

УДК 579.26

TRENDS AND PROSPECTS FOR DEVELOPING OF NEW INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGIES ON THE BASE OF ANTARCTIC EXTREMOPHILIC MICROORGANISMS

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ АНТАРКТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ПРОМЫШЛЕННЫХ BIOTECHNOLOGIЙ

Oleksandr Tashyrev¹, Victoria Romanovskaya¹, Tetyana Beregova², Nadiia Matvieieva¹, Pavlo Rokitko¹, Ganna Tashyreva³, Tetyana Falalyeyeva²
А.Б. Таширев¹, В.А. Романовская¹, Т.В. Береговая², Н.А. Матвеева¹, П.В. Рокитко¹, А.А. Таширева³, Т.В. Фалалеева²

¹Department of Biology of Extremophilic Microorganisms, Institute of Microbiology and Virology of the Nat. Acad. Sci. of Ukraine. Mail: 154 Zabolotny str., Kyiv, D 03680, Ukraine

²Faculty of Biology, Taras Shevchenko Kyiv National University. Mail: 2 (building 12) Glushkov avenue, Kyiv, Ukraine

³Department of Biology, National Antarctic Scientific Center of Ukraine of the Ministry of Education and Science of Ukraine. Mail: 16 Tarasa Shevchenka Blvd, Kyiv, 01601, Ukraine

¹Отдел биологии экстремофильных микроорганизмов, Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины. Д 03680, Киев, ул. Заболотного, 154.

²Биологический факультет, Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, проспект академика Глушкова, 2, корпус 12, Киев, Украина

³Национальный антарктический научный центр Украины Министерства образования и науки Украины

Corresponding Author: Oleksandr Tashyrev, e-mail: tach2007@ukr.net

Автор для корреспонденции: tach2007@ukr.net

Резюме. Цель работы – изучение антарктических экстремофильных микроорганизмов, а также оценка перспектив их использования для создания новых природоохранных биотехнологий и медицинских препаратов, селекции продуцентов биологически активных веществ. Системное изучение структуры и функций микробных ценозов в Антарктике показало, что их адаптация проявляется в виде гомеостаза, т.е. сохранении жизнеспособности и способности к росту в широком диапазоне концентраций экстремальных факторов. Создана коллекция микроорганизмов, устойчивых к этим факторам. Коллекция включает микроорганизмы, синтезирующие

Abstract. The aim of this study is researching Antarctic extremophilic microorganisms, estimation of trends and prospects for developing new environment protection biotechnologies, using them as producers of biologically active substances and medications. Complex structure and function researches have shown that microbial communities of Antarctic Region possess a high adaptation degree which is possible to consider as a homeostasis, i.e. preservation of viability and ability to grow in a wide range of concentration of extreme factors, down to bactericidal. The collection of the Antarctic microorganisms, resistant to extreme factors is developed. The collection includes

криопротекторы, микроорганизмы, устойчивые к высоким дозам УФ радиации (500–1500 Дж/м²), широкому спектру антибиотиков и токсичным металлам (Hg²⁺, Cu²⁺, Cr(VI), Co²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺) в диапазоне 5x10²–6x10⁴ мг-ионов/л); изоляты, которые продуцируют биологически активные вещества (меланины, каротины, антибиотики и др.).

Выделенные нами экстремофильные микроорганизмы перспективны для создания новых биотехнологий. Технологии, основанные на микробной мобилизации нерастворимых форм металлов, эффективны для повышения их извлечения в горнодобывающей промышленности, биоремедиационных технологиях. Имобилизация – для биоремедиации водоемов и очистки сточных вод от широкого спектра металлов. Антарктические микроорганизмы могут использоваться для получения новых антибиотиков, а устойчивые к ним штаммы – для тестирования эффективности действия антимикробных препаратов. Метилотрофы являются перспективными продуцентами криопротекторов, а пигментированные микроорганизмы – биологически-активных веществ (меланины, каротины). Уникальная культура дрожжей *Exophiala nigra* (продуцент меланина) может одновременно использоваться для очистки сточных вод от металлов (например, Ni²⁺ и Co²⁺), получения УФ-защитных препаратов, создания лекарственных средств с профилактическими и лечебными свойствами по отношению к язвенно-эрозивным поражениям желудка и предраковым его состояниям.

Ключевые слова. Экстремофильные микроорганизмы, Антарктика, биотехнология, меланин, медицинские препараты

Введение

Жизнь неистребима и вездесуща. Об этом свидетельствуют сотни публикаций об экстремофильных микроорганизмах. Поэтому мы не будем ссылаться на эти

cryoprotector-producing bacteria, microorganisms resistant to high UV radiation level (up to 500-1500 J/m²), isolates resistant to a wide spectrum of the most toxic metals (Hg²⁺, Cu²⁺, Cr(VI), Co²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺) in concentrations of 5x10²-6x10⁴ mg/l, isolates that are producers of biologically active substances (melanins, carotins, antibiotics etc).

Isolated extremophilic microorganisms are perspective for a wide spectrum of new biotechnologies designing. Biotechnologies based on microbial mobilisation of insoluble metal compounds are effective for increase of their extraction in the mining industry, and in bioremediation. Immobilization abilities can be applied in metal-containing sewage treatment. Antarctic microorganisms can be used for new antibiotics production, antibiotic-resistant strains as test-cultures for studying efficiency of new antimicrobial preparations. Methylophilic bacteria are perspective cryoprotector producers, pigmented microorganisms - as biologically-active substances producers (melanins, carotins). The unique yeast isolate *Exophiala nigra* (a melanin producer) can simultaneously be used for sewage treatment (for example, Ni²⁺ and Co²⁺), UV-protective preparations, creation of medicines with preventive and curative properties in relation to ulcer-erosive lesions of the stomach and precancerous states of its.

Key words: extremophilic microorganisms, Antarctic Region, biotechnology, melanin, medications

Introduction

Life is ineradicable and ubiquitous. Hundreds of articles devoted to extremophilic microorganisms testify to this. Therefore we

работы, хорошо известные специалистам. Приведем лишь два примера, подтверждающие способность микроорганизмов существовать в условиях «несовместимых с жизнью». Эти работы доказывают использование микромицетами радиоактивного графита в качестве источника углерода и энергии, а также эффект «положительного радиотаксиса» [5, 26]. В данной статье мы рассмотрели теоретические предпосылки и закономерности формирования экстремофильных антарктических микробных ценозов. В качестве источников для выделения промышленно перспективных микроорганизмов нами использованы образцы внутреннего шельфового островного архипелага, а также прилегающего побережья Антарктического полуострова. Основным объектом исследований служил антарктический термостатированный оазис, расположенный вблизи Украинской антарктической станции Академик Вернадский (Аргентинский архипелаг, о. Галиндез, бывшая британская станция Майкл Фарадей) [21, 24]. Используя GPS-методы проведена топографическая съемка оазиса на о. Галиндез, и с использованием GIS-технологий создана стереометрическая 3D-модель полигона с сетью стационарных пунктов постоянного мониторинга (более 200 точек) [24]). Оазис представляет собой скалистый мыс с крутыми склонами, на вершине мыса находится реликтовый ледник. Особенностью оазиса является максимальное биоразнообразие наземных биотопов (экосистем): ледовые и наскальные водорослево-бактериальные маты, почва, озера, лишайники, мхи, высшие растения (*Deschampsia antarctica*, *Colobanthus quitensis*), беспозвоночные животные, а также орнитофауна. Цель работы – выделить и изучить антарктические экстремофильные микроорганизмы, оценить перспективы их использования для создания новых природоохранных биотехнологий и селекции продуцентов биологически активных веществ (меланинов, каротинов, антибиотиков), а также лечебных препаратов.

shall not refer to papers, well-known to experts. We shall only result two examples confirming microbial ability to exist in conditions, «incompatible with a life». The evidence of mentioned above is the existence of fungi which use radioactive graphite as a source of carbon and energy, and also the «positive radiotaxis» effect [5, 26]. This study is referring to theoretical preconditions and laws of Antarctic extremophilic microbial communities' formation. Environments of Antarctic oases, situated in the area of Argentine archipelago internal shelf and adjoining coast of Antarctic Peninsula, are the sources for industrial promising microorganisms' isolation. The basic research object is the biogeographical polygon of Antarctic oasis located near Ukrainian Antarctic station Academic Vernadsky (the Argentina archipelago, Galindez island, former Michael Faraday station, UK) [21, 24]. By means of GPS-methods topographical survey of an oasis and polygon is carried out. Using GIS-technologies the stereometric 3D-model of polygon with a system of fixed permanent monitoring points (more than 200) [24]) is designed. The oasis is a rocky cape with abrupt slopes, at top of cape there is a relic glacier. Outstanding feature of an oasis is the high number of terrestrial environments (rocks, ice, snow, lakes, primitive soils, etc.) where maximal biodiversity is represented: ice and rock biofilms, lichens, mosses, vascular plants (*Deschampsia antarctica*, *Colobanthus quitensis*), invertebrates, and avifauna. The aim of this study is isolating and researching Antarctic extremophilic microorganisms, future trends and prospects for developing on their base new environment protection biotechnologies, using them as sources of biologically active substances (melanins, carotins antibiotics), and material for medications.

Материалы и методы

Выделение антарктических микроорганизмов. Образцы для микробиологических исследований отбирали в Западной Антарктике на островах Galindez (где расположен биогео-графический полигон), Barchans, Irizar, Uruguay, Jalour, Petermann, Berthelot, Cruls, King-Georg и др., а также на побережье Антарктического полуострова (мыс Rasmussen и мыс Tuxen). Исследовали следующие биотопы: почва, трава, мхи, лишайники и озерные илы. Образцы хранили при +5°C и/или при –20°C. Подготовку образцов для посева проводили стандартными методами. При этом использовали два подхода: (1) выделение экстремофильных микроорганизмов (например, посев на среды, содержащие токсичные металлы); (2) выделение доминирующих форм при отсутствии экстремальных факторов.

Количество микроорганизмов в образцах определяли посевом последовательных десяти-кратных разведений образцов на питательные среды [13]: гетеротрофные микроорганизмы – на «Nutrient Agar» (фирма HiMedia Laboratories Pvt. Ltd) и агаризованное сусло. Различные эколого-физиологические группы микроорганизмов выделяли на селективных средах [6], метилотрофные бактерии – на минеральной среде с метанолом (0.5%) [18].

Идентификацию бактерий проводили на основании изучения их морфолого-физиологических свойств [6], а также используя сиквенс-анализ генов 16S рРНК. Методами, описанными в [18], из биомассы антарктических бактерий выделяли ДНК. С использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) получали амплифицированные гены 16S рРНК и их секвенировали. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК антарктических микроорганизмов с таковыми различных видов проводили, используя базу данных GenBank.

Устойчивость к металлам. Антарктические микроорганизмы высевали на среды, содержащие наиболее токсичные металлы

Materials and methods

Isolation of Antarctic microorganisms.

Samples for microbiological researches were selected in the Western Antarctic Region on islands Galindez (on the biogeographical polygon), Barchans, Irizar, Uruguay, Jalour, Petermann, Berthelot, Cruls, King-George, etc., and at coast of Antarctic peninsula (cape Rasmussen and cape Tuxen). The following environments (biotopes) are studied: soil, grass, mosses, lichens and lake sludge. Samples were stored at +5°C and/or at –20°C. Preparation of samples for microbiological investigations was carried out by standard methods. During researches we used two approaches: (1) extremophilic microorganisms' isolation (for example, inoculation on toxic metal-containing media); (2) isolation of dominating morphological species of microorganisms without extreme influence.

Microbiological counts in samples were carried out by inoculation of consecutive tenfold sample dilutions nutrient media [13]: heterotrophic isolates – on «Nutrient Agar» (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd) and wort agar medium. Ecological and physiological groups of microorganisms isolated on selective media [6], methylotrophic bacteria – on methanol-containing (0.5 %) mineral agar medium [18].

Bacteria identification was carried out by studying morphological and physiological properties using standard methods [6], and also 16S rRNA gene sequence. With the methods described in [18], we extracted DNA from a biomass of Antarctic bacteria. Using polymerase chain reaction (PCR) amplified 16S rRNA genes were sequenced. The comparative analysis of nucleotide sequence of 16S rRNA genes of Antarctic microorganisms with those of various species was studied using GenBank database.

Resistance to metals. Antarctic microorganisms were inoculated on toxic

(Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и CrO_4^{2-}) в диапазоне: от 0 (контроль) до 3000 мг-ионов/л. В отдельных экспериментах использовали более высокие концентрации металлов (более 1.0 моль/л, например 60000 мг/л Cr(VI)). Микроорганизмы культивировали 5–20 суток при 15–20°C [20]. Концентрацию металлов в образцах определяли стандартными фотоколориметрическими методами, а также методом атомно-адсорбционной спектроскопии.

Выделение микробных пигментов из клеточной биомассы угольно-чёрных дрожжей проводили методом щелочной экстракции [1], их свойства определяли, как приведено в [19]. Каротиноиды в микробной биомассе определяли хроматографическим и спектрофотометрическим методом. УФ облучение антарктических микроорганизмов проводили по методике, описанной в [16].

Цитопротекторное действие меланина изучали в условиях острого и хронического стресса. Острые нейро-дистрофические поражения в слизистой оболочке желудка крыс вызывали методом нервно-мышечного напряжения по Селье. Хронические нейро-дистрофические поражения в слизистой оболочке желудка крыс вызывали методом 24-часового иммобилизационного стресса. Содержание основных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) - диеновых конъюгатов определяли в гомогенате слизистой оболочки желудка крыс спектрофотометрическим методом, ТБК-активных продуктов по реакции с тиобарбитуровой кислотой и Шифовых оснований – флюорометрическим методом. Желудочную секрецию исследовали методом перфузии изолированного желудка по [7]. Парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм изготавливали на роторном микротоме, красили гематоксилином и эозином. Гистологические препараты анализировали при увеличении микроскопа x100 и x400. Содержание оксида азота в крови оценивали путем определения концентрации конечных метаболитов NO (нитрит аниона (NO_2^-)) с помощью реактива Грисса [8]. Экспрессию белка эндотелиальной синтазы оксида азота

metal containing media (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и CrO_4^{2-}) in a concentration range 0 (control) – 3000 ppm and incubated during 5–20 days at 15–20°C. In separate experiments the higher metal concentration were used (more than 1.0 M/l, for example 60000 ppm Cr (VI)) [20]. Metal concentration in samples was determined by standard colorimetric and atomic-adsorption spectroscopy methods.

Microbial pigment was extracted from coal-black yeast cellular biomass by alkaline method [1], pigment properties investigation described in [19]. For carotenoids characterization we used chromatographic and spectrophotometric methods. UV-radiation influence on Antarctic microorganisms was studied by a technique described in [16].

In the study of cytoprotective action of melanin in conditions of acute and chronic stress we used the following methods. Acute neuro-degenerative lesions in the gastric mucosa of rats caused by neuro-muscular tension by Selye. Chronic neuro-degenerative lesions in the gastric mucosa of rats caused by 24-hour immobilization stress. Contents of the main products of lipid peroxidation (LPO) – diene conjugates were measured in homogenate of gastric mucosa of rats by spectrophotometric method, TBA-active products by the reaction with tiobarbital acid and Schiff's bases – by fluorometric method. The activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase in the homogenate of gastric mucosa were determined. Gastric secretion was studied by perfusion of isolated stomach by [7]. Paraffin sections of thickness 5.7 mm were made on a rotary microtome, dyed with hematoxylin and eosin. Histological preparations were analyzed at magnification x100 and x400. Contents of nitric oxide in the blood was evaluated by determining the concentration of the final metabolites of NO (nitrite anion (NO_2^-)) with the Griss reagent [8].

(eNOS) в слизистой оболочке желудка крыс определяли методом иммуноблоттинга. Для блокирования PPAR γ мы использовали необратимый селективный антагонист PPAR γ GW9662 (2-хлоро-5-нитро-N-фенилбензамиды) («Sigma», США, номер по каталогу M6191). Концентрацию кортизола в крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа в сыворотке крови животных, применяя наборы реактивов «стероид ИФА-кортизол-01».

Результаты и обсуждение

Характеристика антарктических микроорганизмов. В результате микробиологического анализа 200 образцов наземных биотопов Антарктики выделено 90 штаммов аэробных хемоорганотрофных микроорганизмов. Для определения таксономического положения исследованы их свойства. На основании изучения морфолого-культуральных свойств 20 штаммов показано, что их можно отнести к родам *Bacillus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*. В результате сиквенс-анализа генов 16S рРНК 25 штаммов идентифицированы как *Brevibacterium*, *Methylobacterium*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, до видов (*Brevibacterium antarcticum*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterobacter hormachei*, *Pseudomonas putida*, *Ps. fluorescens*, *Methylobacterium extorquens*). Т.о., в антарктических образцах обнаружены представители нескольких филогенетических линий прокариот: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*. Изолированы также дрожжи, в частности 5 штаммов *Exophiala nigra* (филогенетическая линия эукариот). Подобные результаты были получены другими исследователями [14, 15 и др.]

Выявленное биоразнообразие микроорганизмов в суровых условиях Антарктики может быть обусловлено наличием у них множественных механизмов устойчивости к комплексу экстремальных факторов. Такими абиогенными факторами являются суточные перепады температуры (от +10°C до -20°C)

Protein expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the gastric mucosa of rats was determined by immunoblotting. To block PPAR γ , we used the selective irreversible antagonist of PPAR γ GW9662 (2-chloro-5-nitro-N-phenyl-benzamide) ("Sigma", USA, catalog number M6191). The concentration of cortisol in the blood was determined by solid-phase enzyme immunoassay in the serum of animals, using a set of reagents, "ELISA steroid-cortisol-01".

Results and discussion

Characteristic of Antarctic microorganisms. Microbiological analysis of the 200 terrestrial samples of Antarctic Region resulted in 90 strains of aerobic chemoorganotrophic microorganisms isolation, which specific features were studied for taxa identification. On the basis of morphological and physiological properties it is shown, that 20 of Antarctic strains related to *Bacillus*, *Actinomyces*, *Streptomyces* genera. By the means of 16S rRNA gene sequence analysis 25 strains were identified as *Brevibacterium*, *Methylobacterium*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, up to species (*Brevibacterium antarcticum*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterobacter hormachei*, *Pseudomonas putida*, *Ps. fluorescens*, *Methylobacterium extorquens*). Thus, in the Antarctic samples representatives of *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* (prokaryotic phylum) are found out. Various yeast species, in particular 5 strains *Exophiala nigra* (eukaryotic phylum) are also isolated. Similar results were reported in recent researches on Antarctic terrestrial microorganisms [14, 15 etc.].

The revealed microbial biodiversity in severe conditions of Antarctic Region can be explained by presence mechanisms of polyresistance to a complex extreme factors. To such abiogenous environmental factors belong daily temperature fluctuations (from +10°C to -20°C) during polar summer, constant

во время полярного лета, фазовые переходы «замораживание-оттаивание», УФ радиация, особенно активная за счет наличия антарктической «озоновой дыры», высокие концентрации токсичных металлов, мобилизованные из вулканогенных скальных пород. Например, в некоторых образцах концентрация меди достигает 426–558 мг/кг почвы [21]. К биогенным экстремальным факторам следует отнести неравномерное распределение органических соединений, что приводит к жесткой конкуренции за источники углерода для микроорганизмов. Указанный комплекс экстремальных факторов, видимо, влияет на формирование микробных ценозов антарктических оазисов. Поэтому системное исследование их структуры и функций необходимо для изучения закономерностей формирования экстремофильных микробных ценозов и выделения микроорганизмов, перспективных для промышленных биотехнологий.

Комплексная адаптация микробных ценозов к экстремальным условиям проявляется как «гомеостаз». В контексте этой статьи «гомеостаз» мы определяем как способность микробных ценозов адаптироваться и сохранять стабильное функционирование при воздействии комплекса экстремальных факторов. В качестве главных факторов, значимых при формировании микробных ценозов, нами выбраны низкие температуры, УФ радиация, наиболее токсичные металлы и антибиотики. Системное изучение гомеостаза микробных ценозов мы осуществляли в четыре этапа: (1) количественный учет микро-организмов в наземных биотопах (экосистемах) Антарктики, (2) выделение микроорганизмов, устойчивых к максимальным дозам экстремальных факторов и создание коллекции экстремофильных микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ, (3) комплексное изучение свойств микроорганизмов, перспективных для промышленных биотехнологий, (4) био-

ice nucleation/melting cycles, UV radiation, especially strong due to presence of Antarctic "ozone hole", high concentration of toxic metals mobilized from igneous rock. For example, copper concentration in some samples is up to 426-558 mg/kg [21]. Non-uniform distribution of biogenic factors on Antarctic islands such as organic compounds concentration can be related to extreme factors resulting in strong competition for a substratum (sources of carbon and energy for microorganisms). The specified complex of extreme factors probably influences microbial communities' formation in Antarctic oases. Therefore complex research of their structure and functions is a necessary for studying laws of formation extremophilic microbial communities, and isolation of microorganisms, perspective for industrial biotechnologies.

Complex adaptation of microbial communities to extreme environmental conditions is considered as the "homeostasis" phenomenon. In a context of this study we determine "homeostasis" as the ability to adapt and keep stable functioning under the influence of an extreme factor complex. We consider low temperatures, UV radiation, the most toxic metals and antibiotics to be primary factors that are significant during microbial communities' formation. Study of microbial communities' homeostasis was carried in four stages: (1) microbiological counts in terrestrial environments of Antarctic Region, (2) isolation of strains resistant to maximal extreme factor doses and development of a collection of extremophilic microorganism that are producers of biologically active substances, (3) complex studying of their properties, perspective for industrial biotechnologies, 4) biotechnological testing of extremophilic microorganisms.

технологическое тестирование экстремофильных микроорганизмов.

Один из этапов такого анализа – это качественный и количественный учет микроорганизмов. Показано, что в состав микробных ценозов (например, на о. Галиндез) входят основные физиологические и функциональные группы микроорганизмов, осуществляющие функционирование замкнутых циклов углерода и азота. Количество хемоорганотрофных микроорганизмов в почве было высоким, и находилось в пределах 10^4 – 10^9 клеток/г образца. Обнаружены как аэробные, так и анаэробные копитрофные, олиготрофные и олигокарбофильные микроорганизмы (2×10^4 – 8×10^7 клеток/г образца) [9]. Несмотря на то, что о. Галиндез является «низкотемпературным» объектом, кроме психрофильных микроорганизмов ($+5^\circ\text{C}$, 10^3 – 10^7 клеток/г почвы), обнаружены мезофильные ($+25^\circ\text{C}$, 6×10^3 – 5×10^7 клеток/г почвы) и термотолерантные ($+45^\circ\text{C}$, 10^4 – 10^6 клеток/г почвы) микроорганизмы. Наличие мезофильных и термофильных микроорганизмов в антарктических почвах можно объяснить как трансконтинентальным переносом микробных аэрозолей атмосферными потоками, так и интродукцией микроорганизмов из птичьего помета (например, поморников и чаек) в почву.

Следовательно, антарктические наземные экосистемы характеризуются высоким уровнем эколого-трофического, физиологического и таксономического биоразнообразия, а также высокой численностью микроорганизмов.

Антарктические металлрезистентные микроорганизмы. Рассмотрим такой системный подход на примере экстремофильных металлрезистентных микроорганизмов. Известно, что для большинства хемоорганотрофных микроорганизмов бактерицидные концентрации токсичных металлов (Hg^{2+} , Cu^{2+} и др.) находятся в пределах 5–10 мг-ионов/л [4, 11]. Так как Антарктика – это экологически чистая зона

One of stages of such analysis is a qualitative and quantitative count of microorganisms. It is shown, that microbial communities of Antarctic oases (for example, island Galindez) include the basic physiological and functional groups of the microorganisms which provide complete carbon and nitrogen cycles. The number of chemoorganotrophic microorganisms in soils was high within the limits of 10^4 – 10^9 cells/g of soil, where aerobic and anaerobic oligotrophic microorganisms (2×10^4 – 8×10^7 cells/g of soil) are found out [9]. In spite of the fact that island Galindez is a "low-temperature" object, besides except psychrophilic microorganisms ($+5^\circ\text{C}$, 10^3 – 10^7 cells/g of soil), mesophilic ($+25^\circ\text{C}$, 6×10^3 – 5×10^7 cells/g of soil) and thermotolerant ($+45^\circ\text{C}$, 10^4 – 10^6 cells/g of soil) microorganisms were found. It is possible to explain presence of mesophiles and thermophiles in Antarctic soils as transcontinental transfer of microbial aerosols by atmospheric streams, and inclusion of microorganisms from bird's excrements (for example, skua and gulls) into soil communities.

Hence, Antarctic terrestrial ecosystems are characterized by a high level of functional, physiological and taxonomic biodiversity, and also a high number of microorganisms.

Antarctic microorganisms resistant to metals. We shall consider such system approach on the example of extremophilic metal resistant microorganisms. It is known that for the majority the chemoorganotrophic microorganisms bactericidal concentrations of toxic metals (Hg^{2+} , Cu^{2+} etc.) are within the limits of 5–10 ppm [4, 11]. As the Antarctic Region is a non-polluted zone on the Earth, despite of the high content of toxic metals in

Земли, то, несмотря на высокое содержание токсичных металлов в скальных и осадочных породах, трудно было предположить, что антарктические микроорганизмы проявят сверхустойчивость к металлам. Однако ранее при помощи термодинамических расчетов мы доказали, а впоследствии подтвердили экспериментально, что рост некоторых хемоорганотрофных микроорганизмов возможен при высоких (вплоть до 1М) концентрациях токсичных металлов [22, 23]. Исходя из этого, мы использовали в эксперименте широкий концентрационный диапазон металлов. Принципиально новым при выделении металлрезистентных микроорганизмов является очень высокий предел концентраций металлов (3000–60000 мг /л).

Полученные результаты свидетельствовали о высокой устойчивости антарктических почвенных микроорганизмов к токсичному катиону Cu^{2+} . Так, если в контроле количество микроорганизмов составляло $n \times 10^8$ клеток/г образца, то при 200–800 мг/л Cu^{2+} – $n \times 10^8$ – $n \times 10^7$, а при 1000 мг/л Cu^{2+} – $n \times 10^6$ клеток/г образца. Таким образом, количество клеток микроорганизмов, выросших без предварительной адаптации к «сверхбактерицидной» концентрации меди (1000 мг/л Cu^{2+}), составило миллионы на 1 г почвы. Из них было изолировано 10 медьрезистентных штаммов, которые депонированы в Украинской Коллекции Микроорганизмов (УКМ, №№ штаммов 3201–3210) и использованы в качестве тест-культур. Как будет показано ниже, эти микроорганизмы устойчивы не только к Cu^{2+} , но и к сверхвысоким концентрациям растворимых соединений ртути, кобальта, кадмия, никеля и хрома(VI). Иными словами, нами обнаружено явление полирезистентности антарктических микроорганизмов к широкому спектру токсичных металлов.

Как правило, проверка множественной резистентности сводится к изучению роста на среде, содержащей только один металл. При этом отсутствует информация об

rocks and sediments, it was difficult to assume that the Antarctic microorganisms will show high metalresistant level. In previous studies using thermodynamic calculations we have proved, that growth of some chemoorganotrophic microorganisms is possible at high (up to 1M) concentration of toxic metals, what have been confirmed experimentally [22, 23]. Proceeding this, we used a wide concentration range of metals in experiment. Using very high metal concentrations (3000-60000 mg/l) during isolation of metal-resistant microorganisms is essentially new.

Results testified to high resistance of Antarctic soil microorganisms to toxic Cu^{2+} . In the control (without copper) number of microorganisms was 10^8 cells/g, while at 200-800 ppm Cu^{2+} – 10^7 - 10^8 , and at 1000 ppm – 10^6 cells/g of a sample. Thus, the number of microorganisms able to grow without preliminary adaptation to super bactericidal copper concentration (1000 ppm Cu^{2+}), reached millions in 1 g of soil. Among isolated copper resistant strains 10 are deposited in the Ukrainian Collection of Microorganisms (UCM) at numbers 3201-3210 and are used as test-cultures. As it will be shown below, these microorganisms are resistant not only to Cu^{2+} , but also to super high concentration of mercury, cobalt, cadmium, nickel and chromium(VI) soluble compounds. Other Antarctic microorganisms are characterized by polyresistance to a wide spectrum of toxic metals.

As a rule during multiple metal resistance, study isolates are tested on media containing only one metal. Thus there is no information on integrated action of several metals on

интегральном действии нескольких металлов на микроорганизмы. Однако в природных условиях и в техногенных зонах микроорганизмы находятся в условиях, когда одновременно присутствует широкий спектр токсичных металлов, проявляющих интегрированное действие на микроорганизмы. В связи с этим изучение множественной устойчивости к металлам антарктических микроорганизмов мы проводили на двух уровнях: «первого порядка» и «второго порядка».

Множественная резистентность «первого порядка», по нашему определению, – это устойчивость микроорганизма к нескольким металлам при условии, что влияние каждого из них проверяется отдельно. Множественная резистентность «второго порядка» – устойчивость, когда в среде содержится одновременно несколько металлов. При этом многообразие токсичного действия металлов проявляется в результате следующих повреждающих механизмов, которые негативно действуют на микроорганизмы:

1. Металлы «комбинированного» действия (например, Hg^{2+} и Cu^{2+}) наиболее токсичны, т. к. одновременно сочетают свойства как металлов-окислителей с высокими значениями стандартных редокс-потенциалов ($E'_{\circ} = +790$ мВ и $E'_{\circ} = +440$ мВ соответственно), так и металлов-заместителей, необратимо замещающих металлы в активных центрах ферментов энергетического и конструктивного обмена, клеточных структурах и т.д.

2. Металлы-окислители (например, Cr(VI) в форме аниона CrO_4^{2-} , $E'_{\circ} = +570$ мВ), которые не обладают свойствами токсичного металла-заместителя.

3. Металлы-заместители (например, Cd^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+}), которые не обладают свойствами металлов-окислителей.

Из всех известных токсичных металлов, количественно характеризующих гомеостаз, мы выбрали вышеуказанные шесть металлов для изучения множественной

microorganisms. However in natural and anthropogenic environments both isolated cultures and microbial communities are under simultaneous toxic influence of metals. Concerning to this we studied polyresistance of the Antarctic microorganisms at two levels: «the first order» and «the second order».

«The first order» of polyresistance we define as microbial resistance to several metals separately, in case of nutrient medium contains only one metal. «The second order» of polyresistance takes place when growth medium contains simultaneously some metals. The variety of metal toxic actions can be shown by following damaging mechanisms which negatively influence the microorganisms:

1. Metals of the "combined" action (for example, Hg^{2+} and Cu^{2+}) are most toxic, due to oxidizing properties (with high values of standard redox-potentials $E'_{\circ} = +790$ mV and $E'_{\circ} = +440$ mV accordingly) and replacing properties (those, which irreversible replace bivalent cations like Ca^{2+} and Mg^{2+} in enzyme active centers, cell structures etc.)

2. Metals with oxidizing properties (for example, Cr(VI) as CrO_4^{2-} compound, $E'_{\circ} = +570$ mV) which does not possess replacing properties.

3. Metals with replacing properties (for example, Cd^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+}) which do not possess oxidizing properties.

Among all toxic metals quantitatively describing a homeostasis, we have chosen the mentioned six metals for studying polyresistance of Antarctic microorganisms.

резистентности у антарктических микроорганизмов.

Множественную резистентность первого порядка изучали у десяти тест-культур (№ штаммов 3201–3210) по отношению к наиболее токсичным металлам: Hg^{2+} , Cu^{2+} , $Cr(VI)$, Co^{2+} , Cd^{2+} и Ni^{2+} . Полученные данные свидетельствуют о чрезвычайно высоком уровне устойчивости к этим металлам (Табл. 1–4). В контроле (без металлов) все тест-культуры вырастали через сутки. Внесение металлов иногда приводило к задержке роста. Известно, что катион ртути – самый токсичный среди металлов «комбинированного» действия, его бактерицидное действие проявляется в диапазоне 0,1–1,0 мг/л Hg^{2+} [3]. В наших экспериментах некоторые тест-культуры росли даже при 500 мг/л Hg^{2+} (Табл. 1), что

The first order of polyresistance of ten test-cultures (isolates № 3201–3210) has been studied at the most toxic metals: Hg^{2+} , Cu^{2+} , $Cr(VI)$, Co^{2+} , Cd^{2+} and Ni^{2+} . Obtained data testify to extremely high levels of resistance to these metals (Tab. 1–4). In control (without metals) all test-cultures grew in day. Metal introduction sometimes resulted in a growth inhibition. It is known, that mercuric ion is the highest bactericidal influence, it inhibits bacterial growth at 0.1-1.0 ppm Hg^{2+} [3]. In our experiments some test-cultures grew even at 500 ppm Hg^{2+} (Tab. 1), level that 2.5 orders exceeds the mercury bactericidal concentration for the majority of chemoorganotrophic microorganisms.

Table 1. **The first order of polyresistance of test-cultures to toxic metals with «combined» action**

Таблица 1. **Множественная резистентность первого порядка тест-культур к токсичным металлам «комбинированного» действия**

N of strain in UCM № штамма в УКМ	The growth of test-cultures at metal concentration, ppm Рост тест-культур при концентрации металла, мг/л						
	Hg^{2+}				Cu^{2+}		
	1×10^2	2×10^2	3×10^2	5×10^2	1×10^3	2×10^3	3×10^3
3201	–	–	–	–	+	+(4)	–
3202	–	–	–	–	+	–	–
3203	+	+(3)	+(3)	+(5)	+	–	–
3204	–	–	–	–	+	–	–
3205	+	+(2)	+(2)	+(5)	+	–	–
3206	+	+	+	+	+	+(3)	+(7)
3207	–	–	–	–	+	–	–
3208	+	+(2)	+(3)	+(5)	+	–	–
3209	–	–	–	–	+	+(4)	–
3210	–	–	–	–	+	+(5)	–

Notes. The absence and presence of growth: "–" and "+" respectively. Number in brackets – the time of lag-phase (days). In the control (without metals) the lag-phase was 1 day, in the presence of metals "+" without brackets also means the 1 day time of lag-phase. 3202 - *Enterobacter hormachei*, 3204 - *Brevibacterium antarcticum*.

Примечание. «–» и «+» – отсутствие и наличие роста. Цифры в скобках – длительность лаг-фазы (сутки). В контроле (без металлов) лаг-фаза была 1 сутки, в присутствии металлов «+» без скобок также означает, что лаг-фаза была 1 сутки. 3202 – *Enterobacter hormachei*, 3204 – *Brevibacterium antarcticum*.

Table 2. **The first order resistance of test-cultures to Cr(VI) (metal with oxidizing properties)**
 Таблица 2. **Резистентность первого порядка тест-культур к Cr(VI) (металл-окислитель)**

N of strain in UCM № штамма в УКМ	The growth of test-cultures at concentration of Cr (VI), ppm Рост тест-культур при концентрации Cr (VI), мг/л						
	1×10^3	5×10^3	3×10^4	4×10^4	3×10^5	5×10^5	6×10^5
3201	+ (3)	+	-	-	+	-	-
3202	+	+ (3)	+ (5)	-	+	+	+ (3)
3203	+ (3)	-	-	-	-	-	-
3204	+	+ (3)	-	-	+	-	-
3205	-	-	-	-	-	-	-
3206	+ (4)	+ (4)	-	-	-	-	-
3207	+	+ (3)	+ (5)	-	+	+	+ (4)
3208	+	-	-	-	-	-	-
3209	+	+ (3)	+ (5)	-	+	+	-
3210	+ (3)	+	+ (5)	-	-	-	-

Notes. See Table 1. In variants 3×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 - the growth in the presence of 20 g/l glucose.

Примечание. См. таблицу 1. В вариантах 3×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 – в среду внесена глюкоза (20 г/л).

на 2,5 порядка превышает бактерицидные концентрации ртути для большинства хемоорганотрофов.

Очень высокую устойчивость (до 2000–3000 мг/л Cu^{2+}) проявили тест-культуры и по отношению к меди (Табл. 1). Самый высокий уровень устойчивости (до 1000–30000 мг/л) тест-культур показан при добавлении Cr(VI) – высокопотенциального металла-окислителя (Табл. 2). При внесении в среду глюкозы (20 г/л) в качестве дополнительного источника углерода и энергии несколько культур росли даже при концентрации Cr(VI), близкой к одномолярной. Наконец, культуры 3202 и 3207 росли при 60000 мг/л Cr(VI), что превышает на 8000 мг одномолярную концентрацию (1 моль/л составляет 51996 мг/л Cr(VI)).

Металлы-заместители (Табл. 3) образуют следующий концентрационный ряд токсичности: $\text{Cd}^{2+} \text{Co}^{2+} \text{Ni}^{2+}$. Максимальные концентрации металлов, при которых росли некоторые тест-культуры, составляли 500–1000 мг/л Cd^{2+} , 1000–1500 мг/л Co^{2+} и 3000 мг/л Ni^{2+} (Табл. 3). Следует отметить, что некоторые металлы-заместители влияли на лаг-фазу роста культур. Если в контроле

Test cultures showed very high levels of resistance (up to 2000-3000 ppm Cu^{2+}) to cupric ion (Tab. 1). Among all metals the highest resistance (up to 1000-30000 ppm) have been revealed concerning Cr(VI) – a metal with oxidizing properties characterized by a high redox-potential (Tab. 2). In the case using glucose (20 g/l) as an additional source of carbon and energy, some strains grew even at concentrations of Cr(VI) close to 1M. At last, isolates 3202 and 3207 grew at 60000 ppm Cr(VI) that 8000 ppm exceeds 1M concentration (1 mole/l makes 51996 ppm Cr (VI)).

Metals with replacing properties (Tab. 3) form a toxicity range $\text{Cd}^{2+} \text{Co}^{2+} \text{Ni}^{2+}$. Maximal growth concentrations for the test-cultures were 500-1000 ppm Cd^{2+} , 1000-1500 ppm Co^{2+} and 3000 ppm Ni^{2+} (Tab. 3). It is necessary to note, that some metals with replacing properties influenced growth in lag-phase. During growth without metals colonies were observed in one day and in the presence of high concentration

(без металлов) рост культур наблюдался через одни сутки, то в присутствии высоких концентраций этих металлов лаг-фаза составляла от 2 до 7 суток (в редких случаях – до 11–25 суток). Следовательно, все исследованные тест-культуры проявили высокий уровень множественной резистентности первого порядка по

of these metals the lag-phase lasted from 2 till 7 day (in rare cases – till 11-25 day). Hence, all investigated test-cultures have shown a high level of the first order polyresistance in relation to six most toxic metals that combine both metal with oxidizing properties and metals with replacing properties.

Table 3. **The first order of polyresistance of test-cultures to toxic metals with replacing properties**

Таблица 3. **Множественная резистентность первого порядка тест-культур к токсичным металлам-заместителям**

N of strain in UCM № штамма в УКМ	The growth of test-cultures at metal concentration, ppm Рост тест-культур при концентрации металла, мг/л														
	Co ²⁺					Cd ²⁺			Ni ²⁺						
	1 x 10 ²	2 x 10 ²	5 x 10 ²	1 x 10 ³	2 x 10 ³	5 x 10 ³	1 x 10 ³	2 x 10 ³	1 x 10 ²	2 x 10 ²	5 x 10 ²	1 x 10 ³	1,5 x 10 ³	2 x 10 ³	3 x 10 ³
3201	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+(11)	-	-	-	-
3202	+(7)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
3203	+	+(2)	+(4)	+(11)	-	+(5)	-	-	+	+	+	+(2)	+(4)	+(7)	+(11)
3204	+	+(4)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+(2)	+(2)	+(4)	-
3205	+	+(2)	+(4)	+(6)	+(7)	+(4)	+(6)	-	+	+	+(2)	+(2)	+(11)	+(11)	+(25)
3206	-	+(11)	+(12)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
3207	-	+(4)	-	-	-	-	-	-	+	+	+(7)	-	-	-	-
3208	-	+(2)	-(4)	+(7)	+(7)	-	-	-	+	-	+	+(2)	-(2)	+(4)	+(7)
3209	+(4)	+(4)	+(6)	+(30)	-	-	-	-	+	+	+(4)	+(7)	+(7)	-	-
3210	+(4)	+(7)	+(11)	-	-	-	-	-	+	+(2)	+(3)	+(7)	-(7)	-	-

Notes. See Table 1.

Примечание. См. таблицу 1.

Table 4. **The second order of polyresistance of test-cultures to high concentration of Cu²⁺, Hg²⁺ и Cr(VI)**

Таблица 4. **Полирезистентность второго порядка тест-культур к высоким концентрациям Cu²⁺, Hg²⁺ и Cr(VI)**

N	Concentration of metals, ppm Концентрация металлов, мг/л			N of strain in UCM № штамма в УКМ		
	Hg ²⁺	Cu ²⁺	Cr(VI)	3203	3206	3208
	1	0	0	0	+	+
2	0	200	50	+	+	+
3	0	200	100	+	+	+
4	0	500	50	+(2)	+(4-6)	+(2)
5	0	500	100	+(2)	+(2)	+(2)
6	100	200	0	+(3)	+	+(2)
7	100	500	0	+	+	+
8	50	0	50	+(2)	+	+(2)
9	100	0	100	+(2)	+	+(2)
10	100	200	50	+(2)	+	+(6)
11	100	200	100	+(2)	+	+(2)
12	100	500	100	+(6)	+(6)	+(6)
13	100	600	100	-	-	-
14	150	500	150	-	-	-

Notes. See Table 1.

Примечание. См. таблицу 1.

отношению к шести наиболее токсичным металлам, сочетающим в себе повреждающие свойства как металлов-окислителей, так и металлов-заместителей.

Множественная резистентность второго порядка. Наличие в среде нескольких токсичных металлов усиливает их интегральное ингибирующее действие на микроорганизмы. Поэтому при изучении данного явления мы одновременно вносили в среду различные комбинации наиболее токсичных металлов: Hg^{2+} , Cu^{2+} и CrO_4^{2-} (Табл. 4). Три тест-культуры (3203, 3206 и 3208), проявившие максимальную устойчивость первого порядка к металлам, были устойчивы к смеси токсичных металлов (Табл. 4). Необходимо отметить, что даже высокие концентрации металлов в среде не приводили к существенной задержке роста культур. Так, при наличии трёх металлов (100 мг/л Hg^{2+} , 500 мг/л Cu^{2+} , 100 мг/л Cr(VI)) все культуры вырастали, как правило, на 1-2 сутки, и только в некоторых случаях лаг-фаза составляла 4–6 суток.

Предельно допустимой для роста тест-культур была комбинация: 100 мг/л Hg^{2+} , 500 мг/л Cu^{2+} и 100 мг/л Cr(VI) (Табл. 4, № 12). При дальнейшем повышении концентрации металлов рост микроорганизмов отсутствовал (Табл. 4, №№ 13, 14). Наиболее значимые результаты по полирезистентности второго порядка получены на среде, содержащей смесь трех металлов (Табл. 4, № 10-12). По-видимому, тест-культуры имеют различные компенсаторные механизмы для снижения интегрального ингибиторного действия металлов-окислителей и металлов-заместителей, что обеспечивает их рост при экстремально высоких концентрациях металлов.

Перспективы создания новых промышленных биотехнологий на основе взаимодействия антарктических микроорганизмов с металлами. Эффективное использование металлрезистентных микроорганизмов в

The second order plural of polyresistance. Presence of several toxic metals in the medium strengthens their integrated toxic influence on microorganisms. Studying the given polyresistance phenomenon we simultaneously brought in medium various combinations of the most toxic metals Hg^{2+} , Cu^{2+} and CrO_4^{2-} (Tab. 4). Isolates 3203, 3206 and 3208 characterized with the highest resistance level of the first order also showed resistance to toxic metal mixes (Tab. 4). It is necessary to note, that even high concentrations of metals did not result in an essential growth inhibition of isolates' growth. So, at presence of three metals (100 ppm Hg^{2+} , 500 ppm Cu^{2+} , 100 ppm Cr(VI), the lag-phase as a rule lasted 1-2 days, and only in some cases 4-6 days.

Maximum permissible metal combination for growth of test-cultures was 100 ppm Hg^{2+} , 500 ppm Cu^{2+} and 100 ppm Cr(VI) (Tab. 4, N 12). At the further increase of metal concentration growth was not revealed (Tab. 4, N 13, 14). The most significant results on the second order plural metal resistance were obtained on media containing a mix of three metals (Tab. 4, N 10-12). We suggest isolates possess various compensatory mechanisms against metals with oxidizing properties and metals with replacing properties toxic influence, which provide their growth at extremely high metal concentrations.

Prospects of development of new environment-protection industrial biotechnologies on the basis of interaction of the Antarctic microorganisms with metals. The effective use of metal resistant microorganisms in industrial biotechnologies assumes presence

промышленных биотехнологиях предполагает наличие целого ряда механизмов взаимодействия микроорганизмов с металлами. Так, например, при очистке металл-содержащих сточных вод микроорганизмы должны извлекать металлы из водной фазы до установленных техническим заданием предельно-допустимых концентраций. Поэтому мы исследовали механизмы взаимодействия антарктических микроорганизмов с металлами, такие как иммобилизация и мобилизация. Иммобилизация металлов осуществляется за счет их восстановления до нерастворимых форм ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}(\text{OH}) \downarrow$, $\text{CrO}_4^{2-} \rightarrow \text{Cr}(\text{OH})_3 \downarrow$ etc.), осаждения органическими и неорганическими микробными экзометаболитами ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow [\text{Cu}^{2+}\text{-белок}] \downarrow$; $\text{Co}^{2+} \rightarrow \text{CoS} \downarrow$ etc.; $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{CuCO}_3 \downarrow$, а также аккумуляции металлов клетками (образования комплекса [металл-клетка] \downarrow и активный транспорт металлов в клетку). Мобилизация металлов происходит вследствие образования комплексных растворимых соединений металлов с микробными метаболитами (например, с органическими кислотами), а также вследствие снижения pH среды с последующим растворением осажденной формы металла (например, $\text{Cu}(\text{OH})_2 \downarrow + \text{nxH}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+}$).

В зависимости от условий культивирования антарктические микроорганизмы могут осуществлять как мобилизацию, так и иммобилизацию токсичных металлов. Такая направленная регуляция микробного метаболизма позволяет в перспективе создать полифункциональные промышленные биотехнологии, предназначенные как для удаления металлов из водных растворов, так и, напротив, перевода осажденных соединений металлов в растворимую форму. Так, иммобилизация может быть использована в: (1) биотехнологиях очистки металлсодержащих промышленных сточных вод от широкого спектра металлов (в диапазоне 200–1000 мг-

of mechanisms of interaction of microorganisms with metals. So, during purification of metal-containing wastewater microorganisms should uptake metals up to level of maximal permissible concentrations in requirements specification. It is possible to specify such interaction of Antarctic microorganisms with metals as immobilization and mobilization. Metal immobilization takes place due to their reduction up to insoluble compounds ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}(\text{OH}) \downarrow$, $\text{CrO}_4^{2-} \rightarrow \text{Cr}(\text{OH})_3 \downarrow$ etc.), sedimentation with organic and inorganic microbial metabolites ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow [\text{Cu}^{2+}\text{-белок}] \downarrow$; $\text{Co}^{2+} \rightarrow \text{CoS} \downarrow$ etc.; $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{CuCO}_3 \downarrow$, metal accumulation (formation of [metal - cell] \downarrow complex and energy-dependent transport of metals into a cell). Metal mobilization occurs owing to formation of complex soluble compound with microbial metabolites (for example, organic acids), and also pH value reduction with the subsequent dissolution of insoluble metal compounds $\text{Cu}(\text{OH})_2 \downarrow + \text{nxH}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+}$.

Depending on cultivation conditions Antarctic microorganisms can carry out both mobilization and immobilization of toxic metals. Such directed regulation of a microbial metabolism allows designing multifunctional industrial biotechnologies aiming at metal uptake, and opposite, transformation of insoluble metal compounds into soluble ones. Immobilization processes can be used in biotechnologies of (1) industrial metal-containing sewage purification (at metal concentration 200 - 1000 ppm); (2) bioremediation of metal-polluted environments; (3) extraction and concentration of precious metals from the diluted solutions at the mining enterprises, etc. Biotechnologies

ионов/л); (2) биоремедиации природных и техногенных водоемов, загрязненных металлами; (3) извлечении и концентрировании ценных металлов из разбавленных растворов на горнодобывающих предприятиях, и т.д. Биотехнологии, основанные на мобилизации нерастворимых соединений металлов, перспективны для повышения эффективности извлечения металлов из пород в горнодобывающей и горноперерабатывающей промышленности. Мобилизация металлов антарктическими микроорганизмами может применяться в биоремедиационных технологиях в зонах техногенных катастроф для очистки терриконов и почв от токсичных металлов и т.д.

Пигментированные антарктические микроорганизмы и их экофизиологические свойства. Пигментированные микроорганизмы выделяли на средах, в отсутствие экстремальных факторов. В результате было показано, что они широко распространены в наземных биотопах Антарктики. Например, в наскальных антарктических фитоценозах частота их встречаемости, а также общее количество и биоразнообразие значительно выше, чем в других антарктических биотопах. Изучение морфологокультуральных свойств изолированных пигментированных микроорганизмов показало, что они представлены как прокариотами (бактерии и актиномицеты), так и эукариотами (мицелиальные грибы и дрожжи). Мы изучали природу пигментов у изолированных микроорганизмов, так как они являются потенциальными продуцентами биологически активных веществ (меланины, каротины и др.), которые могут быть использованы в промышленных биотехнологиях.

Синтез меланина. Несколько штаммов угольно-чёрных дрожжей (*Exophiala nigra*) синтезировали тёмные пигменты. Изучение физико-химических свойств этих пигментов показало, что по комплексу специфических химических тестов они подобны меланину.

based on insoluble metal compounds mobilization are perspective to increase the efficiency of extraction of metals from breeds in mining industry. Mobilization of metals by the Antarctic microorganisms can be applied in bioremediation technologies of highly metal-polluted areas such as heaps and soils, etc.

Pigmented Antarctic microorganisms and their ecophysiological characteristics.

Pigmented microorganisms were isolated on media without influence of extreme factors. It has been shown, that they are widely occurring in terrestrial environments of Antarctic Region. For example, their total number, occurrence and biodiversity in rock samples is much higher, than in other Antarctic biotopes. Morphological and physiological properties characterize pigmented isolates as prokaryotes (bacteria and actinomycetes) and eukaryotes (fungi and yeast). We studied the nature of extracted microbial pigments as far as they are potential producers of biologically active substances (melanins, carotins, etc) which can be used in industrial biotechnologies.

Melanin synthesis. Several coal-black yeast isolates (*Exophiala nigra*) have shown the ability to synthesize dark pigment. Studying pigment characteristics confirmed their relation to melanin by a complex of physical and chemical properties. This conclusion is

Этот вывод подтверждён также характером УФ-спектров (в области 220–230 нм) и спектров поглощения пигмента в видимой области (400–800 нм). Выход пигмента меланиновой природы составлял более 10% от биомассы. Это может оказаться перспективным для медицинской промышленности, т.к. меланины, выделенные из чёрных антарктических дрожжей, обладают уникальными лечебными свойствами.

Синтез каротинов. Детальный хроматографический и спектрофотометрический анализ розово-пигментированных бактерий (*Methylobacterium extorquens*) показал, что каротиноиды исследуемых штаммов представлены преимущественно ксантофиллами. Общий для всех исследованных штаммов и представленный в наибольшем количестве каротиноид был идентифицирован как осцилоксантин (рис 1). Количественное содержание каротиноидов составляло 0,23–0,35 мг/г сухого веса клеток у разных штаммов. Исследованные метилотрофы могут

confirmed also with UV-spectra at 220-230 nanometers and absorption spectra in visible light (400-800 nanometers). Melanin output made more than 10 % from total yeast biomass. It can appear perspectives for the physical and chemical properties.

Carotenoid synthesis. Detailed chromatographic and spectrophotometric analysis of pink pigmented bacteria (*Methylobacterium extorquens*) has shown, that carotenoids are mainly represented by xanthophyll. Common feature of isolates is that carotenoids are identified as osilloxanthins (Figure 1). Carotenoid content was 0.23-0.35 ppm of dry cells weight at different strains. Investigated methylotrophs can be considered as potential industrial carotenoid producers. It is known that carotenoids possess high antioxidative activity which appears in highly reacting oxygen radicals' deactivation. As it is

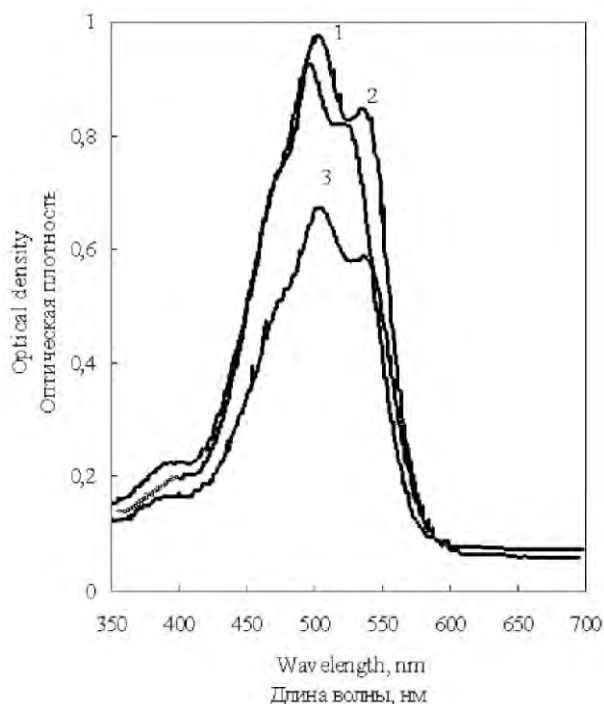


Figure 1. Oscilloxanthin absorption spectra (a pigment extracted from *Methylobacterium extorquens* cells). 1 – native carotenoid, 2 – carotenoid after effects NaBH_4 , 3 – carotenoid after effects HCl .

Рис. 1. Спектры поглощения осцилоксантина (выделенного из клеток *Methylobacterium extorquens*). Цифрами обозначены: 1 – нативный каротиноид, 2 – каротиноид после действия NaBH_4 , 3 – каротиноид после действия HCl .

рассматриваться как потенциальные промышленные продуценты каротиноидов. Известно, что каротиноиды имеют высокую антиоксидантную активность, которая проявляется в дезактивации высокореакционных свободных радикалов кислорода. Как сказано выше, в антарктических фитоценозах нами обнаружены красные дрожжи, пигменты которых содержат β -каротин. Поэтому они могут рассматриваться как потенциальные продуценты β -каротина для промышленных биотехнологий.

Синтез криопротекторов метилотрофами. Некоторые бактерии катализируют процесс образования льда при температуре от -2°C до -5°C . Являясь центрами кристаллизации льда, такие бактерии способствуют образованию льда даже при небольших заморозках, в результате чего повреждаются растительные ткани. Это способствует проникновению бактериальной инфекции в растения и их гибели при заморозках [12].

above, we have found out red-pigmented yeast in Antarctic phytocenoses which contain β -carotin. Therefore they can be considered to be potential β -carotin producers for industrial biotechnologies.

Synthesis of cryoprotectors by methylotrophic bacteria. Some bacteria catalyze ice nucleation processes at temperature from -2°C to -5°C . Being ice nucleation centers such bacteria provide crystallization even at a small touch of frost that results plant tissues damaging. This causes penetration of a bacterial infection into plants and their destructions at low temperatures (freeze) [12]. In the majority of Antarctic phytocenosis (moss, lichens, grass) on islands of Antarctic Region we found out

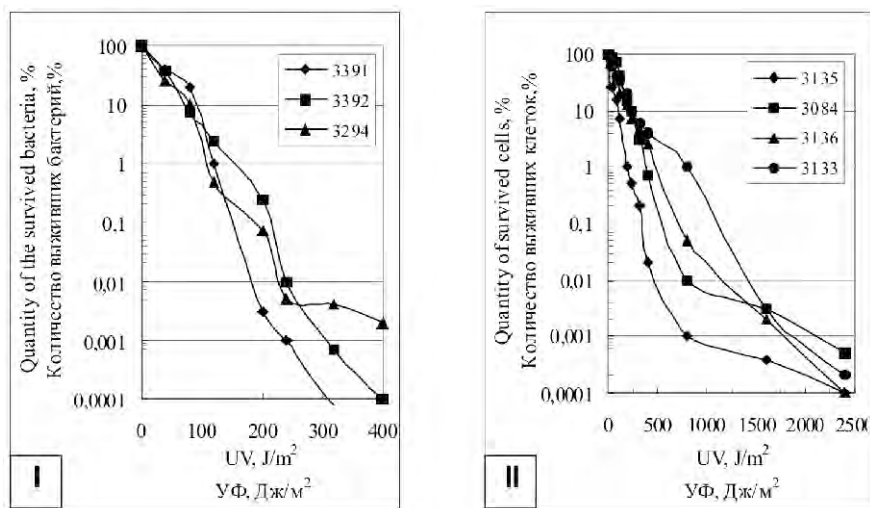


Figure 2. Survival of the Antarctic microorganisms at various doses UV irradiation. Numbers of strains are resulted in a legend: I – pink pigmented strains *Methylobacterium*; II – red yeast (3133, 3136) and coal-black yeast *Exophiala nigra* (3084, 3135).

Рис. 2. Выживаемость антарктических микроорганизмов при различных дозах УФ облучения. В легенде приведены номера штаммов: I – розово-пигментированные штаммы *Methylobacterium*; II – красные дрожжи (3133, 3136) и угольно-чёрные дрожжи *Exophiala nigra* (3084, 3135).

Нами в большинстве антарктических фитоценозов (мох, лишайник, трава) на островах Антарктики обнаружены эпифитные метилотрофные бактерии (метилотрофы). Поэтому представлялось целесообразным изучить у них льдообразующие свойства. Показано, что в присутствии метилотрофов кристаллизация льда начиналась при температуре от -6°C до -13°C [17].

Таким образом, метилотрофы, которые являются постоянными обитателями фитоценозов, не катализировали процесс образования льда, и более того: некоторые из них оказывали «антифризный» эффект. Следовательно, в отличие от других бактерий они положительно влияют на фитоценозы Антарктики в период заморозков в результате криопротекторного действия. Видимо, в перспективе из метилотрофов могут быть получены промышленно-значимые криопротекторы.

Устойчивость к УФ радиации. Мы предположили, что на вертикальных скалах, открытых для непрерывного действия Солнца во время полярного лета, должны существовать микроорганизмы, устойчивые к УФ радиации. Действительно, оказалось, что антарктические розово-пигментированные метилотрофы высоко устойчивы к УФ (рис. 2, I). Сублетальная доза УФ ($LD_{99,99}$) для них составляла 200–300 Дж/м², в то время как для бесцветных метилотрофов – 20–40 Дж/м².

Красные, а также угольно-чёрные дрожжи *Exophiala nigra* были ещё более устойчивыми к УФ (рис. 2, II). Сублетальная доза УФ для угольно-чёрных дрожжей составляла 500–800 Дж/м², для красных антарктических дрожжей – 1000–1500 Дж/м².

Итак, впервые на вертикальных скалах в Антарктике показано наличие бактерий и дрожжей, резистентных к высоким дозам УФ радиации, летальных для многих микроорганизмов. По-видимому, значительное количество пигментированных форм антарктических микроорганизмов на вертикальных скалах

epiphyte methylotrophic bacteria (further methylotrophs). Therefore we have found reasonable to study their ice nucleation properties. It was established that in the presence of methylotrophs ice nucleation process starts at temperatures from -6°C to -13°C [17].

Thus, methylotrophs which are constant phytocenosis inhabitants did not catalyze ice nucleation, and, moreover, some of them provided antifreeze effect. Hence, on the contrary to other bacteria, they positively effect phytocenosis of Antarctic Region and act as cryoprotectors. We suppose Antarctic methylotrophs to be significant source for industrial cryoprotector.

Resistance to UV radiation. Since vertical rocks are under permanent action of the Sun during polar summer we assumed there should be microorganisms resistant to UV radiation. Indeed, Antarctic pink-pigmented methylotrophs were found out to be highly resistant to UV radiation (Figure 2, I). Sublethal UV doses ($LD_{99,99}$) for pigmented methylotrophs made 200–300 J/m², while for non-pigmented - 20–40 J/m².

Red and coal-black yeast *Exophiala nigra* were more resistant to UV-radiation (Figure 2, II). Sublethal UV doses made 500–800 J/m² for coal-black yeast, for red-pigmented Antarctic yeast - 1000–1500 J/m².

So, for the first time on vertical rocks in Antarctic Region presence of bacteria and yeast, resistant to high UV radiation doses lethal for the majority of microorganisms is revealed. The high number of pigmented microorganisms on Antarctic vertical rocks (cell/g of sample): (1) pink-, yellow- and orange-pigmented bacteria – from 10^2 up to

(клеток/г образца): (1) розовые, желтые и оранжевые бактерии – от 10^2 до 10^6 ; (2) красные и чёрные дрожжи – от 10^4 до 10^6 ; (3) бурые и чёрные микроскопические грибы – до 10^3 объясняется непрерывным действием на протяжении полярного лета активной солнечной радиации. Мы предполагаем, что адаптация микробных сообществ к высокому уровню УФ радиации происходит путём природной селекции микроорганизмов, у которых устойчивость к этому фактору генетически детерминирована. Видимо, в условиях повышенного уровня солнечной радиации в Антарктике преимущество для выживания на скалах получили микроорганизмы, которые имели эффективные механизмы репарации повреждений ДНК, и/или пигменты, защищающие клетки от солнечной радиации. Пигментированные изоляты представляют перспективные продуценты биологически активных веществ (меланинов, каротинов, криопротекторов).

Синтез антибиотиков и устойчивость к ним антарктических микроорганизмов. Как уже упоминалось, в зоне субполярных оазисов, на поверхности антарктических островов крайне неравномерно распределены органические соединения. Это приводит к жесткой конкуренции микроорганизмов за субстрат (т.е. за источники углерода и энергии) и как следствие – к антибиозу. Антибиоз проявляется как синтезом антибиотиков, так и устойчивостью к ним.

Синтез антибиотиков. Из антарктических биотопов выделено 50 штаммов флуоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas* [10]. Показано, что для них оптимальная температура роста равна $+26^\circ\text{C}$. Однако культивирование этих бактерий при низких температурах ($+4^\circ\text{C}$) приводило к резкому возрастанию антибиотической активности. Это необычное проявление адаптации микроорганизмов к условиям жесткой конкуренции за субстрат в антарктических условиях было показано нами на

10^6 ; (2) red and black yeast – from 10^4 up to 10^6 ; (3) brown and black fungi – up to 10^3 , can be explained by continuous action of active solar radiation during polar summer. We assume that adaptation of microbial communities to high level of UV radiation in Antarctic Region occurs by natural selection of microorganisms which resistance is genetically determined. Probably, in conditions of the high level of solar radiation in Antarctic Region, an advantage to a survival on rocks got microorganisms which had effective DNA reparation mechanisms and/or possessed protective properties of pigments. Pigmented isolates present industrial interest as perspective producers of biological-active substances (melanins, carotins, cryoprotectors).

Synthesis of antibiotics and resistance to them of Antarctic microorganisms. As it was already mentioned, in a zone of Antarctic oases, on a surface of the islands organic compounds are extremely non-uniformly distributed. This results in a severe competition of microorganisms for a substratum (i.e. for sources of carbon and energy) and as consequence to antibiosis phenomenon. Antibiosis means both synthesis of antibiotics, and resistance to them.

Synthesis of antibiotics. 50 fluorescing *Pseudomonas* strains are isolated from Antarctic biotopes [10]. Their optimum growth temperature is equal $+26^\circ\text{C}$. However cultivation at low temperatures ($+4^\circ\text{C}$) resulted in sharp increase of antibiotic activity. This unusual effect of microbial adaptation to conditions of severe competition for a substratum in Antarctic environments has been shown for several *Pseudomonas putida* isolates. At $+26^\circ\text{C}$ antibiotic activity was minimal, and at $+4^\circ\text{C}$ – sharply grew and resulted in growth suppression of conditionally pathogenic Gram-

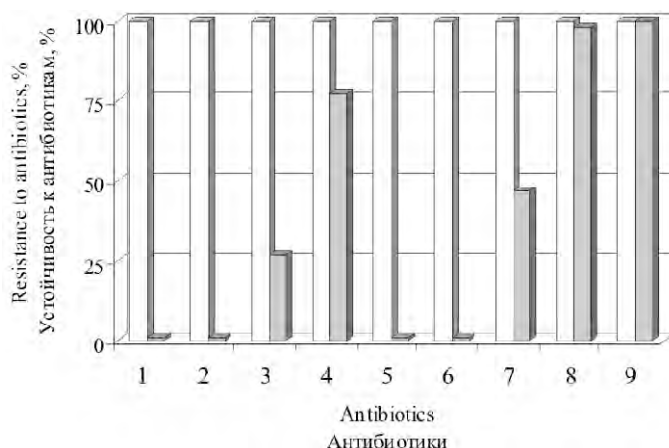


Figure 3. Resistance of Antarctic cultures *Enterobacter hormachei* 3202 (white columns) and *Brevibacterium antarcticum* 3204 (grey columns) to antibiotics of a wide spectrum of action (1 - teicoplanin, 2 - clindamycin, 3 - cefuroxime, 4 - cefoxitin, 5 - amikacin, 6 - chloramphenicol, 7 - oleandomycin, 8 - lincomycin, 9 - oxacillin).

Рис. 3. Устойчивость антарктических культур *Enterobacter hormachei* 3202 (белые столбики) и *Brevibacterium antarcticum* 3204 (серые столбики) к антибиотикам широкого спектра действия (1 – тейкопланин, 2 – клиндамицин, 3 – цефуроксим, 4 – цефокситин, 5 – амикацин, 6 – левомицетин, 7 – олеандомицин, 8 – линкомицин, 9 – оксациллин).

нескольких антарктических штаммах *Pseudomonas putida*. Так, при температуре +26°C антибиотическая активность была минимальной, а при +4 °C резко возрастала и приводила к подавлению роста условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Escherihia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. aeruginosa*, а также микроскопических грибов *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor circinelloides*.

Устойчивость к антибиотикам. Другой аспект антибиоза (устойчивость к антибиотикам) был изучен у антарктических штаммов *Enterobacter hormachei* 3202 и *Brevibacterium antarcticum* 3204. Исследованные штаммы проявили различную степень устойчивости к антибиотикам широкого спектра действия (рис. 3), которые вызывают повреждение цитоплазматической мембраны, подавление синтеза белка и т.д.

Высокоустойчив к антибиотикам *Enterobacter hormachei* 3202, в отличие от него *Brevibacterium antarcticum* 3204 в

positive and Gram-negative bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Escherihia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. aeruginosa*, and fungi *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor circinelloides*.

Resistance to antibiotics. Other aspect of antibiotic resistance has been investigated at Antarctic strains *Enterobacter hormachei* 3202 and *Brevibacterium antarcticum* 3204. Isolates have shown resistance to antibiotics of wide spectrum action (Figure 3) which cause cytoplasmic membranes degrading, suppression of protein synthesis, etc.

Enterobacter hormachei 3202 was highly resistant to the antibiotic spectrum while *Brevibacterium antarcticum* 3204, basically

основном чувствителен к исследованному спектру антибиотиков. Работы по исследованию синтеза антибиотиков и устойчивости к ним антарктических микроорганизмов начаты нами недавно, однако приведенные результаты однозначно свидетельствуют об активном проявлении антибиоза в антарктических биотопах.

Таким образом, на первых этапах изучения явления антибиоза нами показано, что в состав микробных антарктических ценозов входят продуценты антибиотиков, которые в перспективе, при системном исследовании, могут найти применение в медицинской промышленности. Кроме того, на примере устойчивых к антибиотикам антарктических микроорганизмов можно тестировать эффективность действия новых антимикробных препаратов.

Цитопротекторное действие меланина (продуцент – антарктические дрожжи *Exophiala nigra*). Изучали влияние меланина на развитие язв, эрозий, кровоизлияний в слизистой оболочке желудка крыс, а также на развитие предраковых состояний в желудке.

Влияние меланина на нейродистрофические поражения в слизистой оболочке желудка крыс, вызванные острым стрессом по Селье. Острый стресс по Селье вызывал образование нейродистрофических поражений (язвы, эрозии, кровоизлияния) в слизистой оболочке желудка крыс, интенсифицировал процесс перекисного окисления липидов в слизистой оболочке желудка, что проявлялось в увеличении концентрации диеновых конъюгатов на 63% ($p < 0,05$), ТБК-активных продуктов – на 98,5% ($p < 0,05$), Schiffовых оснований – на 82% ($p < 0,05$). Одновременно возрастала активность ферментов антиоксидантной защиты: активность СОД и каталазы увеличивались на 29% ($p < 0,05$) и 37% ($p < 0,05$) соответственно. Введение меланина крысам перед нанесением стресса приводило к уменьшению площади язв в слизистой оболочке желудка крыс, вызванных методом нервно-мышечного

was sensitive to the same antibiotics. Works on antibiotic synthesis and antibiotic resistance of the Antarctic microorganisms we started recently, however results testify to active antibiosis in Antarctic environments.

Thus, at the first stages of the antibiosis phenomenon studying we have shown that Antarctic microbial communities contain antibiotic producers which can find their application in medical industry. Besides this Antarctic microorganisms can be used as test-cultures for studying efficiency of new antimicrobial preparations.

Cytoprotective effect of melanin (producer - Antarctic yeast *Exophiala nigra*). The influence of melanin on the development of ulcers, erosions, hemorrhages in the gastric mucosa of rats, as well as the development of precancerous lesions in the stomach were studied.

Effect of melanin on neuro-degenerative lesions in the gastric mucosa of rats caused by acute stress according to Selye. Acute stress by Selye formed neuro-degenerative lesions (ulcers, erosions, hemorrhage) in the gastric mucosa of rats, intensified the process of lipid peroxidation in the gastric mucosa, resulting in increased concentrations of conjugated dienes by 63% ($p < 0.05$), TBA-active products - by 98.5% ($p < 0.05$), Schiff's bases - by 82% ($p < 0.05$). Simultaneously, increased antioxidant enzyme activity: SOD and catalase activity increased by 29% ($p < 0.05$) and 37% ($p < 0.05$) respectively. Introduction of melanin to rats before the application of stress leads to a decrease of ulcers area in the gastric mucosa of rats caused by neuro-muscular tension by Selye, for 79% ($p < 0.001$), to reduce the content of the products of lipid peroxidation in the gastric mucosa of rats and a further increase of SOD activity. The activity of catalase decreased to control values.

напряжения по Селье, на 79% ($p < 0,001$), к уменьшению содержания продуктов перекисного окисления липидов в слизистой оболочке желудка крыс и дальнейшему увеличению активности СОД. При этом активность каталазы падала до контрольных величин.

Влияние меланина на нейродистрофические поражения в слизистой оболочке желудка крыс, вызванные хроническим иммобилизационным стрессом. Меланин оказывал выраженное цитопротекторное действие на слизистую оболочку желудка крыс, что проявлялось в уменьшении количества и площади нейро-дистрофических поражений, вызванных методом иммобилизационного стресса. Меланин усиливал экспрессию белка eNOS в слизистой оболочке желудка крыс, подвергшихся воздействию хронического стресса, что приводило к увеличению генерации оксида азота, в результате чего возрастала концентрация в крови его метаболита NO^2 . Таким образом, один из механизмов антистрессового влияния меланина состоит в увеличении продукции оксида азота, которому принадлежит важная роль в цитопротекции. Блокатор рецепторов активации пролиферации пероксисом гамма GW9662 устранял защитное действие меланина на образование язв и массивных кровоизлияний в слизистой оболочке желудка крыс, подвергнутых воздействию хронического стресса, что является свидетельством того, что цитопротективные свойства меланина в условиях стресса частично обусловлены стимуляцией рецепторов активации пролиферации пероксисом гамма.

Таким образом, механизм антистрессового влияния меланина обусловлен антиоксидантными свойствами меланина, стимуляцией рецепторов активации пролиферации пероксисом гамма, усилением экспрессии eNOS, а также уменьшением концентрации в крови гормона стресса кортизола, уровень которого резко возрастает под влиянием

Effect of melanin on neuro-degenerative lesions in the gastric mucosa of rats caused by chronic immobilization stress. Melanin has a pronounced cytoprotective effect on the gastric mucosa of rats, which manifested in reducing the number and area of neuro-degenerative lesions caused by immobilization stress. Melanin enhanced the expression of eNOS protein in the gastric mucosa of rats exposed to chronic stress, leading to increased generation of nitric oxide, resulting in increased concentration in the blood of its metabolite NO^2 . Thus, one of the mechanisms of anti-stress effect of melanin is to increase the production of nitric oxide, which plays an important role in cytoprotection. Blocker of peroxisome proliferator-activated receptor gamma GW9662 eliminated the protective effect of melanin on ulceration and massive hemorrhage in the gastric mucosa of rats susceptible to chronic stress, which is an indication that the cytoprotective properties of melanin in stress conditions are partly due to the stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

Therefore, the mechanism of antistress effect of melanin is due to antioxidant properties of melanin, the stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, increased expression of eNOS, as well as lower blood concentrations of the stress hormone cortisol, the level of which increases dramatically under stress.

стресса.

Влияние меланина на структурно-функциональные изменения в слизистой оболочке желудка крыс, вызванные длительной гипергастринемией. Длительная гипергастринемия, вызванная 28-дневным введением омепразола [25], приводила к развитию гиперплазии в слизистой оболочке желудка у 50% крыс и метаплазии – у 50% крыс, что проявлялось в изменениях морфометрических показателей [2]. У крыс с гиперплазией регистрировалась повышенная, а у крыс с метаплазией – пониженная базальная секреция соляной кислоты в желудке. Введение меланина одновременно с омепразолом предотвращало развитие структурных изменений в слизистой оболочке желудка крыс, в результате чего нормализовалась базальная секреция соляной кислоты в желудке. Полученные данные являются экспериментальным обоснованием возможного создания на основе меланина, продуцентом которого являются дрожжи *Exophiala nigra*, медицинских препаратов. Например, для профилактики рецидивов язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, препаратов для профилактики неопластических изменений в желудке, антиоксидантов и адаптогенов.

Effect of melanin on structural and functional changes in the gastric mucosa of rats caused by long hypergastrinemia. Prolonged hypergastrinemia, caused by the 28-day administration of omeprazole [25], led to the development of hyperplasia in the gastric mucosa in 50% of rats and metaplasia in 50% of rats, which manifested in morphometric parameters changes [2]. In rats with hyperplasia of the recorded high, and in rats with metaplasia - reduced basal secretion of hydrochloric acid in the stomach. Introduction of melanin in conjunction with omeprazole prevented the development of structural changes in the gastric mucosa of rats, resulting in normalized basal secretion of hydrochloric acid in the stomach. These data are experimental justification for the possible establishment on the basis of melanin, the producer of which is the yeast *Exophiala nigra*, of drugs for the prevention of recurrence of gastric ulcers and duodenal ulcers, drugs for the prevention of neoplastic changes in the stomach, antioxidants and adaptogens.

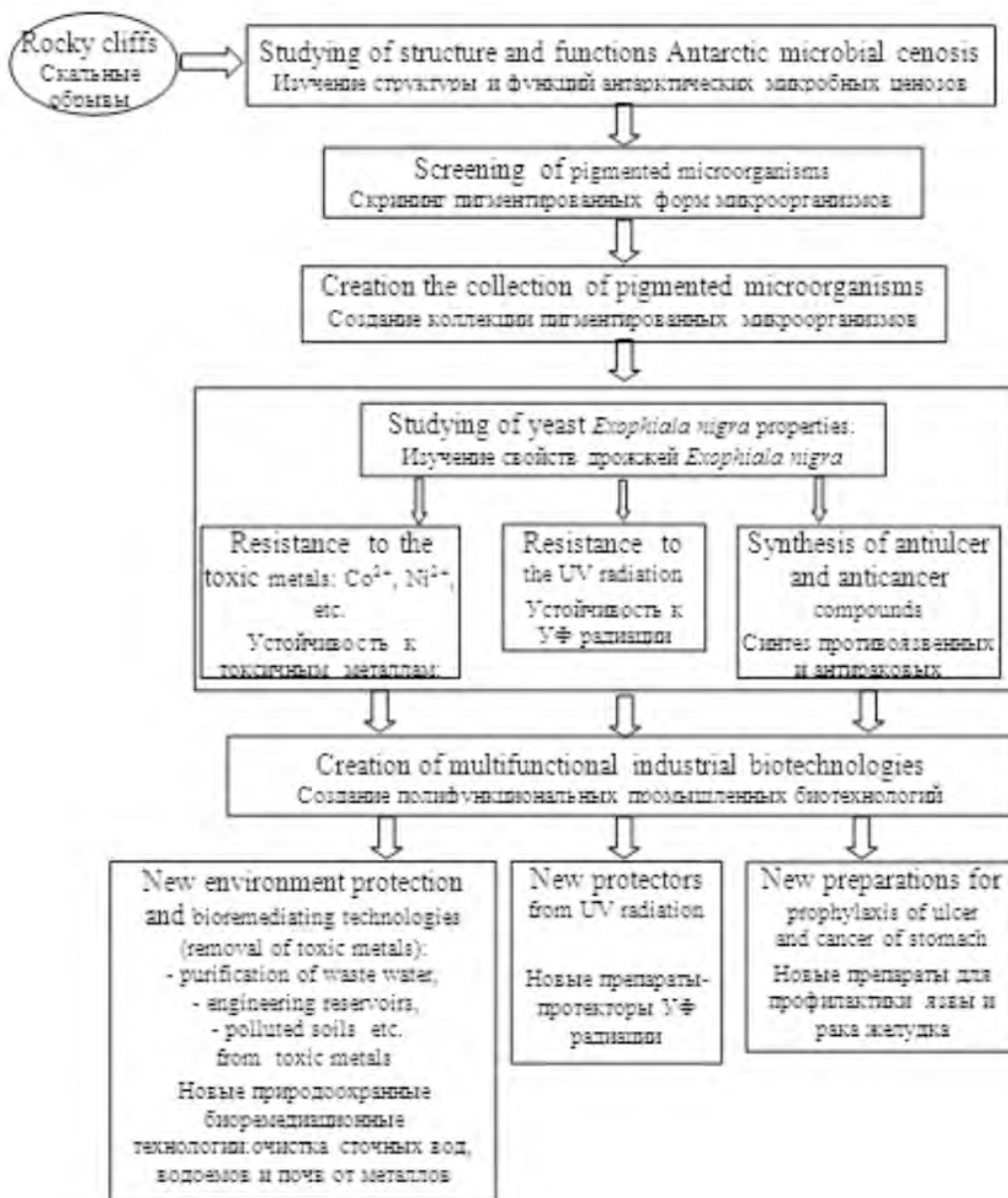


Figure 4. Perspectives of multifunctional industrial biotechnologies development on the basis of Antarctic coal-black yeast *Exophiala nigra* as natural result of system investigation of Antarctic microbial cenoses' structure and functions.

Рисунок 4. Перспективы создания полифункциональных промышленных биотехнологий на основе антарктических черно-пигментированных дрожжей *Exophiala nigra* как закономерный результат системного исследования структуры и функций антарктических микробных ценозов.

Заклучение. Системное изучение структуры и функций антарктических микробных ценозов показало, что они проявляют высокую степень адаптации к экстремальным факторам. Создана коллекция микроорганизмов, устойчивых к экстремальным факторам. Коллекция включает микроорганизмы, устойчивые к высоким дозам УФ радиации (500–1500 Дж/м²), широкому спектру антибиотиков и наиболее токсичным металлам (Hg²⁺, Cu²⁺, Cr(VI), Co²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺) в диапазоне 5x10²...6x10⁴ мг-ионов/л, продуценты криопротекторов, биологически активных веществ (меланины, каротины, антибиотики).

Эффективность системного подхода при изучении структуры и функций антарктических микробных ценозов для получения промышленно-перспективных штаммов продемонстрирована на примере дрожжей *Exophiala nigra*, синтезирующей меланины (рис. 4). Эта культура была изолирована в 2004 г. из накипных лишайников на скалах полигона (о. Галиндез) и хранится в УСМ. Установлено, что *Exophiala nigra* обладает рядом уникальных свойств: устойчивостью к токсичным металлам (250 мг/л Ni²⁺ и 1000 мг/л Co²⁺) и к высоким дозам УФ (600–800 Дж/м²), а меланины обладают выраженными профилактическими свойствами по отношению к ряду заболеваний. Уникальная культура дрожжей *Exophiala nigra* (продуцент меланина) может одновременно использоваться в промышленных технологиях очистки сточных вод от металлов (например, Ni²⁺ и Co²⁺), получения УФ-защитных препаратов, а также создания лекарственных средств с профилактическими свойствами по отношению к язвенно-эрозивным поражениям желудка и предраковым его состояниям.

Выделенные нами экстремофильные микроорганизмы являются перспективными для создания широкого спектра новых биотехнологий. Технологии, основанные на

Conclusion. System study of structure and functions of Antarctic microbial communities has shown their high adaptation degree to extreme factors. The collection of the Antarctic microorganisms, resistant to extreme factors is developed. The collection includes microorganisms resistant to high UV radiation level (up to 500-1500 J/m²), isolates resistant to a wide spectrum of the most toxic metals (Hg²⁺, Cu²⁺, Cr(VI), Co²⁺, Cd²⁺ and Ni²⁺) in concentrations 5x10²-6x10⁴ ppm, cryoprotector-producing bacteria, isolates that are producers of biologically active substances (melanins, carotins, antibiotics).

Efficiency of the system approach concerning structure and function of Antarctic microbial communities for obtaining industrial perspective strains is demonstrated on the example of melanin-producing *Exophiala nigra* (Figure 4). This strain has been isolated in 2004 rock sample colonized by lichens (island Galindez) and deposited to UCM. It is established that *Exophiala nigra* possesses a wide range of unique properties: resistance to toxic metals (250 ppm Ni²⁺ and 1000 ppm Co²⁺) and high resistance to UV radiation level (600-800 J/m²), extracted melanins have a pronounced preventive and curative properties in relation to the ulcer-erosive lesions of the stomach and precancerous conditions of it. The unique yeast isolate *Exophiala nigra* (a melanin producer) can simultaneously be used for sewage treatment (for example, Ni²⁺ and Co²⁺), UV-protective preparations, creation of medicines with preventive properties in relation to the ulcer-erosive lesions of the stomach and precancerous.

Isolated extremophilic microorganisms are perspective for a wide spectrum of new biotechnologies designing. Biotechnologies based on microbial mobilisation of insoluble

микробной мобилизации нерастворимых форм металлов, эффективны для повышения их извлечения из пород в горной промышленности, в биоремедиации. Иммуобилизация перспективна в биотехнологиях очистки сточных вод, биоремедиации природных и техногенных водоемов. Антарктические микроорганизмы могут использоваться для получения новых антибиотиков, а устойчивые к антибиотикам штаммы – для тестирования эффективности действия новых антимикробных препаратов. Из метилотрофов могут быть получены промышленно-значимые криопротекторы, а пигментированные микроорганизмы являются перспективными продуцентами биологически-активных веществ (меланины, каротины и др.).

metal compounds are effective for increase of their extraction in the mining industry, and in bioremediation. Immobilization abilities can be applied in metal-containing sewage treatment. The Antarctic microorganisms can be used for new antibiotics production, antibiotic-resistant strains as test-cultures for studying efficiency of new antimicrobial preparations. Methylotrophic bacteria are perspective cryoprotector producers, pigmented microorganisms – as biologically-active substances producers (melanins, carotins, etc).

References

1. **Bainbridge B.W., Bull A.T., Pirt S.J. et al.** Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolizing cultures of *Aspergillus nidulans* // *Trans. Brit. Soc.* – 1971. – 56. – P. 371–385.
2. **Beregova T.V., L.I. Ostapchenko, Tsyryuk O.I. et al.** Probiotic is preventive agent against structural and functional changes in stomach evoked by long-term reduction of gastric acid secretion // *Gut.* – 2009. – 58, Suppl. II. – P. 124–125.
3. **Bowman J.P., L.I. Sly, Hayward A.C.** Patterns of tolerance to heavy metals among methane-utilizing bacteria // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1990. – 10. – P. 85–87.
4. **Brhynchildsen L., B.V. Lundgren, B. Allard et al.** Effects of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury, and zinc toxicity to a *Klebsiella* sp. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – 54. – P. 1689–1693.
5. **Dighton J., T. Tugay, Zhdanova N.** Fungi and ionizing radiation from radionuclides // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2008. – N 281. – P. 109–120.
6. **Gerhard F. (ed.)** Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC 200006, 1981.
7. **Ghosh U.H., Shild H.O.** Continuous recording of acid secretion in the rat // *British J. Pharm. Chemotherapy.* – 1958. – 13. – P. 54–61.
8. **Green L., A. David, Glogowski J.** Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids // *Annal. Biochem.* – 1982. – 126. – P. 131–138.
9. **Iutynska G.O., Tashyreva G.O.** Microbial communities of soil-like substrate of Antarctic island Galindez // *Мікробіологічний Журнал.* – 2008. – 70, № 5. – P. 3–8 (in Ukrainian: *Іутинська Г.О., Таширева Г.О.* Мікробні угруповання ґрунто-субстратів антарктичного острова Галіндез // *Мікробіол. журнал.* – 2008. – 70, № 5. – С. 3–8).
10. **Kotsoflyak O.I., Reva O.N., Tashyrev O.B.** Taxonomy and antagonistic properties of antarctic fluorescent bacteria of *Pseudomonas* genus // *Мікробіологічний Журнал.* – 2004. – 66, № 2. – P. 3–10 (in Ukrainian: *Коцофляк О.І., Рева О.М., Таширев О.Б.* Таксономічний склад та антагоністичні властивості антарктичних флуоресціюючих бактерій роду *Pseudomonas* // *Мікробіол. журнал.* – 2004. – 66, № 2. – С. 3–10).
11. **Kumar N.C, Ramachandra R.T.K.** Effect of cadmium on microorganisms and microbe-mediated mineralization process in the soil // *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.* – 1988. – 41. – P. 657–663.
12. **Lindow E.** The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants // *Ann. Rew. Phytopathol.* – 1983. – 21. – P. 363–384.
13. **Meynell G., Meynell E.** Theory and Practice in Experimental Bacteriology / Cambridge: At the University Press. 1965.
14. **Negoita T. Gh., Bahrim G.** Antarctic bacteria as good producers of industrial interest enzymes // *CIENCIA/SANTAR07/CD/TAPA. HTM, CVRE408, 2007, ISSN 1851-555X*
15. **Negoita T. Gh., Bahrim G., Cotarlet M. et al.** Microbiological study of Grove Mountains soils, East Antarctica // *SCAR/IASC/IPY Open Science Conference. St. Petersburg, 2008, S5.2/O02.* P. 442.
16. **Romanovskaya V.A., Sokolov I.G., Malashenko Y.R. et al.** Mutability of epiphytic and soil bacteria of genus *Methylobacterium* and their resistance to UV and nuclear radiation // *Мікробіологія.* – 1998. – Т. 67, № 1. – P. 106–115 (in Russian: *Романовская В.А., Соколов И.Г., Малащенко Ю.Р. и др.* Мутабельность эпифитных и почвенных бактерий рода *Methylobacterium* и их резистентность к УФ и ионизирующему излучению // *Микробиология.* – 1998. – Т. 67, № 1. – С. 106–115).

17. **Romanovskaya V.A., Stoliar S.M., Malashenko Y.R. et al.** Processes of plant colonization by *Methylobacterium* strains and some bacterial properties // *Mikrobiologiya* – 2001. – 70, № 2. – P. 263–269 (in Russian: Романовская В.А., Столяр С.М., Малашенко Ю.Р. и др. Пути колонизации растений штаммами *Methylobacterium* и их некоторые свойства // *Микробиология*. – 2001. – 70, № 2. – С. 263–269).

18. **Romanovskaya V.A., Rokitko P.V., Shylin S.O. et al.** Identification of *Methylobacterium* strains using sequence analysis of 16S rRNA genes // *Mikrobiologiya*. – 2004. – 73, № 6. – P. 846–848. (in Russian: Романовская В.А., Рокитко П.В., Шилин С.О. и др. Идентификация штаммов *Methylobacterium* с использованием сиквенс-анализа генов 16S рРНК // *Микробиология*. – 2004. – 73, № 6. – С. 846–848).

19. **Ruban E.L., Layh S.P., Hruleva I.M. et al.** Melanin pigments *Nadsoniella nigra* // *Proceedings Acad. Sci. USSR, Ser. Biol.* – 1969. – № 1-3. – P. 134–148 (in Russian: Рубан Е.Л., Лях С.П., Хрулева И.М. и др. Меланиновые пигменты *Nadsoniella nigra* // *Известия АН СССР. Сер. Биол.* – 1969. – № 1-3. – С. 134–148).

20. **Tashyrev O.B., N.A. Matvieieva, V.A. Romanovskaya et al.** Polyresistance and superresistance of Antarctic microorganisms to heavy metals, *Reports of Nat. Acad. Sci. of Ukraine*, 11 (2007), pp. 170–175 (in Russian: Ташырев А.Б., Матвеева Н.А., Романовская В.А. и др. Полирезистентность и сверхустойчивость к тяжёлым металлам антарктических микроорганизмов // *Доповіді НАН України*. – 2007. – № 11. – С. 170–175).

21. **Tashyrev O.B., V.A. Romanovskaya, I.B. Sioma et al.** Antarctic microorganisms resistant to high concentration of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} and CrO_4^{2-} // *Reports of Nat. Acad. Sci. of Ukraine*. – 2008. – № 1. – P. 169–176 (in Russian: Ташырев А.Б., Романовская В.А., Сиома И.А. и др. Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и CrO_4^{2-} // *Доповіді НАН України*. – 2008. – № 1. – С. 169–176).

22. **Tashyrev O.B., E.V. Galinker, Andreyuk E.I.** Thermodynamic forecasting of redox-interaction of microorganisms with metals-oxidizers (Hg^{2+} , CrO_4^{2-} and Cu^{2+}) // *Reports of Nat. Acad. Sci. of Ukraine*. – 2008. – № 4. – P. 166–172 (in Russian: Ташырев А.Б., Галинкер Э.В., Андreyuk Е.И. Термодинамическое прогнозирование редокс-взаимодействия микроорганизмов с металлами-окислителями (Hg^{2+} , CrO_4^{2-} и Cu^{2+}) // *Доповіді НАН України*. – 2008. – № 4. – С. 166–172).

23. **Tashyrev O.B., N.A. Matvieieva, Tashyreva G.O. et al.** Experimental substantiation of thermodynamic prognosis of redox-interaction microorganisms with metals-oxidizers (Hg^{2+} , CrO_4^{2-} and Cu^{2+}). *Reports of Nat. Acad. Sci. of Ukraine*. – 2008. – № 5. – P. 174–180 (in Russian: Ташырев А.Б., Матвеева Н.А., Ташырева А.А. и др. // Экспериментальное обоснование термодинамического прогнозирования редокс-взаимодействия микроорганизмов с металлами-окислителями (Hg^{2+} , CrO_4^{2-} и Cu^{2+}) // *Доповіді НАН України*. – 2008. – № 5. – С. 174–180).

24. **Tashyrev O.B.** Complex researches of structure and function of Antarctic terrestrial microbial communities // *Ukrainian Antarctic Journal (ISSN 1727-7485)*. – 2009. – N 8. – P. 228–242.

25. **Tsyrjuk O., Radchuk O., Beregova T.** The influence of multiprobiotic "SYMBITER® ACIDOPHILIC" on structurally functional state of gastric mucosa in omeprazole-treated rats // *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska (Lublin-Polonia)*. – 2008. – 21. – P. 257–260.

26. **Zhdanova N., Tugay T., Dighton J. et al.** Ionizing radiation attracts soil fungi // *Mycol. Res.* – 2004. – N 108. – P. 1089–1096.