

УДК 577.3;582.284

## ДЕЙСТВИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ СВЕЯЩИХСЯ ГРИБОВ

© 2011 г. Г. А. Выдрякова, А. А. Гусев, С. Е. Медведева

Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036

e-mail: vydryakova@mail.ru

Поступила в редакцию 17.11.2009 г.

Оценена возможность создания твердофазного биолюминесцентного биотеста с использованием светящегося воздушного мицелия грибов. Исследовано действие органических и неорганических токсических веществ (ТВ) в концентрациях от  $10^{-6}$  до 1 мг/мл на свечение воздушного мицелия культур 4 видов светящихся грибов: *Armillaria borealis* (Коллекция культур ИЛ СО РАН), *A. mellea*, *A. gallica* и *Lampteromyces japonicus* (Коллекция грибов БИН РАН). Наиболее чувствительной к действию растворов модельных ТВ оказалась культура *A. mellea*. Показано, что чувствительность светящихся грибов сравнима с таковой светящихся бактерий, используемых для мониторинга окружающей среды. Использование в качестве тест-объекта светящегося воздушного грибного мицелия на твердофазном носителе является перспективным направлением биотестирования для создания биосенсоров с целью непрерывного мониторинга воздушной среды.

Биолюминесцентный анализ — один из возможных экспресс-методов мониторинга окружающей среды, обнаружения токсических веществ (ТВ) как органических, так и неорганических, включая тяжелые металлы. Наибольшее применение в биолюминесцентном анализе нашли светящиеся бактерии. Ингибирование свечения бактерий ТВ служит основой большинства биолюминесцентных биотестов, среди которых наиболее популярными являются лиофилизированные светящиеся бактерии в качестве тест-объектов благодаря их высокой чувствительности к микроколичествам токсических веществ и простоте использования [1–5]. Большое распространение в биолюминесцентном анализе получили генетически модифицированные бактерии, несущие *lux*-гены светящихся бактерий и других светящихся организмов [5–7]. Однако с помощью бактериальных биотестов не всегда можно оценить воздействие веществ на эукариотические организмы и обнаружить ТВ в воздушной среде. Разработка и использование биотестов более высоко организованных организмов (дрожжи, черви, грибы), несущих гены люминесцентной системы, открывает новые перспективы развития биолюминесцентного анализа.

В последние годы наблюдается увеличение количества исследований, посвященных изучению светящихся грибов благодаря возможности их использования в биолюминесцентном анализе. Количество известных светящихся грибов [8–10] неуклонно растет в связи с обнаружением новых видов [11, 12]. К настоящему времени насчитывается

83 вида светящихся грибов [13], в то время как среди бактерий известно лишь 17 [14]. Светящиеся грибы всех известных видов испускают голубовато-зеленый свет с максимумом около 530 нм [15]. Грибы в зависимости от видовой принадлежности светятся в широком диапазоне температур: от 4 до 50°C [16]. На агаризованных средах и на древесине свечение мицелия может длиться от нескольких дней до нескольких недель в зависимости от вида гриба.

Длительное свечение грибов в широком температурном диапазоне, наличие воздушного мицелия делают перспективным создание на их основе новых биолюминесцентных биотестов непрерывного действия, которые могут быть использованы для обнаружения токсичности, в том числе и в воздушной среде.

Цель работы — сравнение действия токсических веществ (ТВ) органической и неорганической природы на уровень свечения воздушного мицелия культур *Armillaria borealis*, *A. mellea*, *A. gallica* и *Lampteromyces japonicus*.

### МЕТОДИКА

Объектами исследования были культуры грибов, имеющие светящийся мицелий: *Armillaria mellea*, *A. gallica* и *Lampteromyces japonicus* из Коллекции культур базидиомицетов ЛЕ(БИН) Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН и *A. borealis* из рабочей коллекции культур Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (табл. 1).

Таблица 1. Культуры грибов, использованные в экспериментах

Культура	Штамм, № в коллекции	Место и год выделения	Коллекция грибов
<i>Armillaria gallica</i> (Vahl.) P. Kumm.	1043	Центральный Урал, Пермская обл., 1993	ЛЕ(БИН)
<i>A. mellea</i> (Vahl.) P. Kumm., s.l.	0356	Минская область, Беларусь, 1970	»
<i>Lampteromyces japonicus</i> (Kawam.) Singer	491	Великобритания, 1947	»
<i>A. borealis</i> (Marxm. & Korhonen)	3к-4	Красноярский край, 2007	Рабочая коллекция ИЛ СО РАН

Таблица 2. Величина остаточной люминесценции (%) по истечении 3 мин после добавления токсичного вещества

Вещество	Концентрация, мг/мл						
	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Бензохинон	27	35	42	63	65	74	79
CuSO <sub>4</sub>	33	52	58	88	67	81	85

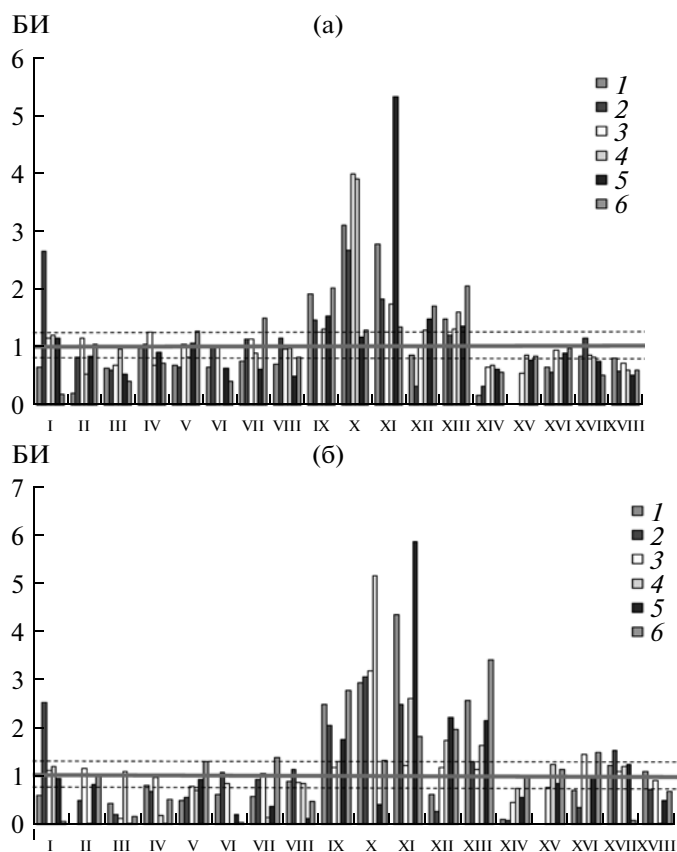
В качестве модельных ТВ использовали водные растворы солей, в том числе тяжелых металлов: Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, CrSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CsCl, CdSO<sub>4</sub>, SnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, ацетата свинца [Pb(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], а также бензохинона (БХ), фенантренхинона (ФАХ), 5-амино-2-3 дигидро-1,4-фталазиндиона (А-ДХ-ФД) и 1,2-нафтохинон-4-сульфоновой кислоты (НХ-СК) в концентрациях 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-1</sup>, и 1 мг/мл. Токсичность исследуемых растворов оценивали по величине биолюминесцентного индекса (БИ), который рассчитывали по формуле:  $БИ = I_0/I_k$ , где  $I_0$  – нормированное относительно исходного значения интенсивности свечения грибного мицелия в опыте,  $I_k$  – нормированное относительно исходного значения интенсивности люминесценции грибного мицелия в контроле.

Культуры выращивали на агаризованной среде Сабуро (40 г глюкозы, 10 г пептона, 15 г агар-агара на 1 л дистиллированной воды) при комнатной температуре. Эксперименты по действию ТВ проводили при наличии видимого свечения мицелия. Интенсивность свечения измеряли на планшетном люминометре Luminoscan Ascent (“ThermoElectron Co”, Финляндия). Блоки агаризованной среды площадью около 3 × 3 мм<sup>2</sup> с растущей светящейся культурой грибов помещали в лунки планшета (куда

предварительно для предотвращения высыхания агара вносили 50 мкл стерильной дистиллированной воды) и измеряли исходную интенсивность люминесценции. После добавления 200 мкл исследуемого вещества в лунки с культурой повторно измеряли люминесценцию через 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин. В контрольные варианты вносили 200 мкл дистиллированной воды. Нормированные значения рассчитывали по отношению к исходному свечению. Растворы исследуемых веществ считали токсичными, если отклонение величины биолюминесцентного индекса опыта от 1 (биолюминесцентный индекс контроля) превышало 20%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительно нами был проведен эксперимент по кратковременному воздействию (3 мин) растворов CuSO<sub>4</sub> и бензохинона в концентрациях 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-1</sup> и 1 мг/мл на свечение мицелия *A. mellea* (табл. 2). Минимальная концентрация бензохинона (10<sup>-6</sup> мг/мл) вызывала уменьшение уровня свечения на 21% по сравнению с начальным, в то время как 3 мин воздействие бензохинона в концентрации 1 мг/мл вызвало падение уровня люминесценции на 73%. Воздействие раствора CuSO<sub>4</sub> в концентрации 10<sup>-6</sup> мг/мл приводило



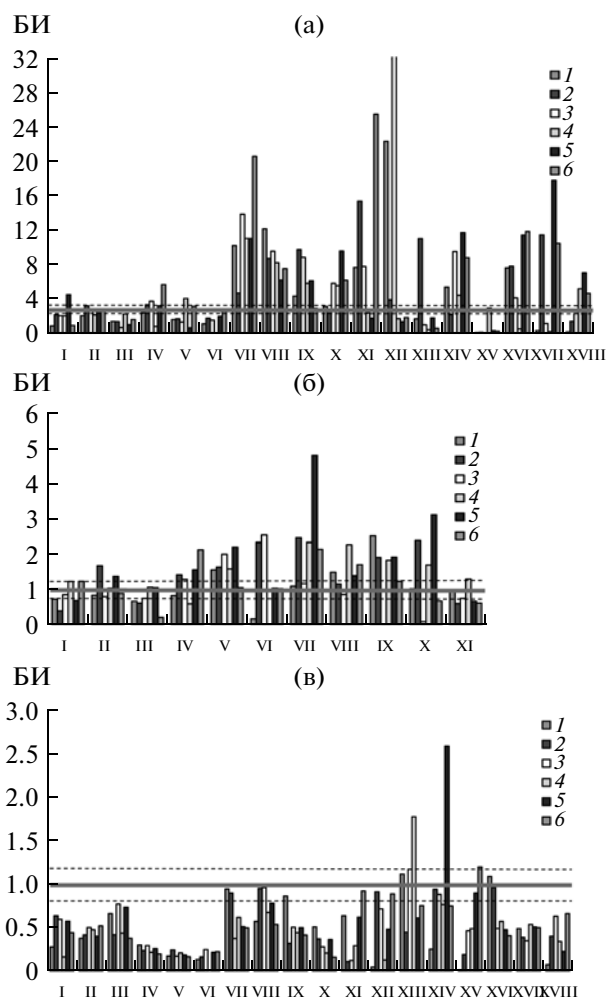
**Рис. 1.** Действие модельных ТВ в течение 5 (а) и 30 мин (б) на свечение воздушного мицелия (БИ) *Armillaria borealis*. (На рис. 1, 2 приводятся нормированные значения свечения. БИ = 1 – биоломинесцентный индекс контроля. Область, ограниченная пунктирными линиями БИ = 0.8–1.2, обозначает зону нетоксичного действия вещества).

I –  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ; II –  $\text{NiSO}_4$ ; III –  $\text{CoCl}_2$ ; IV –  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ ; V –  $\text{CrSO}_4$ ; VI – ацетат свинца, VII –  $\text{ZnSO}_4$ ; VIII –  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ; IX –  $\text{AlCl}_3$ ; X –  $\text{MnCl}_2$ ; XI –  $\text{CsCl}$ ; XII –  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ; XIII –  $\text{SnCl}_2$ ; XIV –  $\text{HgCl}_2$ ; XV – бензохинон, XVI – фенантренхинон; XVII – амино-2-3 дигидро-1,4-фталазиндион; и XVIII – 1,2-нафтохинон-4-сульфоновой кислоты.

Концентрация ТВ (мг/мл): 1 – 1; 2 –  $10^{-1}$ ; 3 –  $10^{-2}$ ; 4 –  $10^{-3}$ ; 5 –  $10^{-4}$ ; 6 –  $10^{-5}$ .

к уменьшению люминесценции на 15%, а в концентрации 1 мг/мл к ее падению на 67% по сравнению с исходным значением.

В последующих экспериментах нами было исследовано действие ряда органических и неорганических веществ в концентрациях от  $10^{-5}$  до 1 мг/мл на свечение исследуемых культур светящихся грибов (рис. 1, 2). В ходе экспериментов было показано, что для определения возможного токсического действия растворов модельных ТВ на свечение грибного мицелия достаточно 5 мин экспозиции. Так, на рис. 1а и 1б приведены данные по определению биоломинесцентного индекса культуры *A. bo-*



**Рис. 2.** Действие модельных ТВ (5 мин) на свечение воздушного мицелия (БИ) *Armillaria mellea* (а), *Lampteromyces japonicus* (б), *A. gallica* (в). Обозначения ТВ и их концентрации аналогичны приведенным на рис. 1.

*realis* при воздействии на нее тестируемых растворов в течение 5 (рис. 1а) и 30 (рис. 1б) мин. Как следует из приведенных на рисунках данных, действие наиболее эффективных токсикантов проявляется уже после 5 мин экспозиции, поэтому в дальнейшем мы не приводим данные, полученные для 10, 15, 20, 25 и 30 мин воздействия исследуемых растворов на культуры светящихся грибов.

Эффект используемых модельных ТВ на люминесценцию грибного мицелия был разнонаправлен и зависел от концентрации тестируемого вещества и видовой принадлежности гриба (рис. 1, 2).

Культура *A. borealis* оказалась чувствительной к действию ионов металлов Mn, Cs, Pb, Cd и Al. Большинство исследованных растворов солей этих металлов разных концентраций стимулировало свечение мицелия данной культуры, а растворы солей

Co, Cr и ацетата свинца в низких концентрациях его ингибировали. Действие растворов органических веществ не было столь выраженным (рис. 1а, 1б).

В случае культуры *A. mellea* наибольший эффект (увеличение уровня свечения в 5 и более раз) наблюдался при действии солей Cd, Zn, Li, Al, Mn, Hg. Таким же явно выраженным был эффект на свечение данной культуры всех использованных в эксперименте органических веществ уже после 5 мин экспозиции (рис. 2а).

Растворы солей Zn, Li, Al, Mn и растворы ацетата свинца стимулировали свечение *L. japonicus* (рис. 2б). В большинстве же случаев для *A. gallica* наблюдалось ингибирование люминесценции как органическими, так и неорганическими ТВ (рис. 2в).

Среди исследованных культур максимальный исходный уровень свечения наблюдался у культуры *A. borealis*. Однако наиболее чувствительной к воздействию модельных ТВ оказалась культура *A. mellea*. В то время как преобладающим ответом культуры *A. mellea* на воздействие ТВ было стимулирование люминесценции, для культуры *A. gallica* наблюдалось ее падение под действием большинства ТВ, а в случае *A. borealis* в равной мере имели место как стимулирование, так и ингибирование свечения.

Стимулирование свечения растворами солей некоторых металлов и отдельными органическими веществами может быть обусловлено особенностями метаболизма грибов. Так, клетками грибов синтезируются ферменты — металлопротеины, в состав которых входят ионы металлов, например марганецзависимые лигнинпероксидазы, а также лакказы и тирозиназы, в состав которых входят одно- и двухвалентные ионы меди, а субстратами являются фенольные соединения [17].

Следует подчеркнуть, что в наших экспериментах был использован грибной мицелий, выращенный на твердой питательной среде, в то время как известные в литературе экспериментальные данные получены с использованием глобулярного мицелия, выращенного в жидкой среде. Светящийся воздушный грибной мицелий на твердофазном носителе представляется более предпочтительным тест-объектом при создании биотеста для определения токсичности в воздушной среде. Однако использование агаровых блоков оказалось не лишено недостатков, поскольку, с одной стороны, в процессе нарезания блоков происходит нарушение структуры мицелия, с другой, — они не могут быть использованы при длительном мониторинге. Поэтому необходим дальнейший поиск возможностей создания твердофазного тест-объекта для разработки биосенсоров с целью определения токсичности не только в водной, но и в воздушной среде.

**Таблица 3.** Чувствительность люминесценции светящихся бактерий и грибов к действию химических веществ, мг/мл

Вещество	Чувствительность бактерий, мг/мл [19]	Чувствительность грибов, мг/мл*
HgCl <sub>2</sub>	$2.7 \times 10^{-8}$	$10^{-5}$
CuSO <sub>4</sub>	$1.2 \times 10^{-2}$	$10^{-4}$ – $10^{-5}$
Ацетат свинца	$10^{-3}$	$10^{-5}$
CoCl <sub>2</sub>	$3 \times 10^{-3}$	$10^{-5}$
MnCl <sub>2</sub>	$5 \times 10^{-2}$	$10^{-3}$ – $10^{-5}$
Бензохинон	$4 \times 10^{-8}$	$10^{-5}$

\* Результаты авторов данной работы.

Тем не менее, как следует из проведенных нами экспериментов, светящийся воздушный мицелий грибов на твердофазном носителе может быть использован в качестве тест-объекта биосенсоров. Более того, по чувствительности к воздействию модельных ТВ мицелиальные культуры исследованных грибов оказались близкими, а в некоторых случаях и более чувствительными по сравнению со светящимися бактериями (табл. 3).

Как известно, лиофилизированные светящиеся бактерии широко используются для обнаружения ТВ в водных источниках [4, 18]. Бактериальный биолюминесцентный биотест позволяет определить присутствие в пробах небольших количеств ТВ (табл. 3).

По полученным нами данным, светящийся грибной мицелий оказался более чувствительным по сравнению со светящимися бактериями к таким ТВ, как CuSO<sub>4</sub>, ацетат свинца, CoCl<sub>2</sub> и MnCl<sub>2</sub> и менее чувствительным к воздействию бензохинона и хлорида ртути. Интересно отметить высокую чувствительность грибного свечения к присутствию солей алюминия и отдельных грибов к растворам солей вольфрама и цинка.

По данным зарубежных исследователей, сравнение чувствительности люминесценции светящихся грибов и рекомбинантных бактериальных биолюминесцентных биотестов к различным ТВ показало, что культура грибов *A. mellea* была более чувствительной к меди, чем бактериальные культуры *Pseudomonas fluorescence* 8866 и *Pseudomonas putida* F1, в то время как культура гриба *Mycena citricolor* оказалась менее чувствительной к этому ТВ [20, 21].

В настоящее время несколькими исследовательскими группами в мире предпринимаются попытки

создания биосенсоров на основе светящихся грибов. Так, бразильские исследователи использовали новый вид светящихся грибов *Gerronema viridilucens* в качестве тест-объекта биосенсора [22]. Светящийся глобулярный мицелий *A. mellea* и *M. citricolor* был использован в качестве тест-объектов британскими и новозеландскими исследователями [20–23]. При использовании биотестов на основе светящихся грибов для определения токсичности фенолов и солей тяжелых металлов показано, что для светящихся грибов падение люминесценции на 50% (EC<sub>50</sub>) после действия фенолов и меди было того же порядка, что и для бактериальных биотестов [23]. Известны успешные попытки получить рекомбинантные светящиеся грибы *Neurospora* sp., and *Aspergillus* sp., содержащие гены люциферазы веслоногого рачка рода *Gaussia* и фотопротеина обелина для создания биосенсора [24]. Генетически модифицированные биолюминесцентные грибы *A. awamori* с геном рекомбинантного экворина были использованы для определения изменения концентрации ионов кальция под воздействием различных ТВ [25].

Таким образом, проведенные нами эксперименты показали, что воздушный мицелий светящихся грибов может быть использован в качестве тест-объекта биосенсора при соответствующей адаптации к условиям измерений. Для экспресс-тестирования достаточно воздействия ТВ на светящийся мицелий в течение 5 мин. Результаты наших экспериментов подтвердили и дополнили имеющиеся в литературе данные о том, что светящиеся грибы не уступают клеткам светящихся бактерий по чувствительности к воздействию модельных токсических веществ. Использование в качестве тест-объекта светящегося грибного мицелия на твердофазном носителе является перспективным направлением биотестирования, так как позволит использовать длительно светящийся тест-объект и проводить непрерывный мониторинг воздушной среды.

Авторы признательны сотрудникам Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН Псурцевой Н.В. и Беловой Н.В., а также Пашеновой Н.В. (Институт леса СО РАН) за предоставление культур светящихся грибов для проведения исследований.

Работа выполнена при частичной поддержке ФЦП (Государственный контракт № 02.512.11.2008).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E. // *Luminescence*. 1999. V. 14. № 5. P. 263–265.
2. Gellert G. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2000. V. 45. № 1. P. 87–91.
3. Ulitzur S., Lahav T., Ulitzur N. // *Environ. Toxicol.* 2002. V. 17. № 3. P. 291–296.
4. Родичева Э.К., Кузнецов А.М., Медведева С.Е. // *Вестник ОГУ*. 2004. Т. 5. С. 96–100.
5. Girotti S., Ferri E.N., Fumo M.G., Maiolin E. // *Anal. Chim. Acta*. 2008. V. 608. № 1. P. 2–29.
6. Bechor O., Smulski D.R., Van Dyk T.K., LaRossa R.A., Belkin S. // *J. Biotechnol.* 2002. V. 94. № 1. P. 125–132.
7. Roda A., Pasini P., Mirasoli M., Michelini E., Guardigli M. // *TRENDS in Biotechnol.* 2004. V. 22. № 6. P. 295–303.
8. Wassink E.C. // *Bioluminescence in Action* / Ed. Herring P.J. London: Acad. Press, 1978. P. 171–197.
9. Herring P.J. // *Mycologist*. 1994. V. 8. № 4. P. 181–183.
10. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. N.Y.: World Sci. Publ. Co., 2006. 470 p.
11. Desjardin D.E., Capelari M., Stevani C.V. // *Mycologia*. 2007. V. 99. № 2. P. 317–331.
12. Desjardin D.E., Oliveira A.G., Stevani C.V. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. V. 7. № 2. P. 170–182.
13. Выдрякова Г.А., Псурцева Н.В., Белова Н.В., Пашенова Н.В., Гумельзон И.И. // *Микология и фитопатология*. 2009. Т. 43. № 5. С. 369–376.
14. Dunlap P.V., Kita-Tsakamoto K. *Luminous Bacteria* // *The Prokaryotes*, Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York, USA: Acad. Press, 2006. V. 2. P. 863–892.
15. O’Kane D.J., Lingle W.L., Porter D., Wampler J.E. // *Mycologia*. 1990. V. 82. № 5. P. 607–616.
16. Ячевский А.А. *Основы микологии* / Ред. Н.А. Наумов. М.-Л.: Ленсельхозгиз, 1933. 1035 с.
17. Decker H., Terwilliger N. // *J. Exp. Biol.* 2000. V. 203. № 12. P. 1777–1782.
18. Stom D.I., Geel T.A., Balayan A.E., Shachova G.I., Kuznetsov A.M., Medvedeva S.E. // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1992. V. 2. P. 203–208.
19. Родичева Э.К., Выдрякова Г.А., Медведева С.Е. *Каталог культур светящихся бактерий*. Новосибирск: Наука, 1997. 125 с.
20. Horswell J., Weitz H.J., Percival H.J., Speir T.W. // *Biol. Fertil. Soils*. 2006. V. 42. P. 569–576.
21. Weitz H.J., Colin D., Campbell C.D., Killham K. // *Environ. Microbiol.* 2002. V. 4. № 7. P. 422–429.
22. Mendes L., Prada S., Stevani C. // *Proceedings of the SET-AC 26th Annual Meeting in North America (USA)*. 2005. <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/setac2005/document/57331>
23. Paton G.I., Viventsova E., Kumpene J., Wilson M.J., Weitz H.J., Dawson J.J. // *Sci. Total. Environ.* 2006. V. 355. № 1–3. P. 106–117.
24. Патент Великобритании. 2004. № WO/2004/076685.
25. Kozlova O., Zwinderman M., Christofi N. // *BMC Microbiol.* 2005. V. 5. № 40. doi: 10.1186/1471-2180-5-40.

## Effect of Organic and Inorganic Toxic Compounds on Luminescence of Luminous Fungi

G. A. Vydryakova, A. A. Gusev, and S. E. Medvedeva

*Institute of Biophysics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

*e-mail: vydryakova@mail.ru*

Received November 17, 2009

**Abstract**—The possibility of the development of the solid phase bioluminescent biotest using aerial mycelium of the luminous fungi was investigated. Effect of organic and inorganic toxic compounds (TC) at concentrations from  $10^{-6}$  to 1 mg/ml on luminescence of aerial mycelia of four species of luminous fungi—*Armillaria borealis* (Culture Collection of the Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences), *A. mellea*, *A. gallica*, and *Lampteromyces japonicus* (Fungi Collection of the Botanical Institute, Russian Academy of Sciences)—has been studied. Culture of *A. mellea* was shown to be most sensitive to solutions of the model TC. It was demonstrated that the sensitivity of the luminous fungi is comparable with the sensitivity of the bacteria that are used for environmental monitoring. Use of the aerial mycelium of the luminous fungi on the solid support as a test object is a promising approach in biotesting for the development of continuous biosensors for air monitoring.