономической группы в %.

13 Из 288 штаммов порядка Eurotiales 112 штаммов (39%) и 1 (0.3%) обладали,  
 14 соответственно, умеренной и высокой антигрибной активностью. Они были  
 15 представлены преимущественно грибами родов *Penicillium*, и *Aspergillus*. Среди  
 16 пенициллов умеренная активность обнаружена у 95 штаммов (42%), и 1 штамм был  
 17 высокоактивным, у аспергиллов 30% изолятов обладали умеренной активностью.  
 18 Грибы родов *Raecilomyces* и *Eurpenicillium* проявляли в большинстве случаев слабую  
 19 антимикотическую активность, но следует отметить, что их выборка была небольшой.

1           Значительно большей антигрибной активностью характеризовались представители  
2           порядка Нуростреалес. Умеренной и высокой антигрибной активностью обладали 118 и  
3           24 из 219 исследованных штаммов, что соответственно 54% и 11% (табл 1). Наиболее  
4           часто способность к образованию соединений с высокой антигрибной активностью  
5           проявляли из гипокрейнных грибы рода *Trichoderma* (16 (12%) и 70 (52%) из 135  
6           штаммов), а также - родов *Tolypocladium*, *Acremonium*, *Emericellopsis*, *Acrostalagmus*  
7           (табл. 2). Среди грибов других порядков довольно часто умеренная активность  
8           выявлена у представителей родов *Cladosporium*, *Bipolaris* (*B.sorghicola*, *B. Secalis*),  
9           *Curvularia*. *Scopulariopsis brevicaulis*. Обнаружено, что штаммы таких таксонов как  
10           *Emericellopsis*, *Acrostalagmus*, *Verticillium zaregamsianum* и некоторые другие,  
11           выделенные из экстремальных содовых биотопов представляются перспективными для  
12           скрининга продуцентов антигрибных соединений. Проверено пока не так много их  
13           изолятов, но подавляющее большинство имело хорошую активность.

14

15           Таблица 2 – Таксоны микроскопических грибов, представители которых часто  
16           проявляют высокую и умеренную антимикотическую активность

Таксон	Общее число штаммо в	Из них			
		Неактивные	Слабо активные	Умеренно активные	Высоко активные
<b><i>Trichoderma</i></b>	135	0(0%)	34 (26%)	70 (52%)	20 (15%)
<i>T. harzianum</i>	7	-	2	3	2
<i>T. polysporum</i>	5	-	2(40%)	3(60%)	-
<i>T. asperellum</i>	4	-	-	2(50%)	2(50%)
<i>T. koningii</i>	4	-	1(25%)	2(50%)	1(25%)
<i>T. viride</i>	4	-	1(25%)	2(50%)	1(25%)
<i>T. gamsii</i>	2	-	-	-	2(100%)
<i>T. citrinoviride</i>	1	-	-	-	1(100%)
<i>Trichoderma</i> sp.	85	-	10(12%)	68(77%)	9 (11%)
<b><i>Emericellopsis</i></b>	21	-	7 (34%)	9 (45 %)	4 (21%)
<i>E. alkaline</i>	19	2 (11%)	7 (22%)	8 (42%)	4 (21%)
<i>E. pallida</i>	1	-	-	1(100%)	-
<i>E. minima</i>	1	-	-	1(100%)	-
<b><i>Cladosporium</i></b>	9	0(0%)	5(55%)	4(45%)	0(0%)
<i>C. macrocarpum</i>	2	-	1(50%)	1(50%)	-

<i>C. longipes</i>	1	-	-	1(100%)	-
<i>C. herbarum</i>	1	-	-	1(100%)	-
<b><i>Tolypocladium</i></b>	7	0(0%)	1(14%)	6(86%)	0(0%)
<i>T.cylindrosporum</i>	3	-	-	3(100%)	-
<i>T. inflatum</i>	3	-	-	3(100%)	-
<b><i>Acrostalagmus</i></b>	5	0(0%)	1(20%)	4(80%)	0(0%)
<i>A. luteoalbus</i>	5	-	1(20%)	4(80%)	-
<b><i>Penicillium</i></b>	227	0 (0%)	134 (59%)	95 (42%)	1 (0,5%)
<i>Penicillium</i> sp.	179	0 (0%)	132 (58%)	94 (42%)	1(0,6%)
<i>P. aculeatum</i>	2	0 (%)	1 (50%)	1 (50%)	0(0%)
<i>P. purpureogenum</i>	2	0 (%)	0 (%)	2 (100%)	0(0%)
<i>P. thomii</i>	2	0 (%)	1 (50%)	1 (50%)	0(0%)
<b><i>Fusarium</i></b>	11	4 (37%)	3(28%)	3(28%)	1(9%)
<i>F. heterosporum</i>	1	0(%)	1(100%)	0(%)	0(0%)
<i>F. oxysporum</i>	3	2(66%)	0(%)	1(44%)	0(0%)
<i>F. solani</i>	7	2(28%)	2(28%)	2(28%)	1(14%)

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

Существенных различий по встречаемости высокоактивных и умеренно активных изолятов из 3-х групп природных зон (таежной, лесостепной/степной и субтропической/тропической) выявлено не было. Для сравнения таких обширных зон необходима очень большая выборка штаммов из сходных местообитаний.

Высокоактивные штаммы были обнаружены нами среди изолятов из верхних гумусовых горизонтов почв зональных типов, торфяных горизонтов почв и болот и разлагающихся растительных субстратов (табл. 3). Их число составляло 3 и 6% от общего количества изолятов из этих экотопов. Наиболее часто высоко и умеренно активные культуры, выделялись из растительных остатков, торфа и буровой муки (древесина, переработанная личинками короедов) (табл. 3).

Таблица 3 - Антимикотическая активность у штаммов микроскопических грибов, выделенных из разных экотопов

Экотоп	Общее число штаммов	Из них, число и (%) штаммов			
		Неактивные *	Слабо активные	Умеренно активные	Высоко активные
Почвы зональных типов (верхние гумусовые горизонты)	569	0(0%)**	346 (60%)	209 (37%)	14(3%)
Разрушающиеся растительные субстраты, буровая мука, торфяные горизонты почв и верховых болот, мхи	147	0(0%)	73(50%)	65(43%)	9(6%)
Экстремальные местообитания (солончаки и щелочные грунты и почвы, поверхность горных пород)	218	6(3%)	129(59%)	80(37%)	4 (2%)

1

2 Из местообитаний, которые характеризуются экстремальными условиями  
3 (высоким содержанием солей, рН, инсоляции, низкими температурами, большими  
4 перепадами температур) высокоактивные изоляты к тест-объекту *A. niger* 2К  
5 обнаруживали реже. Встречаемость же изолятов со слабой и умеренной  
6 антимикотической активностью к *A. niger* 2К в них сходна с таковой в почвах  
7 зонального ряда (табл. 3).

8 Итак, для поиска высоко активных продуцентов антимикотиков  
9 перспективными являются экониши, богатые органическим веществом (растительные  
10 остатки и верхние гумусовые горизонты, торфяные почвы, буровая мука,  
11 переработанная короедами древесина). Они характеризуются высоким видовым  
12 разнообразием грибов и в них чаще возникают ситуации, благоприятные для их  
13 развития. Это, по-видимому, обуславливает возникновение тесных взаимодействий и  
14 конкуренции между обитателями данных экотопов, одним из механизмов которой  
15 является продукция антибиотических веществ. Культуры с высоким антимикотическим  
16 действием в образцах из экстремальных местообитаний при использовании в качестве  
17 тест-организма микроцета *A. niger* 2К составляли 2 % от всех исследованных  
18 изолятов (218 штаммов). И это вполне согласуется с общим экологическим  
19 представлением, что для обитателей экониш, экстремальных по физико-химическим  
20 условиям, которые не обильно заселены, способность к синтезу антибиотиков не так  
21 значима. Их усилия направлены на адаптацию к высокой солености, уровню  
22 облучения, температуре, крайним значениям рН и другим параметрам среды. Вместе с  
23 тем, в популяциях грибов экстремальных местообитаний можно ожидать присутствие

1 культур активных в отношении организмов, которые способны к существованию в этих  
2 условиях или созданию для проявления ими антибиотической активности иных  
3 условий. Подтверждение или опровержение этого предположения требует дальнейших  
4 исследований.

5 Перспективными для поиска штаммов, проявляющих высокую и умеренную  
6 антигрибную активность, оказались гидроморфные торфяные почвы и верховые  
7 торфяники. Продукция антибиотиков, по-видимому, эффективный прием в  
8 конкуренции среди грибов в этих экотопах, так как условия здесь часто  
9 характеризуются высоким содержанием воды и внеклеточные водорастворимые  
10 метаболиты могут успешно распространяться в зоне роста мицелия.

11 Еще одним экотопом, из которого часто выделяли изоляты с хорошей  
12 антигрибной активностью были местообитания, связанные с наземными  
13 беспозвоночными, в частности буровая мука и ходы, образуемые в древесине  
14 личинками короедов. В этих богатых доступными органическими веществами экотопах  
15 с достаточно продолжительными периодами оптимальной влажности для развития  
16 грибов и бактерий возникают очаги с очень большой численностью не только бактерий,  
17 но и мицелиальных и дрожжевых грибов (Максимова и др., 2016 или книга Чернова).  
18 Поэтому в них реальны серьезные конкурентные взаимодействия между грибами, в  
19 которых важную роль, видимо, играет и синтез антимикотиков.

20 *Коллекция штаммов микромицетов для отбора продуцентов антимикотиков*

21 На основе оценки антигрибной активности у микромицетов разных таксонов была  
22 создана коллекция из 35 штаммов, двадцать из которых относятся к роду *Trichoderma*,  
23 по одному штамму к родам *Fusarium* и *Penicillium*, пять - к роду *Emericellopsis*, два - к  
24 роду *Acremonium*.

25 *Характеристика спектра антибиотической активности и утилизации соединений*  
26 *у отобранных штаммов рода Trichoderma.*

27 Из этой коллекции для дальнейшего исследования были взяты штаммы рода  
28 *Trichoderma*, так как они не только обладали высокой антимикотической активностью  
29 согласно методу блоков с тест-культурой *A. niger*, но отобраны из представительной  
30 выборки штаммов из разных видов этого таксона. Антимикотическую активность в  
31 жидкой среде Сабуро проявили этилацетатные и бутанольные экстракты  
32 культуральной жидкости 9 из 20 штаммов, большинство из которых выделены из  
33 верхних горизонтов почв лесостепной и степной зоны. Это были *Trichoderma*  
34 *asperellum* (30 и Mg-6), *T. gamsii* (282 и 314), *T. citrinoviride* (F-1228), *T. harzianum* (M-  
35 99/5), *T. viride* (346), *T. konigii* (TSL-06). Для остальных штаммов, по-видимому, жидкая

1 среда Сабуро не обеспечивала условий для синтеза антибиотиков. Однако нельзя  
 2 исключать, что эти штаммы при подборе иных условий культивирования, добавления  
 3 предшественников, витаминов, активаторов антибиотикообразования могут проявить  
 4 хорошую активность.

5 Таблица 4 – Антимикотическая активность этилацетатных экстрактов  
 6 культуральной жидкости при выращивании штаммов рода *Trichoderma* на среде Сабуро  
 7

Тест-культура	Диаметр подавления роста, мм								
	F-1228	Mg-6	M99/5 1	TCL-06	30	282	313	314	346
<i>A. fumigatus</i> 5К	19±0,1	12±0,1	13±0,3	6±0,2	6±0,3	13±0,1	8±0,3	11±0,1	19±0,1
<i>A. oryzae</i> 1К	14±0,2	8±0,1	17±0,2	8±0,2	9±0,1	6±0,2	11±0,2	8±0,2	17±0,2
<i>A. ustus</i> 6К	17±0,3	6±0,3	12±0,5	9±0,1	6±0,2	8±0,3	7±0,2	10±0,1	25±0,1
<i>A. terreus</i> 4К	16±0,1	6±0,1	14±0,2	7±0,2	7±0,1	8±0,1	6±0,1	12±0,2	11±0,1
<i>A. fisheri</i> 3К	17±0,2	11±0,2	14±0,3	10±0,2	6±0,2	7±0,2	8±0,2	13±0,1	12±0,2
<i>A. niger</i> ATCC 16404	22±0,1	12±0,2	16±0,1	12±0,3	8±0,1	9±0,1	12±0,3	14±0,2	11±0,1
<i>A. flavus</i> 7К	21±0,4	16±0,3	20±0,1	8±0,1	10±0,2	10±0,4	6±0,1	9±0,2	10±0,2
<i>A. nidulans</i> 8К	17±0,6	9±0,4	9±0,2	6±0,1	6±0,1	7±0,3	8±0,2	15±0,1	18±0,1
<i>P. chryzogenum</i>	17±0,6	10±0,2	0	0	15±0,1	0	9±0,1	11±0,1	14±0,2
<i>P. nalgioence</i>	21±0,2	6±0,1	0	0	0	0	12±0,2	12±0,2	13±0,2

8 Проверка антибиотической активности 9-ти отобранных штаммов на наиболее  
 9 часто используемых для изучения роста и синтеза вторичных метаболитов жидких  
 10 средах - синтетической (среда Чапека), и полусинтетических (Сабуро и 3%  
 11 неохмелённое сусло) показала, что максимальную фунгицидную активность они  
 12 проявляют на среде Сабуро (таблица 4).

13 Оценка интенсивности усвоения этими штаммами триходерм 95 органических  
 14 соединений показала, что они разделяются на 3 группы. Штаммы 30, ТУVI 4/11 (ВКПМ  
 15 F-1228), 313 и 346 обладают высокой суммарной интенсивностью потребления  
 16 субстратов и способны утилизировать большинство субстратов (83, 90 и 87 из 95  
 17 соединений, соответственно). Для штаммов 314 и Mg-6 характерна слабая  
 18 интенсивность потребления субстратов, но, при этом, они способны утилизировать

1 большинство субстратов (90 и 87 из 95 соединений, соответственно). Штаммы 282, 314  
 2 и TSL-06 показали низкую суммарную интенсивность потребления субстратов, а также  
 3 усваивали меньшее количество соединений в сравнении с первыми двумя группами  
 4 штаммов.

5 Выявлены различия в активности усвоения соединений разных классов между  
 6 штаммами. Все штаммы первой группы способны утилизировать углеводы  
 7 –целлобиозу, циклодекстрин, трегалозу, при этом для них характерна слабая  
 8 утилизация маннозы, декстрина, психозы, рамнозы, тагатозы, седогептулозы. Из  
 9 аминокислот хорошо усваивались – аспарагин, серин; плохо – фенилаланин, треонин,  
 10 орнитин. Кроме того, они обладали способностью утилизировать многие органические  
 11 кислоты и спирты. *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228 и *T. viride* 346 из этой группы  
 12 усваивали с более высокой интенсивностью широкий спектр соединений, включая  
 13 многие углеводы и аминокислоты, входящие в состав питательных сред, чем  
 14 большинство других штаммов.

15 На основании максимальной антибиотической активности и способности к  
 16 усвоению широкого спектра субстратов был отобран штамм *T. citrinoviride* ВКПМ F-  
 17 1228.

18 Для антибиотического комплекса *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228 была определена  
 19 минимальная ингибирующая концентрация в отношении условно-патогенных грибов и  
 20 бактерий (табл 5). МИК в отношении *A.niger* ATCC 16404, *F. oxysporum* VKM F-140  
 21 составляет 5 и 10 мкл/л, соответственно, что свидетельствует о высокой антигрибной  
 22 активности. Кроме того, *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228 в очень низкой концентрации  
 23 ( $3,7 \times 10^{-1}$ ) ингибирует рост *M.luteus* ATCC 9341, а также активен в отношении *S. aureus*  
 24 ATCC 21027.

25 Табл. 5. Минимальная подавляющая концентрация экстрактов *T. citrinoviride* ВКПМ F-  
 26 1228 в отношении тест-культур бактерий, дрожжевых и мицелиальных грибов

	МИК , мкг/мл							
	<i>S. aureus</i> ATCC 21027	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>M.luteus</i> ATCC 9341	<i>E.coli</i> ATC C 25922	<i>S.cerevisiae</i> INA S1	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>A.niger</i> ATCC 16404	<i>F. oxysporum</i> VKM F- 140
<i>T.citrino viride</i> TYVI 4/11	1,6	5	$3,7 \times 10^{-1}$	н/а	н/а	н/а	5	10

27

28 н/а - неактивен

1 В проводимых в настоящее время исследованиях с *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228  
2 показано, что его антибиотическая активность связана с образованием комплекса из 5-  
3 ти пептаиболов, один из которых трихозин, а 4 других могут быть не известными  
4 ранее соединениями (Садыкова и др., 2015).

5 Таким образом, для поиска высоко активных продуцентов антимикотиков  
6 перспективными являются экониши, богатые органическим веществом (растительные  
7 остатки и верхние гумусовые и торфяные горизонты). Штаммы с максимальной  
8 активностью и широким спектром утилизации субстратов были выделены из  
9 растительных субстратов и гумусовых горизонтов почв степной и лесостепной зон.  
10 Способность к продукции антимикотических соединений с высокой и умеренной  
11 активностью обнаружена у более трети проверенных штаммов микромицетов.  
12 Перспективным поиск продуцентов антигрибных соединений представляется вести  
13 среди грибов порядка Нуроскреales, в частности родов *Trichoderma*, *Emericellopsis*,  
14 *Acrostalagmus*, *Tolypocladium*, *Acremonium*, *Stachybotrys* и *Purpureocillium*. Наиболее  
15 часто способность к образованию соединений с антигрибной активностью проявляли  
16 представители рода *Trichoderma*. Из экстремальных местообитаний (засоленных и  
17 щелочных почв и грунтов) выделены штаммы родов *Emericellopsis*, *Acrostalagmus*,  
18 *Tolypocladium*, *Bipolaris*, *Verticillium* с хорошей антигрибной активностью, которые  
19 следует использовать в дальнейшей работе по поиску новых антимикотиков.

20

21 Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 14-50-00029 (выделение, идентификация видов грибов и  
22 определение их антибиотической активности), частично гранта РФФИ 16-44-240509 (определение МИК  
23 индивидуальных соединений) и в рамках Государственного задания, части 2 п.01 10 по теме № АААА-  
24 А16-116021660088-9 «Экофизиология, цитология и генетика грибов как основа рационального  
25 природопользования и биотехнологий».

## 26 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 27 1. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А., Рогожин Е.А., Громовых Т.И.,  
28 Куварина А.Е., Баранова А.А. Антимикробная активность штамма *T. citrinoviride*  
29 ТУVI 4/11– продуцента пептаиболов в условиях жидкофазного и твердофазного  
30 культивирования // Антибиотики и химиотерапия.2015. № 11-12. С.3-8
- 31 2. Schmitt E.K., Hoepfner D., Krastel P. Natural products as probes in pharmaceutical  
32 research // J. Ind. Microbiol Biotechnol.2015.V. 59. P. 880-889.
- 33 3. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М: Наука, 2004.528 с.

- 1 4. *Abid A. Ahmad B., Bacha N.* Fungi as chemical industries and genetic engineering for  
2 the production of biologically active secondary metabolites // *Asian Pac. J. Trop.*  
3 *Biomed.*2014.V. 4.№ 11.P. 859-870.
- 4 5. *Berdy J.* Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are  
5 heading // *J. Antibiotics.*2012.V. 65. P 385-395.
- 6 6. *Alanis A.J.* Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? // *Arch. Med.*  
7 *Res.* 2005. T. 36. № 6. P. 697-705.
- 8 7. *Daniel F. de S. J. Filho E.R.* Peptaibols from *Trichoderma* // *Nat. Prod. Rep.*2007. V.  
9 24. P. 1128-1141.
- 10 8. *Mendoza-Figueroa J. S., Mendez-Lozano J., Soriano-Garcia M.* Peptides and  
11 Peptidomics: A Tool with Potential in Control of Plant Viral Diseases // *Advances in*  
12 *Microbiology.* 2014. V. 4. № 9. P. 539-548.
- 13 9. *Kawaguchi M., Masuma R., Nonaka K.* New method for isolating antibiotic-producing  
14 fungi // *J. of Antibiotics.* 2013.V. 66.P. 17-21.
- 15 10. *Neuhof T., Dieckmann R., Druzhinina I.* Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry  
16 analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma*. *Hypocrea: can molecular*  
17 *phylogeny of species predict peptaibol structures?* // *Microbiology.* 2007.V. 153. P.  
18 3417–3437.
- 19 11. *Stoppacher N., Neumann N.K.N., Burgstaller L.* The comprehensive peptaibiotics  
20 database // *Chem. Biodiv.*2013. V. 10. №5. P. 734-743.
- 21 12. *Druzhinina, Schmoll M., Seiboth B., Kubicek C.P.* Global carbon utilization profiles of  
22 wild type, mutant and transformant strains of *Hypocrea jecorina* // *Appl Environ.*  
23 *Microbiol.*2006.V. 72. P. 2126–2133
- 24 13. *Tanzer M., H. N. Arst, A. R. Skalchunes, M. Coffin, B. A. Darveaux, R. W. Heiniger, J.*  
25 *R. Shuster* Global nutritional profiling for mutant and chemical mode-of-action  
26 analysis in filamentous fungi // *Funct Integr Genomics.*2003.V. 3. P. 160–170
- 27 14. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Товарищество Научных  
28 изданий КМК. 2004, 239 С.
- 29
- 30 Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW (2002). "On the safety of  
31 *Aspergillus niger*—a review". *Appl. Microbiol.Biotechnol* 2002, V. 59 Iss,4: P.426–  
32 35. [doi:10.1007/s00253-002-1032-6](https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6). [PMID 12172605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12172605/)..
- 33 **Лугаускас А.Ю., Микульскене А.И., Шляужене Д.Ю.** Каталог микромицетов -  
34 биодеструкторов полимерных материалов. М.: Наука, 1987. . – 340 с.

- 1 Domsh K.H., Gams W., Anderson T.–H. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag.
- 2 1993. V. 1. 859 P.
- 3