

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	СПОРЫ ГРИБОВ: ПОКОЙ, ПРОРАСТАНИЕ, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР) Феофилова Е.П., Ивашечкин А.А., Алёхин А.И., Сергеева Я.Э.	5	0
<input type="checkbox"/>	ЦИКЛИЧЕСКАЯ ДИГЕННАЯ СИСТЕМА КАК УПРАВЛЯЮЩИЙ ЭЛЕМЕНТ БАКТЕРИАЛЬНОГО БИОСЕНСОРА Ступак Е.Э., Ступак И.В.	18	1
<input type="checkbox"/>	ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА MN-ПЕРОКСИДАЗЫ AZOSPIRILLUM BRASILENSESP245 Купряшина М.А., Селиванов Н.Ю., Никитина В.Е.	23	1
<input type="checkbox"/>	ДЕТОКСИКАЦИЯ БАКТЕРИЯМИ ТРИНИТРОТОЛУОЛА В ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ Соляникова И.П., Баскунов Б.П., Бабошин М.А., Саралов А.И., Головлёва Л.А.	27	0
<input type="checkbox"/>	БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ПОЧВЕННЫМИ МИКРОБИОЦЕНОЗАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ И ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ Бояндин А.Н., Прудникова С.В., Филипенко М.Л., Храпов Е.А., Васильев А.Д., Волова Т.Г.	35	9
<input type="checkbox"/>	DEGRADATION OF POLYISOPRENE RUBBER BY NEWLY ISOLATED BACILLUS SP. AF-666 FROM SOIL Shah A.A., Hasan F., Shah Z., Mutiullah, Hameed A.	45	0
<input type="checkbox"/>	ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FLUORIDE RESISTANT BACTERIA: POSSIBLE ROLE IN BIOREMEDIATION Chouhan S., Tuteja U., Flora S.J.S.	51	0
<input type="checkbox"/>	CHARACTERIZATION OF THE FUNGICIDAL ACTIVITY OF CALOTHRIX ELENKINI USING CHEMICAL METHODS AND MICROSCOPY Natarajan C., Prasanna R., Gupta V., Dureja P., Nain L.	59	0
<input type="checkbox"/>	ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ PENICILLIUM CANESCENS С ВЫСОКОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К ГИДРОЛИЗУ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ Волков П.В., Рожкова А.М., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Доценко Г.С., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Зоров И.Н., Синицын А.П.	66	7
<input type="checkbox"/>	РАЗВЕТВЛЕННЫЙ ГЛЮКАН ПЛОДОВЫХ ТЕЛ RIPTOPORUS BETULINUS(BULL.:FR.) KARST Оленников Д.Н., Агафонова С.В., Рохин А.В., Пензина Т.А., Боровский Г.Б.	74	1
<input type="checkbox"/>	ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ МИКРОМИЦЕТОВ В СОСТАВЕ ЛИШАЙНИКОВЫХ ВЕЩЕСТВ Кононенко Г.П., Буркин А.А., Толпышева Т.Ю.	81	9
<input type="checkbox"/>	ЛИПОКСИГЕНАЗА ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ, ВЫРАЩЕННОЙ В УСЛОВИЯХ РАЗНОГО ВОДОБЕСПЕЧЕНИЯ Пермякова М.Д., Пермяков А.В., Осипова С.В., Пшеничникова Т.А.	88	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА ГЕНЕРАЦИЮ ОКСИДА АЗОТА (NO) В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В.	95	3
<input type="checkbox"/>	УЧАСТИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ОКСИДА АЗОТА В ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЯХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ Гильванова И.Р., Еникеев А.Р., Степанов С.Ю., Рахманкулова З.Ф.	103	1
<input type="checkbox"/>	ЭЛИСИТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА И АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ: СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЕ Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Чаленко Г.И., Озерецковская О.Л.	109	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СМЕСЕЙ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА ИХ АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Фаткуллина Л.Д., Воробьёва А.К., Медведева И.Б., Бурлакова Е.Б.	117	5
ХРОНИКА			
<input type="checkbox"/>	МЕЖДУНАРОДНЫЙ СЕМИНАР "ПУТИ СНИЖЕНИЯ КОНТАМИНАЦИИ МИКОТОКСИНАМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ В РОССИИ И ЕС: СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ" Омельченко М.Д., Жердев А.В.	124	0

УДК 582.281.213

СПОРЫ ГРИБОВ: ПОКОЙ, ПРОРАСТАНИЕ, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)

© 2012 г. Е. П. Феофилова*, А. А. Ивашечкин**, А. И. Алёхин***, Я. Э. Сергеева*

* Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, 117312

e-mail: biolog1@migmail.ru

** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991

*** Центральная клиническая больница РАН, Москва, 117593

Поступила в редакцию 31.03.2011 г.

Обзор посвящен одной из стадий онтогенеза, отличающейся особой устойчивостью к действию неблагоприятных факторов и способностью длительное время сохранять геномный материал — спорам грибов. Основная часть посвящена характеристике особого состояния, свойственного споре, и называемого покоем. Приводятся данные, характеризующие углеводный и липидный состав спор, основное внимание уделяется роли углеводных протекторов, в частности трегалозе и манниту, а также роли рафтов в процессе спорогенеза. Обсуждается роль специальных соединений, называемых аутоингибиторами и аутостимуляторами, в процессе выхода спор из состояния покоя. Заключительная часть посвящена роли спорового посевного материала в биотехнологических процессах. Рассматриваются данные о взаимосвязи химического состава спор с их способностью к сохранению покоя и процессом прорастания. Впервые приводятся специальные биотехнологические приемы, позволяющие путем воздействия на споровый материал, сохранять его всхожесть, интенсифицировать спорогенез, изменять соотношение конечных продуктов ферментации и увеличивать их выход.

Особая форма жизни — спора интенсивно исследуется в настоящее время не только биологами и медиками, но уже давно изучается в связи с представлениями о внеземном происхождении жизни, теорией “вихревых космических туманностей” [1], в которых жизнь, возможно, сохраняется в космосе. Действительно, среди известных организмов эту загадочную форму жизни, благодаря необычной устойчивости к действию неблагоприятных факторов, особому химическому составу и способности длительное время находиться в состоянии, которое определяют как “ни жизнь, но и не смерть”, можно считать лучшим кандидатом, возможно, давшим начало всему живому на планете Земля.

Споры бактерий начали изучаться значительно раньше грибных спор — почти 140 лет тому назад [2]. Интенсивному исследованию спор грибов способствовала работа [3], в которой впервые у грибов подробно рассматривалось состояние, названное покоем [4]. Изучение покоя грибов (гипобиоза), отличающегося по глубине торможения активного метаболизма от анабиоза, значительно расширило наши представления о формах латентной жизни.

Дальнейший интерес к изучению спор грибов и феномену покоя был тесно связан с началом развития биотехнологии (80 годы прошлого столетия), когда было накоплено много данных о том, что состояние спорового посевного матери-

ала является одним из ключевых факторов, влияющих на стабильность ферментаций и выход конечного продукта [5].

Необходимость написания настоящей обзорной работы диктовалась тем, что основные исследования по изучению покоя проводились на прокариотах и растениях, что было связано с исследованием микроорганизмов в глубоководных породах, существованием устойчивых к антибиотикам клеток-персисторов, а также с сохранением семян растительного фонда [6–10]. Покой грибов начал изучаться наиболее интенсивно в начале 21 века [11–13], что было связано с все возрастающей ролью грибов в медицине, пищевых производствах и сельском хозяйстве. Однако существующие работы практически не касаются изменений химического состава клеток грибов при переходе в состояние покоя, в частности в липидном бислое, протекторных углеводах, гормонах, ауторегуляторах. Накопленные данные помогут использовать их в биотехнологии в виде специальных приемов для сохранения полноценного спорового материала и контроля выхода конечного продукта.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПОКОЕ ГРИБНЫХ СПОР

Еще в прошлом веке известный врач Ганс Селье писал, что приспособление к условиям среды является наиболее отличительной чертой жизни.

В настоящее время возникло целое научное направление, которое изучает механизмы, позволяющие организмам адаптироваться к неблагоприятным воздействиям, получившее название “биохимической адаптации”. Впервые три основных типа биохимической адаптации к окружающим условиям были сформулированы еще в 1977 г. [14]: это — изменение макромолекул и их концентрации, а также адаптивная регуляция функции макромолекул. С помощью одного из указанных механизмов или их комбинации организм достигает векторного гомеостаза метаболических функций. Употребление термина “векторный гомеостаз” означает, что в результате изменения метаболизма, вызванного стрессовым воздействием, система способна обеспечить поддержание жизни. В случае очень резкого внешнего воздействия, например голода или изменения температуры, организм практически полностью использует все возможные системы биохимической адаптации, при этом в зависимости от фазы развития грибов изменение метаболизма может сопровождаться резким падением его уровня и интенсивности.

Состояние организма, получившее название покоя, является наиболее совершенным особым состоянием, обеспечивающим сохранение жизни в условиях действия неблагоприятных факторов. Покой отличается от других форм адаптации тем, что он сопровождается у ряда организмов не только метаболическими, но и одновременно резкими морфологическими изменениями. При этом у грибов происходит образование специализированных клеток — спор, которые называют “покоящимися” или “спящими” клетками. Программа генной экспрессии при спорообразовании находится под контролем четырех σ -факторов, являющихся субъединицами РНК-полимеразы [6]. Сам процесс спорообразования можно представить как стратегию, свойственную многим организмам, принадлежащим к растениям, животным и прокариотам, позволяющую сохранить геномный материал (genomic safe house) [15].

Состояние покоя тесно связано со стадиями развития организма и может наступить при действии стрессора только, если организм достиг определенной стадии компетентности. Это означает, что, если неблагоприятный фактор действует, например, на активно растущий мицелий грибов в стадии трофофазы, то последний не сможет перейти в стадию покоя. Но это возможно, когда организм уже достиг стадии идиофазы, во время которой происходит постепенное истощение питательных веществ и начинаются процессы вторичного метаболизма. Вероятно, последний процесс тесно взаимосвязан с наступлением состояния покоя, так как именно в это время происходит образование специфических для покоя соединений. У мукоровых грибов, например, начинается синтез каротиноидов, которые являются предше-

ственными спорополленина — продукта окислительной полимеризации каротина, входящего в состав клеточной стенки споры и защищающего ее от действия химических соединений и литических ферментов.

Формы покоя отличаются разнообразием, например, для животных, таких, как насекомые и птицы, период покоя носит название диапаузы или гибернации, и не может продолжаться так долго, как, например, у грибов и бактерий, но имеет существенное значение, так как позволяет выжить в течение краткосрочного периода действия низких температур или голода [16]. Интересно, что у семян существуют два типа покоя — при появлении влажности покой у одного типа семян нарушается, другие семена сохраняют это состояние и в присутствии воды. Наличие нескольких типов покоя, которые мы ниже рассмотрим для грибов, представляется нам очень существенным механизмом адаптации, расширяющим возможности выживания вида. Наконец, значение покоя как формы адаптации состоит еще и в том, что в этот период происходит резкое увеличение устойчивости организмов к действию неблагоприятных факторов. Например, сухие личинки жуков могут переносить нагревание до 100 градусов без потери жизнеспособности. Спорангиоспоры мукорового гриба *Blakeslea trispora* выдерживают нагревание до 60–70°C и не теряют способности к прорастанию [17–18]. Часть конидий *Aspergillus niger* выдерживает автоклавирование при 1 атмосфере и сохраняет всхожесть, хотя образование ростковых трубок задерживается на 18–20 ч.

Практически все грибы, за исключением нескольких стерильных видов, способны при действии стрессоров переходить в состояние покоя и образовывать споры. При этом покой грибов отличается от покоя бактерий и растений. Во-первых, это не анабиоз (аметаболизм, абиоз, ангидробиозис, скрытая жизнь), а гипометаболизм, и по номенклатуре метаболических состояний, предложенной в работах [19–20], ослабление метаболизма у грибов в период покоя не превышает 50%. Во-вторых, у грибов существует несколько типов покоя, причем основными являются два типа — конститутивный и экзогенный.

Первый тип покоя грибов (глубокий покой, конститутивный, эндогенный). Данный тип покоя имеет сложную систему регуляции процессов прорастания и ее называют “цитоплазматической регуляцией”, так как в этом случае сигнал к возобновлению ростовых процессов происходит и в отсутствие ядра [21]. Существуют два строго регулируемых процесса, которые можно наблюдать и в бактериальных, и в эукариотических клетках — это образование спор и их прорастание. Опыты с энуклеированными клетками или с актиномици-

ном D позволили установить удивительную вещь – вся информация, необходимая для спробразованья передается задолго до момента ее реализации. Это было показано в опытах, в которых синтез специфических белков, необходимых для морфологической цитодифференцировки, начинался через несколько часов после подавления синтеза РНК с помощью высоких доз актиномицина D. Это свидетельствует о том, что для любой стадии образования спор или плодовых тел информация передается задолго до того, как эти события происходят в действительности. Предполагают, что эта информация сохраняется в долгоживущих матрицах, и вероятно, именно с этим связан феномен длительности сохранения спор и их жизнеспособности.

Необходимо подчеркнуть, что в случае эндогенного покоя появление воды недостаточно для начала прорастания споры, так как этот процесс находится под контролем системы цАМФ и специальных аутоингибиторных соединений, задерживающих выход споры из состояния покоя, а также имеется система клеточных барьеров и метаболических блоков. В основном в состоянии эндогенного покоя находятся половые споры (зиготы, базидиоспоры, аскоспоры), для прорастания которых необходима специальная обработка, например, нагреванием или химическими соединениями, нарушающими целостность клеточной стенки. Действие факторов, позволяющих управлять процессом выхода спор из состояния эндогенного покоя мало изучено. Такие споры прорастают в соотношении 1 : 100, и естественно их не используют как споры посевной материал в биотехнологических процессах.

Экзогенный (поверхностный) покой. Такой покой свойственен вегетативным спорам грибов и нарушается, когда неблагоприятный фактор перестает действовать. В этом случае основным сигналом к прорастанию является появление воды, причем у некоторых видов грибов первая стадия прорастания – набухание может происходить через 20–30 мин.

Два типа покоя могут иметь определенные различия, наблюдаемые в процессе прорастания. Так, например, конидии *Aspergillus niger* прорастают в дистиллированной воде и находятся в состоянии экзогенного покоя. Однако для образования ростковых трубочек им необходимо присутствие источников углерода и азота. Особенности их покоя состоят в том, что активными стимуляторами прорастания являются азотсодержащие соединения. Кроме того, при действии температуры на покоящиеся конидии изменения в липидном бислое и в составе нейтральных липидов практически те же, что и у растущего мицелия при температурном стрессе [22]. Эти данные позволяют предположить, что, если следовать совре-

менной классификации типов торможения жизненной активности [16], то экзогенный покой конидий *A. niger* по рассмотренным признакам приближается к типу метаболизма вегетативных клеток, находящихся в стадии идиофазы [22]. Этот тип экзогенного покоя конидий *A. niger* можно рассматривать, как своеобразную форму “переживания” между анабиозом и активной жизнедеятельностью по степени торможения метаболизма наиболее близкой к вегетативной жизни. Наличие в природе состояний, различающихся по степени торможения активного метаболизма, является проявлением диалектики жизни, которая для своего сохранения использует биохимические механизмы адаптации, способные обеспечить временное отсутствие жизни (минимум смерти), состояние покоя или сна.

Таким образом, два типа покоя у грибов различаются сложностью метаболической регуляции, наличием специальных ауторегуляторов, временем прорастания, количеством проросших спор, а также их химическим составом. Последнее является основной темой данной работы.

РАЗЛИЧИЯ В ХИМИЧЕСКОМ СОСТАВЕ КЛЕТОК ГРИБОВ В СОСТОЯНИИ БИОЗА И ПОКОЯ

У грибов переход к состоянию покоя связан с особым механизмом, который практически отсутствует у прокариот. Клетка разделяется на специальные отсеки, в которых хранятся соединения, необходимые при прорастании. Этот процесс называют компартиментализацией. При этом запасные липиды – триацилглицерины отделены от ферментов липидного метаболизма; углеводы, например трегалоза, отделена специальным отсеком от фермента трегалазы.

Установлено, что вязкость и анизотропия цитоплазмы значительно отличаются не только у активно растущих и покоящихся клеток, но и зависят от типа покоя [23]. Сравнение покоящихся клеток гриба *Talaromyces macrosporus* – аскоспор и конидий – позволило установить значительные различия в физико-химических свойствах их цитоплазмы. При использовании метода электрон-спинового резонанса обнаружено, что цитоплазма аскоспор имеет в состоянии покоя очень высокую вязкость, в то время как конидии имеют существенно более низкую вязкость цитоплазмы и величину анизотропии. Интересно наблюдение, что высокие значения вязкости цитоплазмы аскоспор резко понижаются, когда начинается дегградация трегалозы и происходит образование глюкозы, т.е. начинается первая стадия прорастания покоящихся клеток. Так как аскоспоры значительно более устойчивы к различным стрессовым воздействиям, предполагается, что эти свойства могут быть связаны с состоянием цитоплазмы.

Основным отличием покоящихся клеток от вегетативных является их обезвоженность. При этом споры, находящиеся в состоянии экзогенного покоя, содержат больше воды, чем находящиеся в конститутивном покое, а вегетативные клетки содержат больше воды, чем споры. В наибольшей степени оводнены вегетативные клетки. Экзогенно покоящиеся споры содержат до 60% воды, а активно растущие, вегетативные клетки — 80% и более. Содержание воды в спорах можно снизить до 3%, однако в этом случае дыхание уже не регистрируется [24]. Обнаружены различия в содержании воды в протопластах и споровых оболочках у бактерий и грибов. Методом лазерной диффрактометрии показано, что протопласты бактериальных спор сильно дегидрированы по сравнению с интегументом, противоположное распределение обнаружено у грибных спор. Предполагается, что именно значительная дегидратация протопластов обеспечивает способность бактериальных спор выдерживать более высокую температуру по сравнению со спорами грибов [25]. Развитие этой идеи нашло отражение в гипотезе последних лет, согласно которой устойчивость к внешним факторам и способность к прорастанию во многом зависят от регидратации и активности внутриклеточной воды в спорах [26].

Покоящиеся споры имеют еще один биохимический механизм, связанный с присутствием специальных соединений, называемых самоингибиторами, или аутоингибиторами прорастания. Наиболее подробно изучен и синтезирован ингибитор прорастания спор *Collectotrichum goesporioides*, названный глоеспороном [27]. Состояние покоя и прорастание конидий у *Penicillium paneum* регулируется летучим самоингибитором 1-октен-3-олом [28]. Этот ингибитор является продуктом ферментативного разрушения линолевой кислоты липоксигеназой и гидропероксидазой. Биосинтез 1-октен-3-ола определяет запах грибов, особенно свежесобранных и слегка поврежденных. У агариковых грибов запах сильно ощущается в мякоти шляпки, где образуются споры. Этот запах наиболее характерен для плодовых тел *Agaricus bisporus* с величиной шляпки 35 мм с закрытым покрывалом [29]. 1-Октен-3-ол выделяется в воздушную среду в очень высоких концентрациях, в то время, когда образуются пропагулы, как у пенициллов, так и у агариковых грибов, у которых это соединение выполняет функцию ингибитора прорастания. Кроме того, 1-октен-3-ол может выполнять роль “драйвера” в образовании спор и их распространении в воздухе.

Совместно с 1-октен-3-олом у грибов может происходить синтез другого метаболита — 10-оксо-*транс*-8-деценной кислоты [30, 31]. Полагают, что этот ауторегулятор работает в тандеме с 1-октен-3-олом и участвует также в регуляции ростовых процессов, регулируя рост мицелия, и

инициирует образование плодовых тел. Эти данные позволяют предположить, что продукты ферментативного разрушения линолевой кислоты могут иметь большое значение при образовании у грибов сексуальных и вегетативных структур при нарушении состояния покоя.

У ржавчинных грибов имеются свои специфические аутоингибиторы прорастания — метиловый эфир *цис*-феруловой кислоты и метиловый эфир *цис*-3-4-диметоксикоричной кислоты. Основная функция этих соединений та же, что и у вышеуказанных аутоингибиторов — подавление процесса прорастания спор после их образования и при переносе их в воздушных потоках [32], поэтому у грибов синтезируется обычно два типа ауторегуляторов — летучие и нелетучие соединения.

Следует отметить еще один фактор, участвующий в регуляции состояния покоя, — это концентрация спор в среде. Высокая концентрация спор в среде приводит к торможению их прорастания из-за наличия самоингибиторов, накапливающихся в очень большой концентрации. В этом случае достаточно промыть споры в воде и можно наблюдать их интенсивное прорастание.

При сохранении состояния покоя, вероятно, большое значение имеет клеточная стенка грибов, в частности ее химический состав [33]. В клеточной стенке грибов удивительным образом собраны соединения, защищающие спору от литических ферментов, ядов, высокой температуры и других стрессовых воздействий: аминополисахариды, глюканы, белки, липиды, спорополленин, мукоран и др. Интересно, что соединения, входящие в состав клеточной стенки, могут влиять и на интенсивность спорогенеза. Так, для гриба — патогена беспозвоночных *Beauveria bassiana* добавление хитозана к среде выращивания приводит к интенсификации спорообразования [34]. Основным фактором, сохраняющим состояние покоя, является регуляция проницаемости клеточной стенки споры, в первую очередь для воды. О том, что изменение проницаемости клеточной стенки, вызванное, например, изменением осмотического давления (обработка глицерином) приводит при наблюдении в микроскоп к “просветлению” клеточной стенки, было известно еще в 80 годы прошлого столетия при изучении активации спор *Phycomyces blakesleeanus* [35]. Данные последних лет показали, что изменение проницаемости связано с фазовым состоянием липидного бислоя [36].

Обнаружены существенные различия в составе углеводов у покоящихся клеток — спор и активно растущего мицелия. Как правило, состояние покоя характеризуется высоким содержанием трегалозы. Трегалоза (α -D-глюкопиранозил- α -D-глюкопиранозид) — широко распространенная в природе молекула, которая характерна для высших и низших форм жизни, но не для млекопита-

ющих. Большим достижением последних лет является установление такого факта, как наличие специального гена, участвующего в синтезе трегалозы, который присутствует у многих организмов, содержащих чрезвычайно низкий уровень трегалозы [37]. Это позволяет значительно расширить круг организмов, содержащих трегалозу, и предположить ее наличие у некоторых млекопитающих, тем более что у людей обнаружена трегалаза (TREN), которая гидролизует трегалозу в кишечнике и является маркером повреждения почечных канальцев [38]. В свете этих данных, представляет интерес обнаружение трегалозы у *Phytophthora infestans*, которую относили к группе Po (по классификации углеводов, специфичных для определенных систематических групп грибов), т.е. считалось, что этот организм не образует ни трегалозы, ни полиолов [39]. Однако позже в составе углеводов спорангиев *P. infestans* были обнаружены глюкоза как основной сахар (около 90%), трегалоза (6%) и полиол арабит [40]. Известно, что Оомусетес относили ранее к царству грибов, как особый ствол в этом царстве, причем одним из признаков считалось наличие спорангиев. Однако, сравнение состава сахаров спорангиев грибов и представителей царства Chromista показало большие различия: у грибов в покоящихся клетках обнаруживается высокое содержание трегалозы и полиолов, и низкий уровень глюкозы, в то время как у оомицетов было обратное соотношение углеводов (см. выше), следовательно, у оомицетов функция спорангий иная и не имеет отношения к состоянию покоя.

Всего около 40 лет назад о трегалозе знали только то, что этот сахар выполняет функцию запасного соединения. В настоящее время роль трегалозы значительно расширилась, так как показано, что эта молекула принимает участие в наиболее важных метаболических процессах.

В настоящее время не вызывает сомнений, что трегалоза синтезируется как стресс-зависимое соединение при действии холода, нагревания, обезвоживания, окисления и других неблагоприятных факторов. Именно в таких ситуациях организм синтезирует большое количество трегалозы, что позволяет ему сохранить целостность клеток. В условиях стресса присутствие трегалозы препятствует денатурации белков, что подтверждают современные данные об уменьшении содержания этого дисахарида во время агрегации белков, медирированных полиглутамином [41]. Механизм стабилизации белков был достаточно быстро выяснен, и трегалоза получила название химического шаперона [42].

Еще в 1991 г. в опытах с муковровым грибом *Cunninghamella japonica* было показано, что в условиях высокотемпературного стресса происходила остановка ростовых процессов и быстрое накоп-

ление трегалозы, которое сопровождалось изменением липидного состава и увеличением степени ненасыщенности липидов, т.е. была установлена взаимосвязь между синтезом трегалозы и составом липидного бислоя [43]. При этом параллельно с увеличением степени ненасыщенности липидного бислоя происходило увеличение уровня фосфатидилэтаноламина, что, вероятно, способствовало более активному росту мицелия после выхода из состояния стресса. Аналогичный эффект наблюдался при добавлении антиоксиданта в период действия стрессора. Позднее в опытах с дрожжами при действии на них пероксида водорода, который вызывал окислительное повреждение аминокислот в белках, было показано, что трегалоза способна устранять эти повреждения и защищать клетку от действия свободных радикалов [44]. Установлено, что экзогенные неприродные антиоксиданты, например 4,4'-дикумилдифенил-азотокись, а также природные – α -токоферол, убихинон Q₉, в том числе и собственные антиоксиданты грибов, обладают общим биологическим эффектом, стимулируя рост грибов, изменяя состав липидов, увеличивая степень их ненасыщенности и содержание фосфатидилсерина [45].

Механизм защитного действия трегалозы был установлен только в 2003 г. Используя метод ЯМР, были получены спектры ¹H и ¹³C, позволяющие судить о взаимодействии ОН...л и СН...О между трегалозой и ненасыщенными жирными кислотами. Полученные данные свидетельствовали о том, что трегалоза значительно снижала действие свободно радикального окисления на ненасыщенные ацилы липидов путем слабого связывания с двойными связями в молекулах жирных кислот [46].

Особенно велика роль сахаров, и в частности трегалозы, в процессе дегидратации клеток. В этом случае происходит потеря воды, которая связана с головками фосфолипидов, при этом на одну молекулу фосфолипидов приходится 10–12 молекул воды. Потеря воды приводит к уменьшению расстояния между молекулами фосфолипидов в плоскости мембраны, что может привести к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям между углеводородными цепями молекул фосфолипидов и образованию твердой фазы – геля [47]. При дегидратации могут образовываться и другие небислоидные структуры, например инвертированная гексагональная фаза [Т_m].

В ангидробиотических организмах сахара (но не моносахариды) предотвращают увеличение гексагональной фазы путем внедрения между головками фосфолипидов. Основными факторами снижения Т_m являются водородные связи между РО-группами полярных головок фосфолипидов и ОН-группами сахаров. Защитная роль сахаров при дегидра-

тации состоит также в предотвращении слияния мембран, что связано со способностью сахаров к стеклообразованию (витрификация), увеличению вязкости на несколько порядков и сильно замедляет молекулярную диффузию воды и кислорода, снижая вероятность химических реакций [48].

Трегалоза из-за своей особой роли в анабиозе всегда привлекала внимание биологов и химиков, а к началу 20 века было установлено, что это соединение выполняет у многих организмов различные функции. В настоящее время установлено, что трегалоза является источником энергии и резервным углеводом, стабилизирует и защищает при стрессе белки и мембранные липиды от деградации, препятствует разрушительному действию на биологические структуры свободных радикалов, является регулятором роста и развития растений и служит компонентом гликолипидов у коринебактерий [49].

Показана новая роль трегалозы, а также зависимость ее действия от концентрации в среде. В исследованиях с мицелиальными грибами, контаминирующих пищевые продукты, нами было установлено, что действие консерванта — сорбата калия (СК) — не является длительным [50, 51]. Наблюдается его разрушение ферментами грибов аскомицетного аффинитета и начинается рост вторичного мицелия, причем более интенсивный, чем в контроле. Однако если вместе с СК в среду внесено 0.1% трегалозы, то рост гриба задерживался до 7 сут. Если же вместе с консервантом внесено значительно больше трегалозы (в 10 раз) — 1.0%, то в этом случае СК действует, как консервант значительно меньшее время, и уже на 7 сут биомасса гриба составляла половину от контрольной. Таким образом, установлены два новых факта, касающиеся необычного действия трегалозы. Этот дисахарид выступает в роли соединения, в присутствии которого не проявляется эффект консерванта и стимулируется рост грибов. Однако эта необычная функция трегалозы определяется ее достаточно высоким содержанием в среде (более 1.0%). Если же концентрация этого полисахарида в 10 раз меньше, то трегалоза выступает уже в роли ингибитора ростовых процессов, т.е. в известной уже функции природного консерванта при действии стрессорного фактора. В связи с этим следует отметить, что ни глюкоза, ни лактоза не оказывают подобного действия [52].

В настоящее время считается, что нередуцирующие сахара — трегалоза и сахароза — участвуют в системе коммуникации клеток (гликокоде) и их метаболизм связан с системой клеточных сигналов [53]. В связи с уникальностью свойств нередуцирующих сахаров и определенным сходством в биологических функциях трегалозы и сахарозы, представляло интерес изучить влияние сахарозы на рост грибов-контаминантов сыров в присут-

ствии СК. Установлено, что сахароза в концентрации 1.0% активизирует рост грибов. Однако в отличие от трегалозы, низкие концентрации сахарозы (0.1%) в присутствии консерванта не оказывали ингибирующего действия на рост грибов. Возможно, необычный эффект трегалозы связан с уникальными физическими свойствами этой молекулы — высокой гидрофильностью, химической стабильностью и отсутствием внутренних водородных связей [54].

В настоящее время, кроме трегалозы и сахарозы известно несколько типов протекторных соединений:

— полиолы: глицерин, гликозилглицерин, арабит, маннит, сорбит;

— аминокислоты и их производные: глутамат, пролин, γ -аминомасляная кислота, глицин, бетаин, эктоин;

— комбинация мочевины с метиламинами, например триметиламин-N-оксид [55].

Однако механизм действия и протекторная функция этих соединений изучена значительно меньше, по сравнению с эффектом нередуцирующих дисахаридов.

Биохимическая адаптация к температурному стрессу, обусловленная протекторами углеводной природы, различается в зависимости от систематического положения организма. У *Zygomycetes* — *Cunninghamella japonica* и *Absidia coerulea* — найден только один биохимический механизм, основанный на превращении глюкозы в дисахарид трегалозу. Последняя выполняет функцию стабилизатора мембранных липидов и является своеобразным “депо” такого высокоактивного субстрата как глюкоза у этих грибов. Интересно, что только в условиях более глубокого (до 10°C) охлаждения появляются следы глицерина, а у (–) штамма *Blakeslea trispora* в стилоспорах, полученных в условиях гипертермии, обнаруживается полиол инозит.

У грибов, принадлежащих к классу *Ascomycetes*, в частности *Aspergillus japonicus* и *Myceliophthora termophila*, набор углеводов цитозоля более обширен. Кроме трегалозы, имеется ряд полиолов, которые также выполняют функцию протекторных соединений. При гипертермии отмечается тенденция увеличения образования трегалозы и инозита, а при гипотермии — маннита и глицерина. При этом наблюдалась интересная особенность, связанная с температурным оптимумом роста организма. У термофила *Myceliophthora termophila*, имеющего оптимум роста при 41–42°C, глицерин не образовывался при низкотемпературном шоке, но этот полиол появлялся у мезофила *A. japonicus*, имеющего температурный оптимум роста при 27–28°C.

Еще более широкий набор углеводных протекторов содержит цитозоль базидиомицетных гри-

бов. У этих грибов адаптация к температуре осуществляется с участием других биохимических механизмов. У *Lentinus edodes* в качестве криопротектора выступает арабит, а не маннит, как у аскомицетных грибов, но, как и у последних, при гипотермии обнаруживается глицерин.

Выше отмечалось, что переход клеток к состоянию покоя является адаптивным процессом, позволяющим клеткам пережить неблагоприятные воздействия. В этом процессе наряду с углеводным составом цитозоля, рассмотренным выше, определяющая роль принадлежит составу липидного бислоя.

Несомненный интерес представляют исследование липидного и углеводного состава клеток муконовых грибов, находящихся в состоянии эндогенного и экзогенного покоя. Для первых (зигоспор) характерно высокое содержание липидов (более 40%), в которых преобладающей фракцией являются нейтральные липиды, составляющие почти 90%. При этом для эндогенно покоящихся зигот характерно очень низкое содержание фосфолипидов и гликолипидов, а также преобладание в составе фосфолипидов фосфатидилхолина (66% от суммы фосфолипидов) и присутствие лизофосфатидилхолина. В то же время у эндогенно покоящихся спор (спорангио- и стилоспор) отмечено низкое содержание общих липидов (около 6–7%), в которых преобладает фракция фосфолипидов. В составе нейтральных липидов спор содержится значительно больше стероидов и эфиров стероидов, а также жирных кислот. Для *Blakeslea trispora* установлено еще одно различие в химическом составе клеток в зависимости от типа покоя – в составе каротиноидов. У зигоспор отмечен более высокий уровень ликопина, который не найден у стило- и спорангиоспор [56]. В этом случае ликопин является самым активным антиоксидантом, связывающим свободные радикалы (см. выше).

В процессе цитодифференцировки грибов значительная роль принадлежит специализированным липидным доменам, называемыми рафтами, которые содержат сфинголипиды и стероиды. Это латеральные зоны мембран, различающиеся по вязкости, а также по заряду (главная роль в этом принадлежит фосфатидилсерину) [57]. Домены различаются не только по химическому составу, но и по размерам, наиболее мелкие – это макродомены цитоплазматической мембраны. Следующий по размерам тип доменов – указанные выше липидные рафты, представляющие собой плоские или вогнутые участки высокоупорядоченной мембраны, обогащенные гликофинголипидами и стероидами, размер которых составляет от 10 до 1000 мкм [58]. Значение этих структур состоит в том, что включение липидов в рафты меняет путь передачи сигнала, что имеет

большое значение для выживания при переходе к состоянию покоя.

Очень крупные домены, обогащенные стероидами (SRDs), которые значительно превышают по размерам липидные рафты, идентифицированы в последние годы в цитоплазматической мембране грибов [59]. Первоначально эти домены были идентифицированы у животных [60]. Появление этих структур отмечено в процессе активного морфогенеза. Они локализованы в гифах, но не в почкующихся клетках *Candida albicans*. Вероятно, SRDs очень важны в период активного роста, и их рассматривают, как “организаторов” поляризованного морфогенеза у грибов.

В последнее время наряду с рафтами все большее внимание в области контроля морфогенных процессов уделяется лизофосфатидной кислоте (ЛФК), которую рассматривают как липидный медиатор со множеством биологических функций [61]. ЛФК стимулирует рост и дифференциацию клеток и влияет на их выживаемость. Кроме того, ЛФК используется для поддержания гомеостаза многих метаболических процессов, что необходимо организму при переходе от состояния покоя к активному метаболизму.

У многих грибов жирные кислоты, в том числе линолевая кислота ($C_{18:2}$), являются необходимыми компонентами в процессе спорогенеза. Так, для *Alternaria tomato*, у которой процесс конидиообразования протекает только в присутствии света, линолевая и линоленовая ($C_{18:3}$) кислоты являются спорогенными факторами [62]. У *Sclerotinia fructicola* образование артроспор протекает только в темноте. Активирующим спорогенез компонентом является склероспорин ($C_{12}H_{22}O_2$), представляющий собой сесквитерпен со скелетом гуанинового типа. Кроме этого стимулятора спорогенеза, у *S. fructicola* при культивировании в условиях темноты обнаружено еще одно соединение – R(–)-глицеринмонолинолеат, которое также стимулирует образование артроспор. Интересно, что гриб образует оба энантиомера, но только R-энантиомер является индуктором спорогенной активности [63].

Спорогенными факторами могут быть и гликолипиды, например, образование плодовых тел у *Schizophyllum commune* значительно стимулируется в присутствии цереброзидов и других сфинголипидов. Таким образом, гликолипиды, как и фосфолипиды и их ацилы, являются необходимыми структурными и функциональными компонентами в процессе спорогенеза у многих грибов [64]. В этом отношении следует напомнить об особой роли сфингозин-1-фосфата (S1P), о значении динамического баланса между уровнем метаболитов сфинголипидов, церамидом и S1P, а также последовательной регуляции различных семейств

митоген-активированных киназ в определении выживаемости или гибели клеток [65].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПОРОВОГО ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАЗРАБОТОК ГРИБНЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Теоретические исследования по изучению феномена покоя у грибов (биохимические изменения, которые происходят в течение этого процесса, в частности вторичный метаболизм) способствовали тому, что в 19 веке мицелиальные грибы стали рассматривать не только как источники белкового питания, но и как продуценты тех веществ, которые ранее получали из прокариот, растений и животных [66]. Одним из примеров могут служить такие гормоны растений, как гиббереллины, абсцизин и фузикоцин, которые получают теперь из грибов (*Fusarium moniliforme*, *F. amygdally* Del. и др.). Ликопин, который ранее получали из томатов, теперь получают из мукоровых грибов, причем стоимость грибного ликопина ниже, чем из растений [67]. Большой интерес вызвали появившиеся в прошлом веке данные о способности полисахаридов и связанных с ними белков грибов оказывать иммуномодулирующее и противоопухолевое действие [68]. Основное, что привлекало производителей — это их “биотехнологичность”, т.е. способность накапливать за достаточно короткие сроки значительную биомассу, возможность совмещать в производстве получение нескольких целевых веществ и создание в результате этого экологически чистых технологий [69].

В настоящее время биотехнология грибных производств включает в качестве основного этапа подготовку активного спорового посевного материала и разработку способов его сохранения для проведения целевой ферментации. В современные опытно-промышленные регламенты обычно включается: определение типа покоя спор, скорость их прорастания, физико-химические факторы, и соединения, ускоряющие выход покоящихся клеток из онтогенетического анабиоза, стандартизация спорового посевного материала и способы его сохранения в активном состоянии.

В основе этих разработок лежат современные представления о спорогенезе грибов, как ответной реакции на стрессовые воздействия, роли в этом процессе протекторных соединений, новые данные об апикальном росте и роли клеточной стенки в процессе прорастания спор. Используя новые представления о состоянии покоя, в современной биотехнологии стали применять несколько приемов, способствующих увеличению выхода спорового посевного материала. В основе одного из них лежат данные фотобиологии, пока-

завшие, что свет и длина его волны могут существенно стимулировать процесс спорогенеза.

В бесполом цикле развития грибов различают три стадии цитодифференцировки: первая — прорастание споры и последующее образование мицелия, вторая — образование спорофоров и третья — образование спорангиев. При изучении действия света на процесс спорообразования различают две основные фазы: индуктивную (образование спорофора) и терминальную (образование конидий или спорангиоспор) [70].

Наибольший интерес представляют данные по влиянию света различного спектрального состава на ряд грибов-патогенов [71]. В этой работе впервые было установлено, что действие светового импульса, полученного в индуктивную фазу, передается в терминальную. В дальнейшем было показано, что воздействие света определенной длины волны на процесс спорообразования вызывает изменения в химическом составе спор (липидный и углеводный), что приводит к изменению метаболизма выросшего из таких спор мицелия и усилению спорогенеза. Например, мицелий *Aspergillus japonicus*, выращенный из спор, образование которых происходило в присутствии зеленого света ($\lambda = 530$ нм, $J = 2.05$ Вт/м²), имел более высокую активность целлюлозгидролазы и эндогликоказы по сравнению с контролем и кроме того в 3–4 раза стимулировал процесс спорообразования [72]. Эти данные открыли новые возможности для биотехнологии: определенные для биотехнологии: определенные воздействия на посевной материал (получившие впоследствии название “Zuschung” — “воспитание” спор), обеспечили не только увеличение выхода посевных спор но и дали возможность увеличить выход конечного продукта. Впоследствии этот метод (предварительное облучение посевных спор зеленым светом) позволил в 3–5 раз увеличить уровень β -каротина в мицелии *Blakeslea trispora* и воздействовать на процесс получения фузикоцина у *Fusicoccum amygdaly* [73]. При производстве лечебного препарата “Миколикопин” (активное начало — ликопин грибов) можно также получать активный посевной материал, используя воздействие зеленого света с длиной волны 530 нм ($1-1.7$ кВт/м²) на процесс спорогенеза. При таком освещении в терминальной стадии спорогенеза у гетероталлических штаммов гриба-продуцента *Blakeslea trispora* образуются споры, содержащие больше липидов, обогащенных фосфолипидом — фосфатидилхолином, который способствует более длительному сохранению активного спорового материала. В то же время использование зеленого света в процессе спорогенеза позволяет в 2 раза увеличить выход спор, используемых в качестве посевного материала при биотехнологическом процессе получения ликопина [74].

Большое значение для сохранения всхожести посевного материала имели данные о роли трегалозы. К концу 20 века было установлено, что при прорастании споры происходит процесс разложения трегалозы под действием фермента трегалазы с образованием глюкозы. До сих пор остается неясным, почему эта образовавшаяся из трегалозы глюкоза практически не используется прорастающей спорой, а превращается в фосфорилированные триозы, причем окончательным этапом этого процесса является образование глицирина [75]. Однако трегалоза используется спорами, находящимися в состоянии покоя, так как в покое, по современным данным, все же сохраняется определенный уровень метаболизма.

В настоящее время установлено, что имеются существенные различия в липидном и углеводном составе спор, которые могут долго храниться или быстро теряют всхожесть. На примере муконовых и аскомицетных грибов было показано, что уровень трегалозы в хранящихся спорах должен быть не менее 3–5%, а снижение всхожести четко коррелирует с увеличением в спорах уровня содержания углеводов и с появлением в составе углеводов конидий низкомолекулярных полиолов и глюкозы. Другими словами, у потерявших всхожесть спор увеличивается содержание арабита и уменьшается уровень маннита и трегалозы, а в составе липидов начинает преобладать фосфатидилэтаноламин и резко снижается содержание фосфатидилхолина [76]. В то же время у спор, которые могут долго храниться, преобладает трегалоза, а в составе фосфолипидов – фосфатидилхолин. Методом спиновых зондов электронного парамагнитного резонанса на примере конидий *Aspergillus japonicus* показано, что трегалоза предохраняет мембраны спор при дегидратации, что обеспечивает их жизнеспособность [77], поэтому в современных биотехнологических разработках для сохранения активного посевного материала используются споры, выращенные на среде с добавлением трегалозы, что позволяет лучше сохранять состояние покоя и всхожесть спор [74].

В биотехнологии грибных производств значительно внимание уделяется также активации прорастания посевных спор, что связано с сокращением сроков ферментации и удешевлением стоимости конечного продукта. В связи с этим в последние годы наблюдается определенный прогресс в наших знаниях о прорастании покоящихся клеток, и механизмах, контролирующих состояние покоя. На примере спор *Bacillus subtilis* было установлено, что этот процесс тесно связан с образованием КС и его регуляторами являются муропептиды [78]. У грибов образование конидий зависит от ассоциированных с КС специальных белков, которые передают сигнал внутрь клетки и контролируют состояние покоя и “пробуждения”

споры. Возможно, существует некоторая аналогия между β -глюканом КС грибов и пептидогликанмуропептидами бактерий и глюкан может служить сигналом запрещающим или разрешающим прорастание грибных спор. Было сделано интересное наблюдение – муропептиды, полученные из бактерий, способствуют росту гиф *Candida albicans*. Это позволяет предположить, что такие молекулы могут служить интер-сигналом, общим для всего царства “низших” организмов [79].

В настоящее время в биотехнологии используются несколько приемов, позволяющих ускорить выход спор из состояния покоя. Один из них – использование стимуляторов прорастания, например, добавки к ферментационной среде D-глюкозамина или N-ацетил-D-глюкозамина. Эти соединения, входящие в состав биополимера хитина, способствуют не только ускорению процесса прорастания, но и синхронному выходу спор из состояния покоя.

В биотехнологии часто пользуются еще одним приемом, который получил название “пробуждение спящих спор”. С этой целью устанавливают соединения, которые ускоряют прорастание спор. Это могут быть некоторые аминокислоты, моносахариды и, особенно, цАМФ. Собранные споры перед внесением в ферментационную среду культивируют в течение 30–60 мин в присутствии соединений-стимуляторов, под влиянием которых образуются “наклюнувшиеся” споры, используемые в качестве посевного материала для ферментации. Этот прием обеспечивает сокращение на 4–6 ч времени получения конечного продукта. Данные по изучению химического состава спор позволили также установить, что прорастание споры связано не только с изменениями в углеводном и фосфолипидном составе, но и с резким повышением уровня гиббереллинов (свободных и связанных), а также уровня нейтральных липидов, в частности эфиров стеринов, что в какой-то степени напоминает процессы, происходящие у растений. Поэтому предварительная краткосрочная обработка спор гиббереллинами перед посевом обеспечивает более быстрое и синхронное прорастание посевного материала в условиях ферментера.

В процессе эволюции у ряда организмов, в частности у грибов, появилась способность находиться достаточно долго в особом состоянии, которое позволяет сохранить их жизнеспособность. Терминология, используемая для обозначения этого состояния, неоднозначна [16], но с наших позиций ему более подходит название “криптобиоз” – скрытая жизнь. Криптобиоз встречается у растений, насекомых, прокариот, грибов, к нему также можно отнести такие состояния, как ги-

бернация, эстивация, диапауза, оцепенение, наблюдаемые у некоторых животных. Для этих состояний характерен переход от активной жизни (рост и пролиферация) к пониженному уровню метаболизма. Другими словами, это промежуточное состояние между биозом (активным метаболизмом) и анабиозом [80], при котором метаболические процессы заторможены.

У грибов в природных условиях нет анабиоза — уникального состояния, которое достигается при глубоком охлаждении организма чаще в комбинации с высушиванием (ангидробиоз). В этом случае капельно-жидкая вода в организме минует стадию кристаллизации и переходит в аморфное состояние (витрификация). Как отмечалось выше, в природе для грибов характерно состояние гипобиоза, получившее название “покоя”, при котором сохраняется практически до 50% метаболической активности. Для этого состояния характерны: повышенная устойчивость к неблагоприятным внешним воздействиям, морфологические и ультраструктурные отличия от вегетативных клеток. Перед наступлением покоя, который вызывается либо действием неблагоприятных факторов, чаще всего недостатком воды или истощением питательного субстрата, либо генетической программой, в организме происходит коренное изменение метаболизма — явление, длительное время непонятное исследователям, получившее название “вторичного метаболизма” [81]. До сих пор, в литературных источниках можно прочесть, что функциональная роль вторичного метаболизма остается открытой [81]. Изучение феномена покоя и процесса спорообразования позволяет, на наш взгляд, выдвинуть предположение о том, что это очень рациональный процесс подготовки к переходу в криптобиоз, касающийся не только биохимии, но и морфологии организма. Когда организм переходит в идиофазу, начинается образование специфических метаболитов, которые участвуют в процессах клеточной цитодифференцировки, коммуникации клеток и половой репродукции. Подтверждением этой функции вторичных метаболитов у грибов служат данные о наличии положительной связи между процессами спорообразования и синтезом вторичных метаболитов, например спорополленина — компонента клеточных стенок спор и зигот мукоровых грибов, образующегося путем окислительной полимеризации β -каротина — продукта вторичного синтеза. Другой пример, хиноновые и фенольные пигменты грибов порядка Basidiomycetes также являются компонентами споровых покровов, а каротиноиды входят в состав артроспор гриба *Trichophyton mentagrophytes* [82]. Эти данные представляют интерес, так как, во-первых, они показывают, что вторичные метаболиты грибов не являются статическими продуктами, а подвергаются дальнейшим превращениям и контролируют состоя-

ние покоя и процессы сохранения вида. Во-вторых, вторичные метаболиты участвуют в таких жизненно важных процессах, как цитодифференцировка, а также образование покоящихся клеток — спор, зигот, конидий и других клеточных структур, связанных с процессами бесполой и половой репродукции. Именно благодаря процессам вторичного синтеза, образуется споровая оболочка, в состав которой входят такие уникальные соединения, как хитин, хитозан, глюканы, спорополленин, гидрофобины, меланин, присутствие которых защищает спору от действия литических ферментов, смены температур, кислотной и щелочной среды, радиации, тяжелых металлов и других неблагоприятных факторов. В частности, не малое значение имеет и защита от поедания организмами-“хищниками”. Следовательно, одним из основных факторов перехода в состояние покоя является предварительное протекание процессов вторичного метаболизма.

В последнее время исследование криптобиоза, анабиоза, открытие мумифицированных форм бактерий, цистоподобных клеток, нежизнеспособного некультивируемого состояния у ряда бактерий возвращает нас к вечному вопросу о том, что такое жизнь. Мы называем первую стадию развития микроорганизмов стадией биоза (жизнь), а далее вводим для грибов следующую стадию — покой, при котором происходит практически 50% торможение жизненной активности. При анабиозе, согласно последним данным, благодаря развитию новой техники, мы также обнаруживаем “следы” метаболической активности, но такой организм мы уже не называем живым, но не считаем его мертвым. Обычно мы называем организм мертвым, если не обнаруживаем протекания процессов метаболизма, чаще всего дыхания, но может быть у нас нет соответствующей аппаратуры? Следовательно, не конкретизировав определение, что мы считаем живым или мертвым, дать четкое определение соответствующему состоянию организмов, при которых происходит различной глубины торможение жизненной активности, мы пока не можем. Возможно, необходимо дальнейшее накопление научной информации, в частности исследование физиолого-биохимических особенностей, описанных выше состояний организмов, возникающих при стрессе, и создания критериев сравнения того, что мы называем “живым” или “мертвым”, что пока для нас остается во многом неизвестным. Можно считать, что определенный прогресс в решении поставленных вопросов дает 10 “признаков живого”, приведенных в работе Иваницкого Г.Р. “XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики” [83]. В природе мы наблюдаем ряд состояний организмов, которые называем “ни жизнь, ни смерть”, о которых мы уже знаем достаточно много, и их сравнительное изучение может по-

мочь в решении основного вопроса биологии — найти грань между жизнью и смертью. И в этом, вероятно, заключается основное значение изучения покоящихся форм.

Необходимо подчеркнуть еще один важный аспект изучения состояния покоя. В настоящее время особое внимание уделяется гетерогенности и фенотипическому разнообразию микробных популяций, находящихся в пролиферативном покое [84], когда происходит реализация того морфологического и физиологического типа клеток, который должен стать наиболее адаптивным к новым условиям роста. Причем гетерогенность рассматривается, как результат адаптивного мутагенеза, как компонента SOS-ответа, когда на миллион клеток возникает одна мутация при повреждении ДНК или прекращении размножения [85]. В данном случае предполагается усиление жизнеспособности популяции.

Необходимо подчеркнуть, что феномен покоя уже достаточно долго, почти 100 лет, исследуется и у растений на примере семян и почек [9, 86], причем в настоящее время такие природные и неприродные ингибиторы роста и прорастания, как кумарин, нарингенин (4',5,7-тригидроксифлаванон), сохраняющие состояние покоя, нашли практическое применение. Интересно, что ряд этих соединений оказывает одинаковый эффект у растений и грибов. Так, состояние покоя можно нарушить или значительно сократить введением гиббереллиновой кислоты, а малеиновый гидразид оказывает противоположное действие, увеличивая длительность покоя как у грибов, так и у растений. Возможно, ряд закономерностей, установленных для покоящихся клеток грибов, могут быть экстраполированы и для растений, ведь у *Planta* и *Fungi* много общего, недаром систематики длительное время объединяли их в одно царство.

Проблема покоя находится в настоящее время на стыке наиболее интенсивно изучаемых проблем биологии: происхождение жизни, определение критериев живой материи, адаптивный мутагенез, гетерогенность популяций, и приобретает все большее значение в современной биотехнологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nagi B. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1963. V. 108. P. 615.
2. Coch F. // Beitr. Biol. Pflanz. 1876. B. 2. S. 249–276.
3. Susman A.S., Halvorson H.O. Spores, their Dormancy and Germination. N. Y.: Harper & Row, 1966. 354 p.
4. Doran W.L. // Bull. Torrey. 1907. V. 49. P. 303–304.
5. Феофилова Е.П. // Микробиология. 1997. Т. 66. № 3. С. 302–309.
6. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
7. Zhang Y. // Frontiers Biosci. 2004. V. 9. P. 1136–1156.
8. Lewis K. // Nature Rev. Microbiol. 2007. V. 5. P. 48–51.
9. Lennon J.T., Jones S.E. // Nature Rev. Microbiol. 2011. V. 9. P. 119–130.
10. Jones S.E., Lennon J.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 13. P. 5881–5886.
11. Lamarre C., Sokol S., Debeaupuis J.-P., Henry C., Lacroix C., Glaser P., Coppée J.-Y., François J.-M., Latgé J.-P. // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 417.
12. Gray J.V., Petsko G.A., Johnston G.C., Ringe D., Singer R.A., Werner-Washburne M. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. P. 187–206.
13. Kasuga T., Townsend J. P., Chaoguang T., Gilbert L. B., Mannhaupt G., Taylor J. W., Glass N. L. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. P. 6469–6485.
14. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации / Ред. Е.М. Крепс. М.: Мир, 1977. 398 с.
15. Oshero N., May G. S. // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 199. P. 153–160.
16. Ушатинская Р.С. Скрытая жизнь и анабиоз. М.: Наука, 1990. 187 с.
17. Терёшина В.М., Меморская А.С., Кочкина Г.А., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 6. С. 794–800.
18. Феофилова Е.П., Терёшина В.М. // Микробиология 1995. Т. 64. № 5. С. 681–685.
19. Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 1. С. 5–24.
20. Лозина-Лозинский Л.К. // Криобиология и криомедицина. 1979. № 5. С. 30–39.
21. Харрис Г. Ядро и цитоплазма. М.: Мир, 1973. 185 с.
22. Морозова Е.В., М.В. Баранова, Козлов В.П., Терёшина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 611–619.
23. Dijksterhuis J., Nijse J., Hoekstra F.A., Golovina E.A. // Eukaryotic Cell. 2007. V. 6. № 2. P. 157–170.
24. Furch B. // Z. Pflanzenphysiol. 1978. B. 5. S. 269–272.
25. Ulanowski Z., Ludlow I.K., Waites W. M. // FEMS Microbiol. Lett. 1987. V. 40. P. 229–232.
26. Dantigny P., Nanguy S.P.-M. // Int. J. Food Microbiol. 2009. V. 134. P. 16–20.
27. Stevan V.L., Cleator E., Harter J., Hollowood C.J. // Org. Biomol. Chem. 2003. V. 1. P. 3263–3264.
28. Chitarra G.S., Abee T., Rombouts F.M., Posthumus M.A., Dijksterhuis J. // Appl. Env. Microbiol. 2004. V. 70. № 5. P. 2823–2829.
29. Cruz C., Noel-Suberville C., Montury M. // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. №1. P. 64–67.
30. Larsen T.O., Frisvat J.C. // Mycol. Research. 1995. V. 99. № 10. P. 1153–1166.
31. Kurichayachi T., Kaise H., Uno C., Hara T., Hayakawa T., Joh T. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 5. P. 1247–1253.
32. Macko V., Staples R.C., Renwick J.A.A. // Phytopathology. 1971. V. 61. № 8. P. 902.
33. Феофилова Е.П. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 6. С. 723–733.

34. *Palma-Guerrero J., Larriba E., Guerri-Agullo B., Jansson H.-B., Salinas J., Lopez-Llorca L.V.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. № 6. P. 2237–2245.
35. *Verbeke M.N., van Laere A.J.* // Exp. Mycol. 1982. V. 6. № 4. P. 313–320.
36. Антонов В.Ф. Проблемы регуляции в биологических системах. Биологические аспекты / Ред. А.Б. Рубин. М: НИЦ “РХД”, 2007. 480 с.
37. *Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B.* // Int. J. Mol. Sci. 2009. V. 10. № 9. P. 793–810.
38. *Ouyang Y., Xu Q., Mitsui K., Motizuki M., Xu Z.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 379. № 2. P. 621–625.
39. *Pfyffer G.E., Boraschi-Gaia C., Weber B., Hoesch L., Orpin C.G., Rast D.M.* // Mycol. Res. 1990. V. 94. № 2. P. 219–222.
40. Терёшина В.М., Меморская А.С., Морозова Е.В., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 4. С. 511–517.
41. *Jain N.K., Roy I.* // Protein Sci. 2009. V.18. № 1. P. 24–36.
42. *Crowe J.H.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2007. V. 594. P.143–148.
43. Терёшина В.М., Михайлова М.В., Феофилова Е.П. // Микробиология. 1991. Т. 63. № 4. С. 781–786.
44. *Benaroudj N., Lee D.H., Goldberg A.L.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 24261–24267.
45. Феофилова Е.П., Кузнецова Л.С. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 4. С. 467–473.
46. *Oki K., Watanabe H., Kubota M., Fukuda S., Kurimoto M., Tsujisaka Y., Komori M., Inoue Y., Sakurai M.* // J. Amer. Chem. Soc. 2003. V. 125. № 42. V. 12739–12748.
47. *Chapman D., Williams R.M., Ladbrooke B.D.* // Chem. Phys. Lipids. 1967. V. 1. № 5. P. 445–475.
48. Хукстра Ф.А., Головина Е.А. // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 3. С. 347–362.
49. *Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I, Carroll D.* // Glycobiology. 2003. V. 13. № 4. P. 17–23.
50. Феофилова Е.П., Кузнецова Л.С., Сергеева Я.Э., Галанина Л.А. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 128–133.
51. Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Кочкина Г.А., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 5. С. 695–701.
52. Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 463–470.
53. *Paul M.J., Primavesi L.F., Jhurreea D., Zhang Y.* // Ann. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 417–441.
54. Лианг Л.К., Вонг К.К., Жу К.Л., Шу З.М. // Биохимия. 2006. Т. 71. № 12. С. 1589–1596.
55. *Gowrishankar J.* // Biol. Int. 2001. № 40. P. 8–11.
56. Терёшина В.М., Меморская А.С., Кочкина Г.А., Феофилова Е.П. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 6. С. 794–800.
57. *Beck J.G., Mathieu D., Loudet C., Vuchoux S., Dufourc E.J.* // FASEB J. 2007. V. 21. № 8. P. 1714–1723.
58. Безуглов В.В., Коновалов С.С. Липиды и рак. Очерки липидологии онкологического процесса. СПб.: Прайм-Еврознак, 2009. 352 с.
59. *Alvarez F.J., Douglas L.M., Konopka J.B.* // Eukaryot. Cell. 2007. V. 6. № 5. P. 755–763.
60. *Steinberg G.* // Eukaryot. Cell. 2007. V.6. № 3. P. 351–360.
61. Бердичевец И.Н., Тяжелова Т.Н., Шимишлавилли Х.Р., Рогаев Е.И. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 9. С. 1213–1223.
62. *Hugeon S.B.* // Chem. Regulation Plant (Japan). 1976. № 11. P. 69.
63. *Katayama M., Marumo S.* // Agric. Biol. Chem. 1978. V. 42. № 7. P. 1431–1433.
64. *Sakai H., Kajiwara S.* // Lipids. 2004. V. 39. № 1. P. 67–73.
65. Шпигель С., Кувилье О., Эдзаль Л., Кохама Т., Мензелев Р., Оливера А., Томас Д., Ту З., ван Бруклин Д., Ванг Ф. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 1. С. 83–87.
66. Феофилова Е.П. // Микробиология. 1997. Т. 66. №3. С. 302–309.
67. Феофилова Е.П., Терёшина В.М., Меморская А.С., Алёхин А.И., Гончаров Н.Г., Дулькин Л.М. // Микология сегодня / Ред. Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев. М.: Национальная академия микологии, 2007. С. 314–323.
68. Феофилова Е.П. // Иммунология, аллергология, инфектология. 2004. № 1. С. 27–32.
69. Biowissenschaften und Biotechnologie. Eine Strategie für Europa. Mitteilung der Kommission an Europäische Parlament, der Rat, den Wirtschafts- und Sozialausschuss und den Ausschuss der Regionen. Luxemburg: SpringerVerlag, 2002. S. 51.
70. *Widdel S., Larsson Ch.* Blue Light Effects in Biological System. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1984. P. 179–301.
71. *Plourde D.F., Green, Jr.K.J.* // Phytopathology. 1982. V. 72. P. 58–61.
72. Феофилова Е.П., Волохова М.В., Величко Б.А., Карпов А.М., Полотебнова, М.В., Шлыкова Г.Ф. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 6. С. 719–722.
73. Феофилова Е.П. // Итоги науки и техники. Микробиология. М: ВИНТИ. 1991 Т. 24. С. 71–115.
74. Феофилова Е.П., Терёшина В.М., Меморская А.С., Алёхин А.И., Гончаров Н.Г. Патент РФ № 200913024. 2009.
75. Феофилова Е.П. // Микробиология. 1992. Т.61. № 5. С.741–755.
76. Морозова Е.В., Козлов В.П., Терёшина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 2. С. 149–154.
77. Горнова И.Б., Феофилова Е.П., Головина Е.А., Кроткова Н.Б., Холодова В.П. // Микробиология 1992. Т. 61. № 4. С. 549–554.
78. *Dworkin J., Shach I.M.* // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 890–896.

79. Xu X.L., Lee R.T., Fang H.M., Wang Y.M., Li R., Zou H., Zhu Y., Wang Y. // *Cell Host Microbe*. 2008. V. 4. № 1. P. 28–39.
80. Keilin D. // *Proc. R. Soc. London. Ser. B*. 1959. V. 150. P. 149–191.
81. Безбородов А.М., Квеситадзе Г.И. Микробиологический синтез. СПб.: “Проспект Науки”, 2011. 144 с.
82. Hashimoto T., Pollack J. H., Blumental H. J. // *J. Bacteriol.* 1978. V. 136. № 3. P. 1120–1126.
83. Иваницкий Г.П. // *Успехи физических наук*. 2010. Т. 180. № 4. С. 337–369.
84. Avery S.V. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 577–587.
85. Galhardo R.S., Do R., Yamada M., Friedberg E.S., Hastings P.J., Nohmi T., Rosenberg S.M. // *Genetics*. 2009. V. 182. P. 55–68.
86. Crocker W. *Growth of Plants*. N.Y.: Reinhold Publ. Corp., 1948. 459 p.

Fungal Spores: Dormancy, Germination, Chemical Composition, and Role in Biotechnology (Review)

E. P. Feofilova^a, A. A. Ivashechkin^b, A. I. Alekhin^c, and Ya. E. Sergeeva^a

^a *Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312, Russia*

^b *Moscow State University, Department of Biology, Moscow, 119991 Russia*

^c *Central Clinical Hospital, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117593 Russia*

e-mail: biolog1@migmail.ru

Received March 31, 2011

Abstract—This review is focused on one of the stages of ontogenesis distinctive by its particular tolerance to the action of unfavorable factors and ability to retain the genomic material for a long period of time, i.e., fungal spores. The major part is devoted to the characterization of the specific stage typical for spores, which is called dormancy. Data are presented characterizing the carbohydrate and lipid composition of spores, with special attention being paid to the role of carbohydrate protectors, in particular, trehalose and mannite, as well as to the role of rafts in the process of sporogenesis. The role of special compounds called autoinhibitors and autostimulators in the process of exit from dormancy is discussed. The final section deals with the role of spore seeding material in biotechnological processes. Data on the correlation between the chemical composition of spores, their ability to remain dormant, and the germination process are considered. Special biotechnological approaches are presented for the first; they allow for the preservation of the germinating ability of spores, intensification of sporogenesis, changes in the ratio of final fermentation products, and an increase in their yield.

УДК 577.21+575.21+575.167

ЦИКЛИЧЕСКАЯ ДИГЕННАЯ СИСТЕМА КАК УПРАВЛЯЮЩИЙ ЭЛЕМЕНТ БАКТЕРИАЛЬНОГО БИОСЕНСОРА

© 2012 г. Е. Э. Ступак, И. В. Ступак

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054,

e-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Поступила в редакцию 1.02.2011 г.

Протестирован штамм *Escherichia coli* JC158(pCIA12/pGFK5), несущий на плазмиде pCIA12 циклическую дигенную систему с отрицательными обратными связями, реагирующий на повреждение ДНК изменением уровня синтеза репортерных белков – GFP и β-галактозидазы. При концентрации ДНК-повреждающих веществ выше пороговых значений приобретенный фенотип наследуется в последующих поколениях после устранения генотоксического воздействия. Показана возможность использования данного бактериального биосенсора для мониторинга временного присутствия генотоксикантов в среде и тестирования последствий кратковременного воздействия токсических веществ.

Генно-инженерные методы позволяют конструировать бактериальные штаммы, реагирующие на внешнее воздействие синтезом репортерных белков, количество которых тестируется по хемилюминесценции, флуоресценции или фотометрически. Созданы бактериальные цельноклеточные биосенсоры как на индивидуальные молекулы, так и на широкий спектр внешних факторов, например на общую токсичность среды, генотоксичность, повреждение белков, мембран, окислительный стресс [1]. Как правило, цельноклеточные биосенсоры содержат плазмиды с промотором, активирующимся при определенном воздействии на клетку, а также репортерный ген, транскрибируемый с этого промотора. Выбор промотора определяет специфичность искусственной сенсорной системы генов: так, для тестирования генотоксичности используются промоторы генов, входящих в RecA LexA систему SOS-ответа (*umuC*, *sulA*, *recN*, *recA*, *cda*) и промоторы генов адаптивного ответа (*alkA*) [2]. Существует база данных GenSensor, содержащая информацию о чувствительности генов к различным внешним воздействиям и позволяющая подобрать промоторы для конструирования бактериальных биосенсорных штаммов [3]. В качестве репортерных генов используют ген β-галактозидазы *lacZ*; гены *lux* оперона, кодирующего бактериальную люциферазу; *luc* гены, кодирующие эукариотическую люциферазу; гены, кодирующие флуоресцирующие белки, в частности зеленый флуоресцирующий белок GFP (green fluorescent protein) [2, 4, 5].

Кроме систем, где репортерный ген расположен непосредственно под промотором, реагирующим на внешнее воздействие, возможно созда-

ние систем и с более сложной регуляторной частью. Сконструированы искусственные генетические системы, регистрирующие внешний сигнал и управляющие определенными функциями клетки: наследуемое изменение фенотипа, периодическая экспрессия нескольких генов в процессе роста культуры, экспрессия тестируемого белка после определенного числа импульсов индуктора [6–9]. В качестве генной сети, обеспечивающей быстрое переключение при минимальном базальном уровне синтеза репортерного белка, предлагается использовать циклические дигенные системы с отрицательными обратными связями [10]. Системы генов такой структуры называют также эпигенами [7] и генетическими переключателями (genetic toggle switch, toggle gene circuit) [6, 11]. Данная генетическая система состоит из двух генетических блоков, связанных через белки-репрессоры (рис. 1). Циклическая дигенная система может поддерживать каждый из стабильных уровней экспрессии генов в ряду клеточных генераций и переключается из одного функционального состояния в другое специфическими индуцирующими факторами, которые изменяют соотношение репрессоров в клетке [7]. Сигналы, переключающие систему из одного состояния в другое, задаются генетическими элементами, использованными при конструировании. Сконструированы циклические дигенные системы, переключающиеся под действием разнообразных внешних индуцирующих факторов, в том числе и под действием токсических веществ; показана высокая чувствительность таких систем к индукторам [10, 11].

Цель работы – исследование возможности применения бактериальных биосенсоров, реги-

стрирующих сигнал посредством изменения уровня экспрессии регуляторных генов циклической дигенной системы, для определения зависимости цито- и генотоксичности вещества от длительности его воздействия и регистрации кратковременного присутствия генотоксикантов в среде.

МЕТОДИКА

Штаммы и плазмиды. Исследования проводились на клетках *E. coli* штамма JC158 (*Hfr P01*, *thi1*, *serA6*, *lacI22*, *relA1*), полученного из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика). Плазмиды pGFK5 (*ori* p15A, Km^r), pCIA12 (*ori* SC101, Ap^r) были предоставлены Дж. Коллинзом (J.J. Collins, Boston University, Boston, США). Искусственная генетическая сеть, образующаяся в клетках JC158(pCIA12/pGFK5), представлена на рис. 1. Так как репрессор *cI* подавляет транскрипцию с P_L-промотора, а LacI репрессирует P_{trc}-промотор, циклическая дигенная система может находиться в двух стабильных функциональных состояниях: в одном – высокий уровень экспрессии гена *cI* и низкий уровень экспрессии гена *lacI* (*lacI⁰cI¹*, фенотип Lac⁺GFP⁻), в другом – высокий уровень экспрессии гена *lacI* и низкий гена *cI* (*lacI¹cI⁰*, фенотип Lac⁻GFP⁺). В описании функционального состояния 0 означает, что ген дерепрессирован, 1 означает, что операторный участок связан с репрессором. Изменение фенотипа Lac⁻GFP⁺ на фенотип Lac⁺GFP⁻ индуцируется изопропил-β-D-1-тио-галлактопиранозидом (ИПТГ), переход к фенотипу Lac⁻GFP⁺ – активацией SOS-ответа при повреждении ДНК.

Условия культивирования. В экспериментах использовали клетки, не подвергавшиеся ранее воздействию токсических веществ. Клетки культивировали в богатой среде LB [12], содержащей 80 мкг/мл канамицина и 100 мкг/мл ампициллина. Среду инокулировали клетками с фенотипом Lac⁺GFP⁻, через 2 ч роста клетки осаждали, отмывали от среды (предварительные эксперименты показали защитное действие среды от генотоксических агентов) и пересевали в свежую среду с таким расчетом, чтобы оптическая плотность составила приблизительно 0.002, и вносили генотоксикант. Контрольные образцы генотоксическому воздействию не подвергали. В качестве ДНК-повреждающих веществ использовали антибиотик митомицин С и пероксид водорода.

Тестирование генотоксичности рассевом клеток. Клетки Lac⁺ культивировали в жидкой среде в присутствии генотоксиканта, а затем высевали на чашки с LB-агаром без генотоксических веществ. Генотоксичность определяли, как разницу в количестве колоний с фенотипом Lac⁻ на чашках

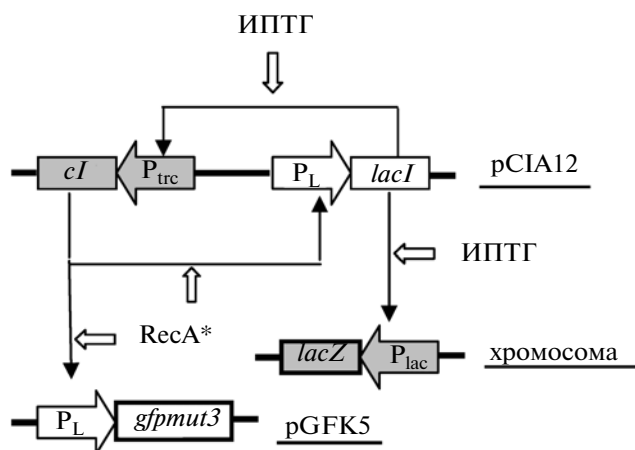


Рис. 1. Схема искусственной генной сети в клетках штамма JC158(pCIA12/pGFK5). Сеть состоит из циклической дигенной системы с отрицательными обратными связями, локализованной на плазмиде pCIA12, маркерного гена *lacZ* на хромосоме и маркерного гена *gfpmut3* на плазмиде pGFK5.

опыта и контроля. Хромогенный субстрат 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-галлактопиранозид (X-Gal) вносили в концентрации 40 мкг/мл. Чашки инкубировали 24 ч при 34°C.

Измерение активности β-галактозидазы и уровня флуоресценции культуры. Активность β-галактозидазы оценивали при помощи хромогенного субстрата о-нитрофенил-β-D-галлактозида (ОНФГ) [12] по увеличению количества о-нитрофенола/мин. Уровень снижения активности вычисляли по формуле $F_a = A_k/A_0$, где A_k и A_0 – активность β-галактозидазы контроля и опыта соответственно. Для определения флуоресценции культуру концентрировали или разводили до $D_{600} = 0.3$. Флуоресценцию измеряли на флуориметре LS 55 фирмы “Perkin Elmer” (США) при 510–520 нм при длине волны возбуждающего света 488 нм. Уровень индукции вычисляли по формуле $F_i = I_o/I_k$, где I_o , I_k – нормированная по плотности клеток флуоресценция в опыте и контроле соответственно. Принято считать, что вещество является генотоксикантом, если в его присутствии уровень SOS-ответа возрастает в 2 раза, по сравнению с фоновым [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки чувствительности клеток штамма JC158(pCIA12/pGFK5) к генотоксическим веществам в среду культивирования вносили митомицин С, антибиотик, повреждающий ДНК как при непосредственном взаимодействии с молекулой, так и опосредованно, индуцируя окислительный стресс [14]. Образцы готовили, как описано в “Методике”. Из диаграмм на рис. 2, следует, что по из-

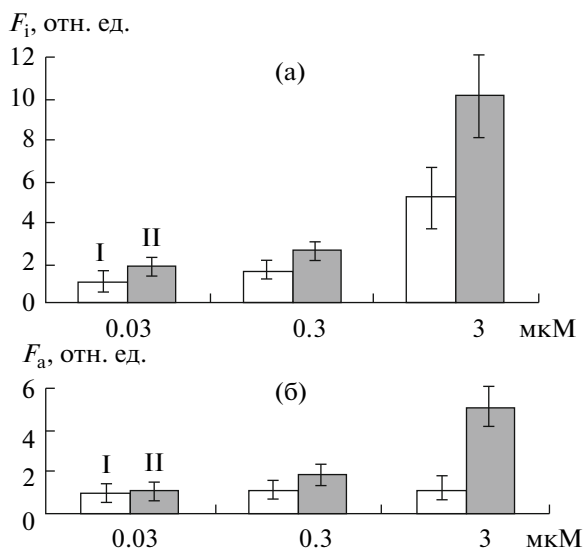


Рис. 2. Влияние различных концентраций митомидина С на уровень флуоресценции, F_i (а) и падение активности β -галактозидазы, F_a (б) клеток штамма JC158(pCIA12/pGFK5). I – 2, II – 4 ч.

менению уровня флуоресценции культуры генотоксическое действие митомидина С регистрировалось, начиная с концентрации 0.03 μM , по падению активности β -галактозидазы – с концентрации 0.3 μM . При определении генотоксичности рассевом клетки подвергали воздействию в жидкой среде, а затем высевали на чашки, не содержащие митомидин С. Изменение числа Lac^- -колоний на чашках наблюдалось при внесении 3 μM митомидина С (рис. 3). При этой концентрации митомидина, даже в отсутствие роста культуры, индуцировал изменение фенотипа у $60 \pm 10\%$ выживших клеток уже через 1 ч инкубации.

Эксперименты подтвердили, что клеточный биосенсор реагирует на повреждение ДНК изменением уровня синтеза белка GFP и β -галактозидазы, чувствительность к действию митомидина С зависела от способа тестирования.

Рассмотрим механизм регистрации повреждения ДНК в штамме JC158(pCIA12/pGFK5) (рис. 1). При нарушении целостности молекулы ДНК бактериальных клеток белок RecA обратимо переходит в активированную форму RecA* и стимулирует автокаталитическое расщепление репрессора генов SOS-регулона LexA, что приводит к развитию SOS-ответа [15]. Развитие SOS-ответа может, в свою очередь, вызвать рост концентрации белка RecA в десятки раз, поскольку LexA является репрессором гена *recA*. Чувствительность клеток штамма JC158(pCIA12/pGFK5) к генотоксикантам обеспечивает репрессор CI, который подобно белку LexA расщепляется при взаимодействии с RecA* [16]. Падение концентрации CI-репрессора вызывает экспрессию с P_L -промотора генов *gfp*

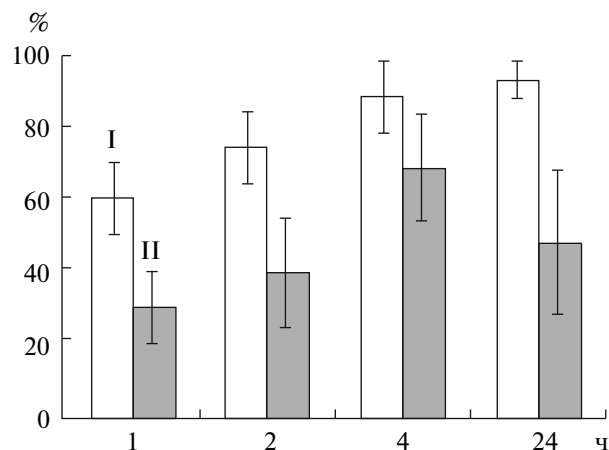


Рис. 3. Зависимость количества (%) Lac^- -колоний JC158(pCIA12/pGFK5) на чашках, не содержащих генотоксикантов, от длительности предшествующего воздействия 3 μM митомидина С (I) и 0.9 мМ пероксида водорода (II).

и *lacI*. Репрессор лактозного оперона LacI останавливает транскрипцию гена *LacZ*, кодирующего β -галактозидазу, и репрессирует P_{trc} -промотор, блокируя экспрессию гена *cl*. Таким образом, в присутствии генотоксиканта начинается синтез белка GFP, в то время как накопление β -галактозидазы останавливается.

По данным литературы, бактериальные биосенсоры, регистрирующие сигнал изменением уровня экспрессии регуляторных генов циклической дигенной системы, обладают более высокой чувствительностью, чем биосенсоры, в которых внешний сигнал непосредственно индуцирует экспрессию репортерного гена [10]. В наших экспериментах минимальная концентрация митомидина С, индуцирующая флуоресценцию культуры JC158(pCIA12/pGFK5), соответствует концентрациям, регистрируемым хроматестом [17] и *umu*-тестом [18], уступая более чувствительным биосенсорам [13, 19]. Вероятно, в нашем случае повысить чувствительность можно, используя штаммы с мутациями, снижающими эффективность процесса эксцизионной репарации нуклеотидов, вследствие чего возрастет количество одонитевой ДНК [2, 20].

Искусственная система генов в штамме JC158(pCIA12/pGFK5) обеспечивает возможность наследования двух альтернативных фенотипов, иными словами, данный биосенсор обладает памятью на генотоксическое воздействие. Устойчивое переключение $\text{GFP}^- \text{Lac}^+$ и $\text{GFP}^+ \text{Lac}^-$ происходит, если изменение соотношения репрессоров в клетке при развитии SOS-ответа достаточно для закрепления нового фенотипа. В экспериментах пороговая концентрация митомидина С, обеспечивающая переключение феноти-

пов, составляла 3 мкМ. Ниже этих значений штамм JC158(pCIA12/pGFK5) функционировал, как обычный биосенсор, отвечая на повреждение ДНК увеличением флуоресценции, но не поддерживая фенотип GFP⁺Lac⁻ после устранения генотоксического воздействия.

В последующих экспериментах мы протестировали возможность мониторинга временного присутствия генотоксиканта в среде. Клетки экспоненциально растущей культуры подвергали воздействию 3 мкМ митомицина С или 0.9 мМ пероксида водорода на протяжении 1 ч, затем отмывали, пересеивали в свежую среду, не содержащую токсических веществ, и через 5 ч культивирования рассевали на чашки. Концентрация 0.9 мМ для пероксида водорода была определена в предварительных экспериментах как пороговая для устойчивого переключения фенотипа клеток JC158(pCIA12/pGFK5) (рис. 3). Разрывы ДНК при воздействии на клетку пероксида водорода опосредованы свободным гидроксильным радикалом OH[•], образующимся при одноэлектронном восстановлении пероксида ионами Fe⁺² в реакции Фентона [21]. За вычетом контроля, клетки, контактировавшие за 5 ч до посева с митомицином С или с пероксидом водорода, сформировали на чашках 70 и 20% Lac⁻-колоний соответственно. Эксперимент показал принципиальную возможность создания на основе клеток, содержащих генетические системы с памятью на внешнее воздействие, биосенсоров для непрерывного мониторинга исследуемой среды.

Наличие у данной системы памяти позволяет использовать биосенсор для одновременной оценки цито- и генотоксичности кратковременного воздействия тестируемого вещества. Клетки культивировали в течение 30, 60 и 120 мин в присутствии 1.5, 3 или 4.5 мМ пероксида водорода, затем рассевали на чашки, не содержащие токсических веществ. Количество образовавшихся колоний свидетельствовало о цитотоксичности, процент Lac⁻-колоний – о генотоксичности. Цитотоксическое действие 1.5 мМ пероксида водорода наблюдалась в первые 30 мин, в дальнейшем рост культуры возобновлялся, вновь останавливаясь к 120 мин; генотоксическое действие проявлялось через 1 ч культивирования – при посеве клетки формировали на чашках 40% Lac⁻-колоний, через 2 ч – 60% (рис. 4). При концентрации 3 мМ пероксид водорода через 30 мин оказывал генотоксическое действие на 5% клеток, через 1 ч – на 50% клеток, через 2 ч клетки погибали. При концентрации пероксида водорода 4.5 мМ клетки погибают за 1 ч, генотоксическое действие не регистрируется. Эксперимент наглядно демонстрировал зависимость выживаемости клеток и вероятности повреждения ДНК от концентрации и длительности воздействия пероксида водорода.

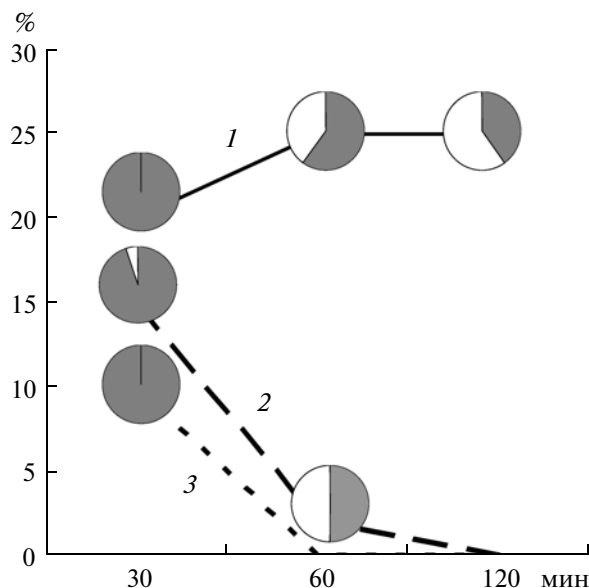


Рис. 4. Последствия кратковременного воздействия пероксида водорода (%) на клетки штамма JC158(pCIA12/pGFK5). 1 – 1.5, 2 – 3.0, 3 – 4.5 мМ. Круговыми диаграммами представлено соотношение Lac⁺ и Lac⁻-колоний на чашках (серые и белые сектора соответственно).

Гибель бактериальных клеток под действием пероксида водорода обусловлена повреждением ДНК и перекисным окислением мембран [22]. Можно предположить, что в наших экспериментах гибель клеток при концентрации пероксида 4.5 мМ является результатом повреждения мембран, при более низких концентрациях свой вклад в цитотоксическое действие пероксида вносит и повреждение ДНК. Результаты позволяют не только получить представление о цито- и генотоксичности исследуемого вещества, но и оценить последствия воздействия генотоксиканта на клетки. Например, в популяции, контактировавшей с 3 мМ пероксидом водорода в течение 1 ч, через 24 ч 50% составляли потомки клеток, получивших повреждения ДНК.

Таким образом, нами показано, что клетки штамма JC158(pCIA12/pGFK5), содержащие циклическую дигенную систему с отрицательными обратными связями, позволяют фиксировать генотоксическое воздействие, в том числе и при его устранении на момент анализа, и тестировать последствия кратковременного воздействия токсических веществ.

Авторы выражают благодарность Р.Н. Чураеву за ценные замечания и обсуждение рукописи, С.С. Астахову и Р.Р. Гарафутдинову за помощь при измерении флуоресценции.

Работа выполнена при частичной поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН “Биологическое разнообразие”,

подпрограммы “Генофонды и генетическое разнообразие”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Belkin Sh.* // *Current Opinion Microbiol.* 2003. V. 6. № 3. P. 206–212.
2. *Biran A., Pedahzur R., Buchinger S., Reifferscheid G., Belkin S.* // *Handbook Environ. Chem.* 2009. V. 5J. P. 161–186.
3. *Тикунова Н.В., Хлебодарова Т.М., Качко А.В., Степаненко И.Л.* // Докл. РАН. 2007. Т. 417. № 6. С. 835–839.
4. *Hakkila K., Maksimow M., Karp M., Virta M.* // *Anal. Biochem.* 2002. V. 301. № 2. P. 235–242.
5. *Close D.M., Ripp S., Sayler G.S.* // *Sensors.* 2009. V. 9. № 11. P. 9147–9174.
6. *Gardner T.S., Cantor C.R., Collins J.J.* // *Nature.* 2000. V. 403. № 6767. P. 339–342.
7. *Tchuraev R.N., Stupak I.V., Tropynina T.S., Stupak E.E.* // *FEBS Lett.* 2000. V. 486. № 3. P. 200–202.
8. *Friedland A.E., Lu T.K., Wang X., Shi D., Church G., Collins J.J.* // *Science.* 2009. V. 324. № 5931. P. 1199–1202.
9. *Michalodimitrakis K., Isalan M.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. № 1. P. 27–37.
10. *Kobayashi H., Kaern M., Araki M., Chung K., Gardner T.S., Cantor Ch.R., Collins J.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 22. P. 8414–8419.
11. *Wu C.H.* // *Biotechnol. Prog.* 2009. V. 25. № 3. P. 898–903.
12. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
13. *Птицын Л.Р.* // *Генетика.* 1996. Т. 32. № 3. С. 354–358.
14. *Dusre L., Covey J.M., Collins C., Sinha B.K.* // *Chem. Biol. Interact.* 1989. V. 71. № 1. P. 63–78.
15. *Walker G.C.* // *Microbiol. Rev.* 1984. V. 48. № 1. P. 60–93.
16. *Mustard J.A., Little J.W.* // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 6. P. 1659–1670.
17. *Quillardet P., de Bellecombe C., Hofnung M.* // *Mutat. Res.* 1985. V. 147. № 3. P. 79–95.
18. *Nakamura S., Oda Y., Shimada T., Oki I., Sugimoto K.* // *Mutat. Res.* 1987. V. 192. № 4. P. 239–246.
19. *Лавриненко И. А., Рябченко А. В., Беклемишев А. Б.* // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2007. Т. 5. № 1. С. 95–99.
20. *Масленникова И.Л., Голясная Н.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 455–461.
21. *Imlay J.A., Linn S.* // *Science.* 1988. V. 240. № 4857. P. 1302–1309.
22. *Ткаченко А.Г., Пиеничнов М.Р., Салахетдинова О.Я., Нестерова Л.Ю.* // Микробиология. 1999. Т. 68. № 1. С. 27–32.

Cyclic Digene System as a Control Element of a Bacterial Biosensor

E. E. Stupak and I. V. Stupak

Institute of Biology, Ufa Scientific Center, Ufa, 450054 Russia

e-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Received February 1, 2011

Abstract—The *Escherichia coli* JC158(pCIA12/pGFK5) strain carrying a cyclic digene system with a negative feedback on the pCIA12 plasmid reacting to the DNA damage by changing the synthesis level of reporter genes—GFP and β -galactosidase—was tested. The acquired phenotype was inherited by the next generations after the removal of the genotoxic action when the concentration of the DNA-damaging compounds was above the threshold level. A potential has been shown for the application of bacterial biosensors to monitor the presence of genotoxicants in the environment and to test the consequences of short-term exposures to toxic compounds.

УДК 577.151

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА Mn-ПЕРОКСИДАЗЫ *Azospirillum brasilense* Sp245

© 2012 г. М. А. Купряшина, Н. Ю. Селиванов, В. Е. Никитина

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049

e-mail: Kupryashina_m@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

Из культуральной жидкости *Azospirillum brasilense* Sp245, выращенной на среде с 0.1 мМ пирокатехином, выделена гомогенная Mn-пероксидаза со степенью очистки в 26 раз. По данным электрофореза в ПААГ с Na-ДДС молекулярная масса фермента ~43 кДа. Показано, что использование пирокатехина и 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) в концентрациях 0.1 и 1.0 мМ в качестве индукторов увеличивало активность Mn-пероксидазы в 3 раза.

Дiazотрофные бактерии рода *Azospirillum*, способные к синтезу биологически активных веществ, положительно влияющие на рост и развитие растений, являются модельными объектами в исследовании растительно-бактериальной ассоциации. Относительно недавно появились сведения о наличии у бактерий этого рода фенолоксидазной активности [1–3]. В.Е. Никитиной с соавт. [3] в результате скрининга различных штаммов бактерий рода *Azospirillum* на наличие фенолоксидаз обнаружена активность Mn-пероксидазы.

Впервые [4] Mn-пероксидаза (MnП, КФ 1.11.1.13) была выделена из *Phanerochaete chrysosporium*, фермент обладал окислительной активностью только в присутствии Mn^{2+} . Позднее было показано, что фермент катализирует пероксидазависимое окисление Mn^{2+} до Mn^{3+} , который, в свою очередь, является сильным окислителем. Как правило, MnП внеклеточный фермент с молекулярной массой 42–47 кДа [5].

Принимая во внимание высокую окислительную способность MnП, простоту в использовании, фермент часто используется как окислитель природного происхождения в современных биотехнологиях при отбеливании бумажной массы и текстильных материалов, очистки сточных вод и природных водоемов от загрязнений биоцидами, красителями, различными ксенобиотиками. Выделены и относительно хорошо изучены MnП нескольких видов базидиомицетов, однако бактериальные MnП практически не изучены. На сегодняшний день существует лишь одна работа, посвященная выделению и очистке бактериальной MnП из *Vacillus pumilus* и *Paenibacillus* sp. [6]. Высокая окислительная способность MnП, а также разнообразие физиологических функций выполняемых у различных организмов, делает этот фермент привлекательным для фундаментальных и прикладных исследований.

Цель работы – выделение и очистка внеклеточной MnП *Azospirillum brasilense* Sp245.

МЕТОДИКА

Бактерии и условия культивирования. В качестве объекта исследования использовали штамм *A. brasilense* Sp245 из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН. Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера (250 мл) на жидкой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.1; K_2HPO_4 – 0.4; NaCl – 0.1; $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.002, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.02; яблочная кислота – 5.0; NaOH – 1.7; NH_4Cl – 1.0; $CaCl_2$ – 0.02; 1мМ $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, pH – 6.8. Посевным материалом служила 12-часовая культура, выращенная на среде того же состава. Бактерии культивировали в течение 36 ч в термостате при температуре 37°C.

Индукция MnП-активности. В качестве индукторов MnП в среду при засеве культуры вносили синингалдазин (“Acros Organics”, США), 2,6-диметоксифенол (“Acros Organics”), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) (АБТС; “Sigma”, США) и пирокатехин (“Acros Organics”) в концентрациях 0.1, 0.5 и 1 мМ. Пробы для определения ферментативной активности отбирали через 24 и 36 ч в экспоненциальную и стационарную фазу роста культуры соответственно.

Определение Mn-пероксидазной активности. На всех этапах исследования активность внеклеточной MnП определяли спектрофотометрически на приборе Specord M 40 (“Carl Zeiss”, Германия) по скорости окисления 2,6-диметоксифенола ($\epsilon = 30.5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) при 30°C [7]. Реакционная смесь объемом 2 мл содержала: 50 мМ Na-тарtratный буфер, pH 4.5, 1 мМ 2,6-диметоксифенол, 1 мМ $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, препарат фермента. Реакцию начинали добавлением 100 мкл 1 мМ H_2O_2 . За 1 единицу активности фермента принимали из-

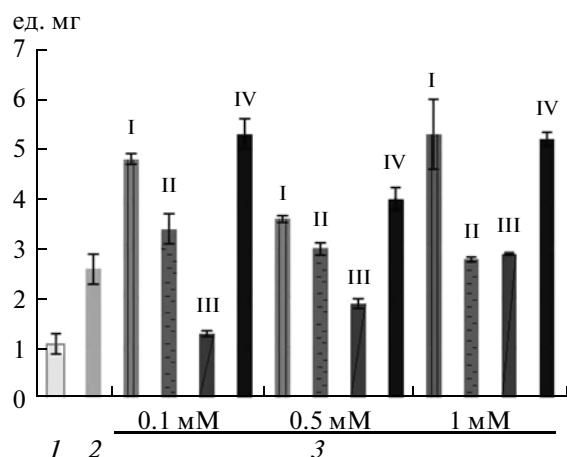


Рис. 1. Активность MnП в культуральной жидкости *A. brasilense* Sp245: 1 – среда без индукторов; 2 – среда с 1.0 мМ $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 3 – среды с фенольными индукторами: I – пирокатехин, II – сириггалдазин, III – 2,6-диметоксифенол, IV – АБТС.

менение поглощения при 468 нм на 1 единицу за 1 мин. Удельную активность выражали в ед. на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд.

Очистка фермента. Через 36 ч роста бактерий культуральную жидкость, содержащую в качестве индуктора 0.1 мМ пирокатехин, центрифугировали 20 мин при 4°C и 10000 g. Супернатант обессоливали на колонке с сефадексом G-25 против буфера А (0.025 М Na-ацетатный буфер, pH 5.0). Выход белковых фракций регистрировали на приборе Uvicord S-II (“ЛКВ”, Швеция) при $\lambda = 280$ нм. Собранные активные фракции очищали с помощью HPLC SmartLine 5000 (“Knauer”, Германия). Разделение проводили на анионообменной колонке TSK Bioassist Q (“Tosohaas”, США), уравновешенной буфером А. Элюцию проводили градиентом NaCl в буфере А при скорости потока 1 мл/мин с использованием фотометрической детекции при $\lambda = 280$ нм. Фракции, обладающие Mn-пероксидазной активностью, диализовали против воды и использовали для дальнейшего анализа.

Электрофорез. Гомогенность полученного препарата фермента и его молекулярную массу определяли методом электрофореза в денатурирующих условиях (ДДС-Na-ПААГ-электрофорез) по Лемли, используя для этой цели белки-маркеры фирмы “Fermentas” (Латвия): β -галактозидаза (116 кДа), бычий сывороточный альбумин (66.2 кДа), яичный альбумин (45.0 кДа), лактатдегидрогеназа (35.0 кДа), REase Bsp98I (25.0 кДа), β -лактоглобулин (18.4 кДа), лизоцим (14.4 кДа). Электрофорез в ПААГ в неденатурирующих условиях проводили по той же методике, но без кипячения или добавления Na-ДДС и меркаптоэтано-

ла. Белковые полосы окрашивали раствором серебра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выращивании *A. brasilense* Sp245 на стандартной среде с малатом и концентрацией Mn^{2+} 0.094 мг/л без индукторов в культуральной жидкости обнаруживали низкую активность MnП, не превышающую 1.2 ед./мг по окислению 2,6-диметоксифенола. При увеличении концентрации $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в среде до 1 мМ активность MnП достигала 2.6 ед./мг (рис. 1). Приведенные данные характерны для бактерий, находящихся в стационарной фазе роста (36-часовая культура), для 24-часовой культуры характерны более низкие значения активности фермента (данные не представлены). Увеличение концентрации марганца в среде, как ранее было показано, повышало также выход и активность грибной MnП [8].

Синтез внеклеточных ферментов в значительной степени определяется составом среды для культивирования. Как правило, высокое содержание в питательных средах сложных органических соединений приводит к более интенсивному росту бактерий, повышает продукцию внеклеточных ферментов. Однако в отношении изучаемой нами внеклеточной MnП азоспирилл был отмечен противоположный эффект. При внесении дрожжевого экстракта активность фермента резко снижалась, поэтому в дальнейшем он не использовался.

Для увеличения активности MnП, основываясь на предположении, что подобно ферментам грибов [9] MnП бактерий также является индуцибельным ферментом, в среду культивирования вносили ароматические субстраты в разных концентрациях. Было показано, что внесение в среду фенольных соединений, таких, как сириггалдазин, 2,6-диметоксифенол, АБТС и пирокатехин, повышало активность MnП. Данные по влиянию фенольных соединений на активность MnП представлены на рис. 1. Увеличение Mn-пероксидазной активности *A. brasilense* Sp245 при культивировании с индукторами наблюдалось через 36 ч, как и при выращивании бактерий на обычной малатной среде. Наибольшая активность MnП, превышающая контрольные значения в 3 раза, была отмечена при внесении в среду для культивирования пирокатехина и АБТС в концентрациях 0.1 и 1.0 мМ соответственно (рис. 1).

Основываясь на полученных данных, дальнейшее культивирование *A. brasilense* Sp245 для выделения и очистки MnП проводили на среде с 0.1 мМ пирокатехином и 1.0 мМ $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в течение 36 ч.

На первом этапе очистки фермента супернатант освобождали от низкомолекулярных приме-

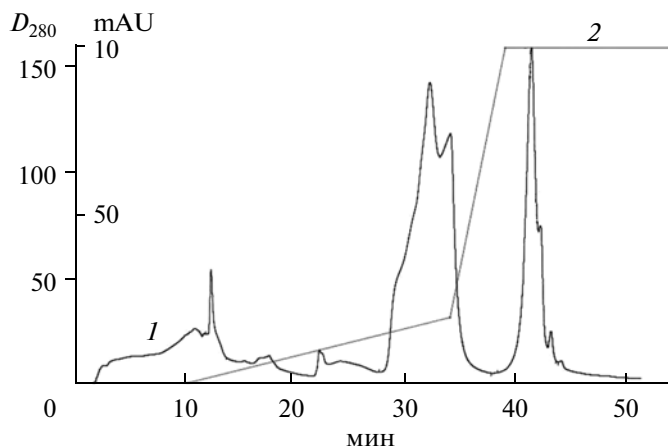


Рис. 2. Хроматография ферментного препарата *A. brasilense* Sp245 на TSK Bioassist Q: 1 – белок, 2 – градиент NaCl.

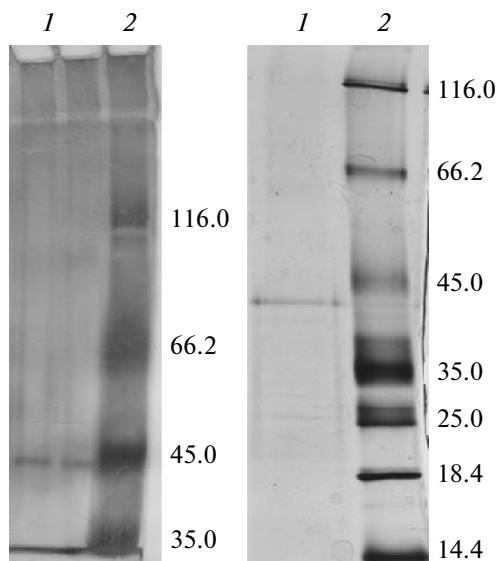


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ гомогенной MnП *A. brasilense* Sp245 после очистки на TSK Bioassist Q в неденатурирующих условиях (а) и с Na-ДДС (б): 1 – гомогенный фермент, 2 – маркеры.

сей с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной 0.025 М Na-ацетатным буфером, рН 5.0. Наибольшую трудность представляло отделение ферментного препарата от пигмента, образующегося в процессе ферментативного окисления индуктора. Полное удаление пигмента происходило только на следующей стадии очистки.

Дальнейшую очистку полученной белковой фракции проводили с использованием ВЭЖХ на препаративной анионообменной колонке TSK Bioassist Q. Проведение хроматографии при низких значениях рН и использование сложного градиента NaCl позволило отделить основную часть балластных белков на этапе нанесения образца на колонку. Белки, обладающие Mn-пероксидазной активностью, прочно связывались с носителем и выходили в зоне высоких концентраций NaCl. Хроматограмма, полученная при очистке препарата MnП на колонке TSK Bioassist Q, представлена на рис. 2. Анализ активности показал, что фермент выходит в виде двух пиков (41 и 42 мин), обладающих примерно одинаковой удельной активностью. Полученные фракции объединяли.

Анализ гомогенности полученного препарата фермента проводили методом электрофореза в неденатурирующих условиях в 7.5%-ном ПААГ (рис.3) и в денатурирующих условиях в присут-

ствии Na-ДДС в 12%-ном ПААГ (рис. 4). Сопоставление данных показало, что внеклеточная MnП *A. brasilense* Sp245 состоит из одной субъединицы с молекулярной массой ~43 кДа.

Удельная активность выделенной бактериальной MnП – 125 ед./мг белка, степень очистки – 26 раз. В таблице представлены результаты по очистке MnП *A. brasilense* Sp245.

Сравнение полученных результатов с данными литературы позволяет констатировать факт, что активность грибных MnП в десятки и сотни раз превышала активность MnП *A. brasilense* Sp245, однако удельная активность выделенного нами фермента оказалась одного порядка с грибными ферментами и даже превышала удельную активность некоторых из них [10].

Сравнении MnП *A. brasilense* Sp245 с выделенными в работе [5] из *Bacillus pumilus* и *Paenibacillus* sp. показало одно существенное отличие. Ферменты, полученные П.Л. Оливера с соавт. [6] проявляли большую активность в щелочной среде, тогда как выделенная нами MnП была активна при низких значениях рН, также, как известные грибные

Результаты очистки внеклеточной MnП *A. brasilense* Sp245

Стадия очистки	Активность, ед.	Содержание белка, мг	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки, раз
Культуральная жидкость	4.0	0.84	4.8	1
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2.3	0.4	5.7	1.2
Ионообменная хроматография на TSK Bioassist Q	0.4	0.0032	125	26

MnП. Безусловно ферменты грибов и бактерий могут иметь различия, однако возможно также, что выделенные ранее из культуральной жидкости *B. pumilus* и *Paenibacillus* sp. ферменты, обладающие столь специфичными свойствами, относятся к другой группе ферментов с пероксидазной активностью.

Как видно из таблицы и рис. 2, 3, анионообменная хроматография на TSK Bioassist Q обеспечивала получение высокоочищенной бактериальной MnП с высокой удельной активностью.

Таким образом, нами впервые выделена гомогенная MnП из бактерий рода *Azospirillum*.

Функциональную роль MnП азоспирилл еще предстоит выяснить. Однако в жизнедеятельности как микроорганизмов, так и растений важную роль во взаимоотношении с окружающей средой играют вторичные метаболиты ароматической природы. В частности, защитные реакции растительных тканей в ответ на механическое повреждение и на атаку микроорганизмов связаны с участием фенольных соединений [11]. Известно, что при формировании растительно-бактериальной ассоциации роль первичных сигналов играют специфические фенольные соединения, в частности флавоноиды, выделяемые корнями в ризосферу и вызывающие хемотаксис у ризобактерий [11]. Основываясь на полученных данных, мы можем предположить, что наличие у *A. brasilense* Sp245 фенолоксиляющего фермента, активность которого коррелирует с концентрацией аромати-

ческих соединений в среде, может быть связана с механизмами адаптации, повышающими выживаемость, конкурентоспособность азоспирилл в ризосфере, благодаря возможности бактерии окислять токсичные фенольные соединения.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № НШ-3171.2008.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R.* // Soil Biol. Biochem. 2000. V. 32. P. 919–927.
2. *Faure D., Bouillant M.-L., Bally R.* // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. № 9. P. 3413–3415.
3. *Никитина В.Е., Ветчинкина Е.П., Пономарева Е.Г., Гоголева Ю.В.* // Микробиология. 2010. Т. 79. №3. С. 344–351.
4. *Tien M., Kirk T.* // Science. 1983. V. 221. № 3. P.661–662.
5. *Левит М.Н., Шкроб А.М.* // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 309–345.
6. *Lopes de Oliveira P., Duarte M., Ponezi A., Durrant L.* // Brazilian J. Microbiol. 2009. V. 40. P. 818–826.
7. *Paszczynski A., Crawford R., Huynh V.-B.* // Methods Enzymol. 1988. V. 161. P. 264–270.
8. *Лисов А.В., Леонтьевский А.А., Головлёва Л.А.* // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 1256–1265.
9. *Elisashvili V., Kachlishvili E.* // J. Biotechnol. 2009. V. 144. P. 37–42.
10. *Дзедзюля Е.И., Беккер Е.Г.* // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 829–835.
11. *Запрометов М.Н.* // Физиология растений 1992. Т. 39. С. 1197–1207.

Isolation and Purification of Mn-Peroxidase from *Azospirillum brasilense* Sp245

M. A. Kupryashina, N. Yu. Selivanov, and V. E. Nikitina

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia
e-mail: Kupryashina_m@mail.ru

Received February 14, 2011

Abstract—Homogenous Mn-peroxidase of a 26-fold purity grade was isolated from a culture of *Azospirillum brasilense* Sp245 cultivated on a medium containing 0.1 mM pyrocatechol. The molecular weight of the enzyme is 43 kD as revealed by electrophoresis in SDS-PAAG. It was shown that the use of pyrocatechol and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonate) at concentrations of 0.1 and 1 mM as inductors increased the Mn-peroxidase activity by a factor of 3.

УДК 57.088.3; 57.037; 57.042.2

ДЕТОКСИКАЦИЯ БАКТЕРИЯМИ ТРИНИТРОТОЛУОЛА В ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

© 2012 г. И. П. Соляникова*, Б. П. Баскунов*, М. А. Бабошин*, А. И. Саралов**,
Л. А. Головлёва*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино Московской обл. 142290
e-mail: Golovleva@IBPM.Pushchino.ru

**Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081

Поступила в редакцию 7.06.2011 г.

Показана способность штаммов-деструкторов различных ароматических соединений утилизировать тринитротолуол (ТНТ) в концентрации до 70 мг/л. Увеличение концентрации ТНТ от 100 до 150 мг/л не ингибировало скорость конверсии этого соединения штаммом *Kocuria palustris* RS32. Штамм *Acinetobacter* sp. VT11 использовал ТНТ в качестве единственного субстрата для роста. Среди интермедиатов деградации ТНТ активными штаммами *Pseudomonas* sp. VT-7W и *Kocuria rosea* RS51 идентифицированы 3,5-динитро-4-метил-анилид уксусной кислоты и 2,6-динитро-4-аминотолуол. При деструкции ТНТ штаммами бактерий *Rhodococcus opacus* 1G и *Rhodococcus* sp. VT-7 впервые обнаружен 4-метил-3,5-динитроформамид. Активные бактериальные штаммы при интродукции в почву осуществляли разложение ТНТ на 82–90%.

Тринитротолуол (ТНТ) является одним из наиболее распространенных нитроароматических ксенобиотиков, так как масштабы его производства и использования были таковы, что до настоящего времени наблюдается высокий уровень загрязнения почвы и воды этим соединением [1]. Из-за симметричного расположения трех нитрогрупп в ароматическом кольце ТНТ более устойчив к микробному разложению, чем моно- и динитротолуол. Известны штаммы бактерий и грибов, разлагающих или трансформирующих ТНТ в анаэробных или аэробных условиях. Благодаря химической структуре ТНТ даже в аэробных условиях трансформируется по восстановительному механизму [2]. В подавляющем большинстве случаев, аэробный метаболизм ТНТ бактериями включает на первых этапах восстановление одной или двух нитрогрупп с образованием различных изомеров amino-нитропроизводных ТНТ. Эти соединения накапливаются в культуральной среде без дальнейших превращений [1]. По некоторым данным, частично восстановленные формы ТНТ могут взаимодействовать между собой с образованием еще более устойчивого азокситетранитротолуола, который вызывает более высокий уровень мутаций, чем ТНТ, и не метаболизируется большинством микроорганизмов [3].

Повышенный интерес к проблеме разложения ТНТ бактериями и грибами определяется не только высоким уровнем загрязнения почв этим токсикантом, но также тем, что долгое время оставался неустановленным механизм освобождения азота из молекулы ТНТ. В настоящее время известно, что

эффективный путь бактериальной деградации ТНТ включает образование Майсенхаймеровского комплекса с последующим дезаминированием, что приводит к образованию толуола и его полному разложению [1, 2, 4]. Имеется ограниченное количество статей, посвященных ферментам начальной атаки ТНТ. Так известно, что ТНТ-нитроредуктазы (ТНТ-НР), ферменты, которые катализируют восстановление нитрогруппы ароматических соединений, делятся на две группы – кислород-зависимые и независимые [5–7]. Для восстановления нитрогруппы они переносят два электрона с НАД(Ф)Н. ТНТ-НР выделены из штаммов *Pseudomonas putida* JLR11 и *Pseudomonas* sp. НК-6 и клонированы кодирующие их гены [5–7].

Цель работы – проведение скрининга среди бактерий-деструкторов различных ароматических соединений для выявления штаммов, способных разлагать ТНТ; определение образующихся продуктов биоконверсии; оценка активности ТНТ-НР; оптимизация процессов биодеструкции ТНТ и проверка способности активных штаммов разлагать ТНТ в почве.

МЕТОДИКА

Организмы, методы культивирования. Для скрининга штаммов, способных осуществлять разложение ТНТ, использовали бактериальные культуры (45 штаммов из коллекции лаборатории энзиматической деградации органических соединений, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино),

выделенные из мест как загрязненных ксенобиотиками, так и из лесной почвы, и микроорганизмы (20 штаммов из коллекции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь), выделенные из солевых отложений и отходов калийных производств на территории Верхнекамского месторождения солей (Россия).

Адаптация бактерий к росту на ТНТ. На первом этапе адаптацию к росту на ТНТ проводили на чашках с агаризованной лимитированной по азоту минеральной среде (**среда ЛМ**), следующего состава (г/л): Na_2HPO_4 – 0.73; KH_2PO_4 – 0.35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; NaHCO_3 – 0.25; MnSO_4 – 0.002; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.02, содержащей 50 мг/л ТНТ и 5% (об/об) мясо-пептонного бульона (МПБ). Пересевы культур проводили на протяжении 6 мес раз в 7 дней. На втором этапе использовали среду ЛМ с ТНТ (100 мг/л) в качестве единственного источника углерода, азота и энергии. Пересевы проводили в течение года раз в 7–10 сут.

Для определения способности культур использовать ТНТ в качестве единственного источника углерода, азота и энергии индивидуальные культуры или их смеси засеивали в жидкую среду ЛМ (200 мл), содержащую только ТНТ (50 мг/л). В качестве контроля использовали ту же культуру, проводя засев в минеральную среду, содержащую, помимо перечисленных солей, 0.75 г/л NH_4NO_3 (среда G).

Для изучения способности культур трансформировать ТНТ, взятый в различных концентрациях, клетки выращивали на агаризованной среде ЛМ, содержащей 50 мг/л ТНТ и 10% МПБ, или засеивали колбы с 200 мл ЛМ среды, содержащей ТНТ в концентрациях 100, 150 и 200 мг/л и 5% МПБ. Пробы отбирали на 3 и 6 сут. Клетки собирали центрифугированием, супернатант экстрагировали этилацетатом, как описано далее. В качестве контроля использовали культуру, выращенную на МПБ, и среду с ТНТ в одной из концентраций без добавления культуры.

Динамика превращения ТНТ. Для изучения динамики превращения ТНТ культуры высевали на 4–5 чашек с агаризованной средой ЛМ, содержащей 50 мг/л ТНТ и 10% МПБ. После того, как культура вырастала, с чашек делали смыв в жидкую среду ЛМ и засеивали колбы с 200 мл среды с ТНТ и МПБ. В качестве контролей использовали ту же среду с культурой без ТНТ и с ТНТ без культуры. Пробы (колбу целиком) отбирали в нулевой момент и на 2, 4, 6, 8 и 10 сут или на 5, 10 и 15 сут, так как динамика образования интермедиатов у разных штаммов была различной. ТНТ добавляли только при засеивании. В оставшиеся колбы вносили 10% (по объему) МПБ. Клетки отделяли центрифугированием при 17000 g 10 мин и 4°C. Супернатант экстрагировали этилацетатом дважды из

нейтральной среды (соотношение этилацетат–среда 1 : 1), подкисляли соляной кислотой до pH 2.0, экстрагировали дважды из кислой среды (этилацетат–среда 1 : 1). Экстракты объединяли, упаривали досуха, растворяли в 50 мкл ацетона и 2.5–5 мкл экстракта наносили на пластинки с Kieselgel 60 F254 (“Merck”, Германия). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили в системе бензол–диоксан–уксусная кислота (90 : 10 : 2). Для выделения образующихся интермедиатов видимые в ультрафиолете пятна счищали с пластинок, экстрагировали с носителя 100 мкл метанола и после центрифугирования повторно наносили на пластинку.

Метаболиты идентифицировали на масс-спектрометре Finnigan MAT 8430 (Германия) при энергии электронного удара 70 эВ, используя прямой ввод образца в область ионизации. Установление структуры проводили на основании сравнения полученных масс-спектров с данными литературы, а также анализа распада молекулярного иона.

Количество ТНТ после экстракции, упаривания и растворения образца в 5 мл этилацетата определяли методом газовой хроматографии на приборе Кристалл 200 М с пламенно-ионизационным детектором и колонкой НР-5 (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм) (“Хроматек”, Россия). Температура испарителя, колонки и детектора была 200, 200 и 290°C, соответственно. Образцы (1 мкл) вводили с помощью автосэмплера DAZh-2M (“Хроматек, Россия”). Количество ТНТ рассчитывали по калибровочной кривой.

Определение активности ТНТ-НР. Для определения активности ТНТ-НР бактерии культивировали в жидкой среде ЛМ, периодически внося ТНТ (раз в 5 сут в концентрации 50 мг/л) и сукцинат (раз в 2–3 сут в концентрации 200 мг/л). Из-за недостаточного для разрушения количества биомассы активность ТНТ-НР определяли только после 4 сут культивирования, хотя, согласно данным газовой хроматографии, максимальная убыль субстрата приходилась на первые 2–4 сут. Клетки собирали центрифугированием (10 мин, 4°C, 17000 g), отмывали трис-НСI буфером и разрушали на ИБФМ-прессе (ИБФМ РАН) с рабочим давлением 3200 кГ/см. Для получения бесклеточного экстракта к разрушенным клеткам добавляли ДНКазу и центрифугировали при 28000 g 25 мин. Супернатант использовали для определения активности фермента.

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Брэдфорд [8]. Активность ТНТ-НР определяли по снижению поглощения при 340 нм смеси, содержащей ТНТ, НАДН или НАДФН, ФАД в трис-НСI буфере в присутствии бесклеточного экстракта [5]. Измерение проводили в течение 3 мин. В качестве контролей ис-

пользовали снижение поглощения при 340 нм: бесклеточного экстракта с НАДН; бесклеточного экстракта с НАДН и ФАД; ТНТ с НАДН; ТНТ с НАДН и ФАД; ТНТ с НАДФН. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата в мин.

Для проверки способности культур проводить разложение ТНТ в почве в качестве инокулята использовали бактериальные культуры, выращенные на агаризованной среде с 50 мг/л ТНТ и 10% МПБ. Культуры смывали с чашек минеральной средой, по 50 мл суспензии ($OD_{545\text{нм}} = 0.6$) добавляли на 1.5 кг почвы. Раствор ТНТ вносили в почву перед внесением инокулята, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре. Влажность почвы поддерживали внесением водопроводной воды (150 мл на 1.5 кг почвы раз в 1 нед с перемешиванием). Пробы (по 100 г почвы) для анализа отбирали через 2 нед, 1, 2 и 2.5 мес, помещали в колбы с 200 мл воды, оставляли на качалке при 29°C и скорости вращения 220 об/мин на 4 ч, затем добавляли равный объем этилацетата и оставляли в тех же условиях на качалке на 12 ч. ТНТ и интермедиаты экстрагировали, как описано ранее. Остаточное количество ТНТ определяли методом ГХ. Идентификацию интермедиатов проводили методом масс-спектрометрии после выделения и очистки интермедиатов методом ТСХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг активных штаммов-деструкторов.

45 штаммов-деструкторов различных ароматических соединений из лабораторной коллекции и 20 культур галофильных и галотолерантных бактерий были проверены на способность разлагать ТНТ.

На рис. 1 представлены графики убыли ТНТ из культуральной среды при инкубировании бактерий на жидкой среде ЛМ с ТНТ и МПБ в качестве ростовых субстратов. ТНТ, взятый в концентрации от 35 до 70 мг/л, разлагался бактериями на 86–100% за 6–10 сут. Лучшие результаты получены для штаммов *Kocuria palustris* RS32 и *Acinetobacter* sp. VT11. Штамм *K. palustris* RS32 полностью осуществлял трансформацию ТНТ при его концентрации 70 мг/л менее чем за 8 сут, при этом большая часть ТНТ трансформировалась за первые 2 сут. Изучение динамики трансформации ТНТ культурой *Kocuria rosea* RS51 показало, что снижение концентрации токсиканта происходило равномерно, примерно по 20% за 2 сут. Остаточное его количество составило 0.1–0.4 мг. Интенсивное удаление ТНТ (более 50% внесенного субстрата) из культуральной жидкости наблюдали в первые 4 сут роста культуры *Rhodococcus minimus* 1a. Изучение динамики трансформации ТНТ культурой *R. opacus* 1G показало, что основное

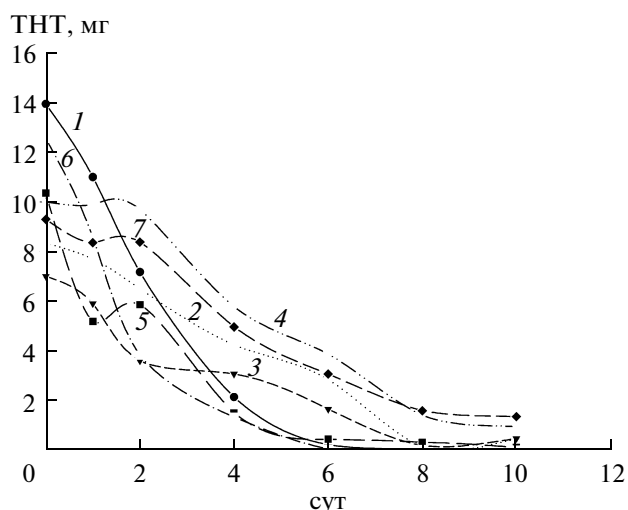


Рис. 1. Убыль ТНТ (по данным газовой хроматографии) при инкубировании бактерий на среде ЛМ с ТНТ и МПБ. 1 – *K. palustris* RS32, 2 – *K. rosea* RS51, 3 – *R. minimus* 1a, 4 – *R. opacus* 557, 5 – *R. opacus* 1G, 6 – *Acinetobacter* sp. VT11, 7 – *R. opacus* 1CP.

снижение количества субстрата на 86% происходило за тот же период времени, как и у предыдущего штамма. Остаточное количество после 8 сут культивирования составило менее 1%. Разложение ТНТ культурой *R. opacus* 557 происходило менее интенсивно по сравнению с другими культурами. За первые 2 сут убыли практически не наблюдалось, зато последующие 2 сут культивирования приводили к снижению количества ТНТ почти в два раза, затем скорость разложения ТНТ замедлялась. Разложение ТНТ культурой *R. opacus* 1CP происходило с наименьшей интенсивностью: 60%-ная убыль наблюдалась только после 6 сут культивирования, количество ТНТ на 10 сут составляло 14%. Разложение ТНТ культурой *Acinetobacter* sp. VT11 происходило практически с такой же интенсивностью, что и штаммами *K. palustris* RS32 и *R. opacus* 1G – на 4 сут убыль ТНТ составила 90% (рис. 1). На 6 сут остаточное количество не превышало 0.5% от исходной концентрации соединения. Следует отметить, что рост культуры *Acinetobacter* sp. VT11 в жидкой минеральной среде с МПБ (без ТНТ) опережал рост культуры в присутствии МПБ и ТНТ, особенно явно это различие было на первых этапах культивирования, что может быть объяснено токсическим влиянием ТНТ на бактериальную культуру (рис. 2).

Результаты эксперимента показали, что в целом начальная концентрация ТНТ не влияла на скорость трансформации субстрата. Так, уже к 6 сут штамм *K. palustris* RS32 превращал 98.5% внесенного ТНТ, взятого в наивысшей (в этой серии опытов) концентрации – 70 мг/л. Наименьшая из использованных концентраций ТНТ (35 мг/л) была в опыте со штаммом *R. minimus* 1a,

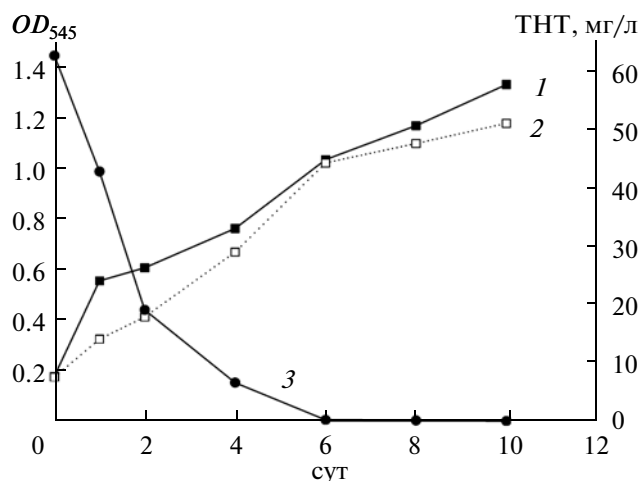


Рис. 2. Динамика роста культуры *Acinetobacter* sp. VT11 на богатой среде (1), на богатой среде в присутствии ТНТ (2). 3 – убыль ТНТ.

при этом полная убыль субстрата наблюдалась только к 8–10 сут.

Таким образом, ТНТ в концентрации 35–70 мг/л не ингибировал рост проверенных бактериальных культур. Ранее было показано, что ТНТ оказывает токсичное действие на многие организмы [9]. Так, даже в концентрации 2.5 мг/л ТНТ в значительной степени подавлял рост *Salmonella typhimurium*. Повышение концентрации этого вещества с 5 до 10 мг/л после трех и четырехсуточного контакта с ТНТ *Tigriopus californicus* и *Crassostrea gigas* соответственно приводило к гибели 80% особей [9]. Нами показано, что бактериальные культуры, которые в течение года адаптировались к росту на ТНТ, оказались способными к росту в присутствии более высоких, до 70 мг/л, концентраций ТНТ, что в разы превышает использованные ранее концентрации. Кроме того, присутствие ТНТ в среде, содержащей дополнительный источник для роста, не оказывало значительного влияния на скорость роста культур, что свидетельствует о незначительном токсичном влиянии ТНТ на эти организмы, в первую очередь, благодаря их способности к детоксикации субстрата за счет превращения его в нитро-аминопроизводное.

Использование ТНТ как единственного источника углерода, азота и энергии. При использовании агаризованной среды ЛМ с ТНТ в качестве единственного ростового субстрата (без добавления МПБ) только часть культур оказалась способной к росту на этом субстрате: *K. rosea* RS51, *K. palustris* RS32, *R. opacus* 1ср, *Rhodococcus* spp. 400, 412, *R. minimus* 1а, *Rhodococcus* spp. VT2 и VT7, *Acinetobacter* sp. VT11, *Pseudomonas* sp. 7W. Эти культуры использовали в дальнейшей работе для

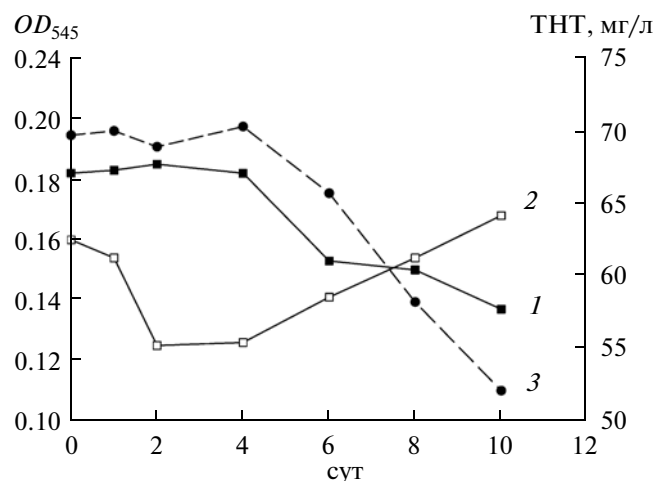


Рис. 3. Способность культуры *Acinetobacter* sp. VT11 использовать ТНТ как единственный источник углерода, азота и энергии. 1 – контроль (без ТНТ), 2 – среда с ТНТ, 3 – убыль ТНТ.

оценки скорости убыли ТНТ и динамики образования интермедиатов.

Культуру *Acinetobacter* sp. VT11, показавшую 90% убыли ТНТ за 4 сут, проверили на способность использовать ТНТ в качестве единственного источника углерода, азота и энергии (рис. 3). Как видно из представленных данных, в контрольном варианте происходило постепенное снижение оптической плотности, особенно заметное на 10 сут. В присутствии ТНТ снижение оптической плотности, наблюдаемое в течение первых 4 сут культивирования, сменялось ее ростом и к 10 сут превысило начальное значение (рис. 3). В это же время после 6 сут наблюдалось снижение количества ТНТ в пробах. Этот процесс не сопровождался накоплением каких-либо интермедиатов, определяемых методом ТСХ. Очевидно, это связано с тем, что штамм *Acinetobacter* sp. VT11 способен использовать ТНТ в качестве единственного источника для роста и его метаболизм идет без накопления значительного количества промежуточных продуктов.

ТНТ до сих пор рассматривается как поллютант первостепенного значения [10]. Несмотря на то, что максимальный уровень производства и потребления ТНТ относится к 40–60 гг. прошлого столетия, вопросы детоксикации почв и воды от загрязнений ТНТ не теряют своей остроты. Работы, посвященные поиску бактериальных штаммов, способных разлагать ТНТ, остаются все еще малочисленными. До конца 70 гг. практически отсутствовали публикации, описывающие штаммы, способные не только трансформировать, но и полностью минерализовать ТНТ [11–14]. Но даже в этих работах ТНТ использовался бактериальными штаммами как источник азота, но не един-

Таблица 1. Трансформация ТНТ при различных концентрациях культуры *K. palustris* RS32 в присутствии МПБ

Время культивирования, сут	Концентрация ТНТ, мг/л культуральной среды		
	93	140	186
0	93	140	186
3	28	75	Не определяли
6	0	5	12

ственный ростовой субстрат, и в качестве источника углерода авторы добавляли фруктозу, глицерин или глюкозу [11, 14]. Поэтому способность штамма *Acinetobacter* sp. VT11 использовать ТНТ в качестве единственного ростового субстрата и устойчивость к высоким концентрациям делают этот микроорганизм перспективным для ремедиации почв от загрязнений ТНТ.

Способность бактериальных культур к трансформации ТНТ. Способность трансформировать ТНТ в различных концентрациях проверялась с использованием нескольких бактерий, наиболее активными из которых были *K. palustris* RS32, RS39 и *R. opacus* 1G. Лучшие результаты были получены с использованием культуры *K. palustris* RS32, которая за 6 сут трансформировала 100% ТНТ при исходной его концентрации 93 мг/л и 93.5% субстрата за это же время при исходной его концентрации 186 мг/л (табл. 1).

Исследуя рост микроорганизмов на среде, содержащей дополнительные ростовые компоненты и различные концентрации ТНТ, Клаусмейер с соавт. [15] отметили, что концентрация ТНТ выше 50 мг/л предотвращала или сильно лимитировала рост большинства грибов, дрожжей, актиномицетов и грамположительных бактерий. Пастигригсби с соавт. [16] определили, что только некоторые из 31 проверенного штамма актиномицетов росли при концентрации ТНТ 75 мг/л и толь-

ко 2 – при 100 мг/л. При использовании ТНТ в качестве единственного источника азота и углерода рост исследуемых авторами штаммов на ТНТ в концентрациях 25–100 мг/л отсутствовал. При исследовании выделенного нами штамма *K. palustris* RS32 показано, что увеличение концентрации ТНТ от 100 до 150 мг/л не влияло на скорость убыли токсиканта, которая составила 6.5 мг ТНТ в обоих случаях за 3 сут. Увеличение концентрации ТНТ до 200 мг/л полностью не ингибировало рост культуры, хотя вдвое снижало скорость процесса биодеструкции. Штамм *R. opacus* 1G был способен значительно (на 79%) трансформировать ТНТ, взятый в концентрации 100 мг/л. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата уменьшало скорость трансформации: при концентрации ТНТ 136 мг/л убыль внесенного токсиканта за 6 сут составила всего 30%, а при концентрации 190 мг/л – 20%.

ТНТ-НР. В бесклеточных экстрактах всех бактериальных культур, способных трансформировать ТНТ, была обнаружена активность ТНТ-НР, уровень которой у различных штаммов различался более чем в 50 раз (табл. 2). Фермент нуждался в присутствии НАДН в качестве кофактора. При добавлении НАДФН вместо НАДН активность ТНТ-НР обнаруживалась только в одном случае, у штамма *R. opacus* 1G. В экстрактах культуральной жидкости штамма *R. opacus* 1G активность ТНТ-НР в присутствии НАДН была выше, чем в экстрактах остальных штаммов.

Были предприняты попытки оценить динамику активности ТНТ-НР у бактерий при трансформации ТНТ. Показано, что у культуры *R. opacus* 557 на 4 сут активность ТНТ-НР была максимальной, далее к 8–10 сут она снижалась. Активность ТНТ-НР у культуры *R. minimus* 1a была достаточно низкой на протяжении всего опыта, ее уровень изменялся с 0.02–0.05 Ед./мг белка на 4–6 сут и снижался до 0.01 Ед./мг белка к 8–10 сут. Активность ТНТ-НР на 4 сут культивирования штамма *Acinetobacter* sp. VT11 на порядок превышала зна-

Таблица 2. Активность ТНТ-НР в бесклеточных экстрактах

Штамм	Активность ТНТ-НР с НАДН + ТНТ, ед./мг белка	Активность ТНТ-НР при добавлении в реакционную смесь ФАД, %
<i>Rhodococcus</i> sp. VT7	0.0353	139
<i>R. opacus</i> 1G	0.0521	286
<i>K. palustris</i> RS32	0.0109	117
<i>K. rosea</i> RS51	0.0388	100
<i>R. opacus</i> 557	0.0018	Не определяли

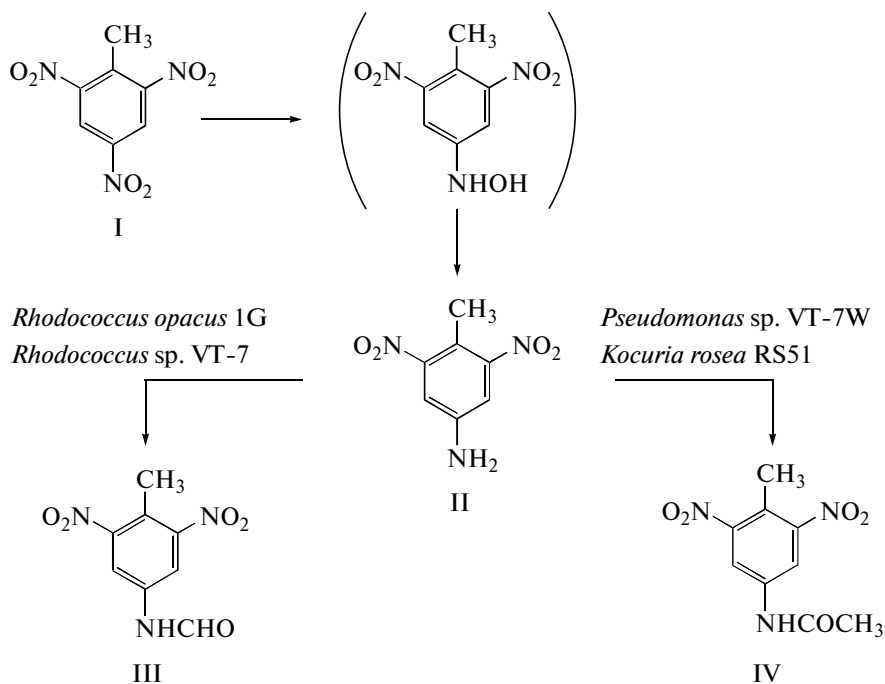
Таблица 3. Масс-спектрометрическая характеристика интермедиатов, образующихся при бактериальной трансформации ТНТ

Соединение	Основные характеристические пики в масс-спектре, m/z (%)
2,4,6-Тринитротолуол (I)	M^+ 227(2), 210(100), 193(11), 180(11), 134(11), 89(25), 76(10), 63(16)
2,6-Динитро-4-аминотолуол (II)	M^+ 197(57), 180(100), 163(10), 133(14), 132(15), 105(52), 104(66), 93(26), 78(58), 77(40)
(4-Метил-3,5-динитрофенил)формаимид (III)	M^+ 225(35), 208(100), 197(25), 180(30), 154(18), 121(30), 105(37), 104(38), 93(29), 77(49)
3,5-Динитро-4-метил-анилид уксусной кислоты (IV)	M^+ 239(42), 222(9), 208(13), 197(100), 180(77), 163(12), 104(31), 93(19), 77(31), 43(98)

чения активности фермента на 6–10 сут. В этот же период происходило снижение количества ТНТ в пробе, что отражало метаболическую активность штамма. Активность ТНТ-НР в контроле отсутствовала.

Таким образом, в бесклеточных экстрактах всех проверенных штаммов была выявлена активность ТНТ-НР. Ее уровень различался, но в среднем был сопоставим с уровнем активности экспрессируемых ТНТ-НР из штамма *Pseudomonas putida* JLR11, составляющих 0.52 (PnrA) и <0.02 (PnrB) ед./мг белка [7].

Интермедиаты, образующиеся при трансформации ТНТ бактериями. О глубине деструкции ТНТ под действием бактерий можно судить по количеству образующихся интермедиатов, так как известно, что большинство бактерий, описанных в литературе, способны трансформировать ТНТ с образованием amino-нитропроизводных. Мы показали, что бактерии, использованные в данной работе, катализировали превращение ТНТ с образованием различного количества интермедиатов. Например, процесс трансформации ТНТ штаммом *K. palustris* RS32 сопровождался образованием значительного количества интермедиатов, до 13,

**Рис. 4.** Предполагаемые пути начальной трансформации ТНТ различными бактериальными культурами. I – 2,4,6-тринитротолуол, II – 2,6-динитро-4-аминотолуол, III – (4-метил-3,5-динитрофенил)формаимид, IV – 3,5-динитро-4-метил-анилид уксусной кислоты.

количество которых к 8 сут снижалось до 7–8. У культуры *R. opacus* 557 образование наибольшего количества интермедиатов происходило на 8–10 сут. В экстрактах культуральной жидкости штамма *R. opacus* 1G обнаруживалось от 4 до 6 интермедиатов на протяжении всего эксперимента. На 23 сут у штамма *Rhodococcus* sp. VT7 методом ТСХ выявлено около 15 интермедиатов, причем интермедиаты со значениями R_f выше 0.5 (около 6) присутствовали только у данного штамма.

Некоторые интермедиаты, образующиеся в значительном количестве при трансформации ТНТ различными бактериальными штаммами, были выделены, очищены и проанализированы методом масс-спектрометрического анализа. Один из интермедиатов, образующийся на 6–10 сут культивирования штамма *R. opacus* 1G, идентифицирован как 2,6-динитро-4-аминотолуол (табл. 3). При разложении ТНТ культурой *R. opacus* 1ср 2,6-динитро-4-аминотолуол не обнаружен. Для штаммов *R. opacus* 1G и *Rhodococcus* sp. VT7 показано, что динитротолуидин (2,6-динитро-4-аминотолуол) далее трансформировался в 4-метил-3,5-динитроформамид (рис. 4). Последняя реакция обращает на себя внимание, так как ранее было показано наличие такого интермедиата при трансформации ТНТ грибами [1]. При трансформации ТНТ штаммами *Pseudomonas* sp. VT-7W и *K. rosea* RS51 показано образование на 12 сут ацетилированного динитротолуидина.

Таким образом, обнаружение значительного количества интермедиатов, образующихся при бактериальной трансформации ТНТ, а также идентификация некоторых из этих соединений свидетельствуют о том, что изучаемые штаммы способны осуществлять не только реакции первоначального восстановления ТНТ, но и более глубокие процессы превращения этого соединения.

Разложение ТНТ в почве активными бактериальными штаммами. Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о способности ряда бактериальных штаммов трансформировать ТНТ, в том числе и в случаях, когда токсикант был добавлен в высоких концентрациях. Эти активные бактериальные штаммы были использованы для детоксикации загрязненных ТНТ почв. На рис. 5 представлены результаты определения остаточного количества ТНТ при проведении эксперимента с использованием лучших бактериальных штаммов для деградации ТНТ в почве. Как видно из представленных данных, наибольшее количество ТНТ исчезало из образцов за первые 2 нед, далее происходило относительно равномерное снижение количества токсиканта в пробах. Остаточное количество ТНТ варьировало от 10 до 18%.

Присутствие в загрязненных ТНТ объектах бактерий, способных осуществлять реакции трансформации этого вещества, позволяет значи-

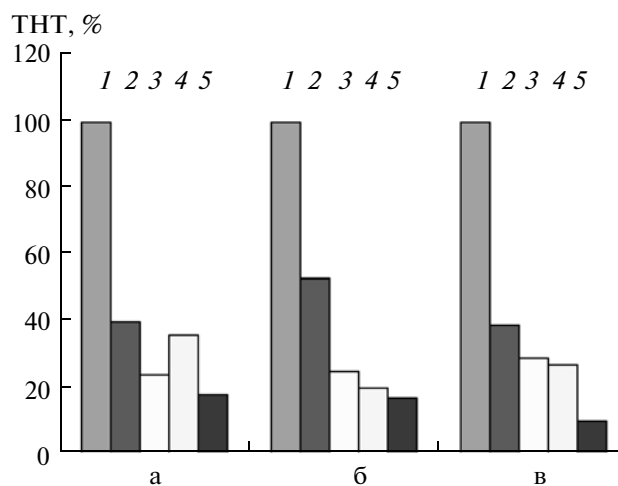


Рис. 5. Остаточное количество ТНТ в почве при внесении бактериальных культур: *K. rosea* RS51 (а), *K. palustris* RS32 (б), *R. opacus* 1G (в) через 0 (1), 0.5 (2), 1.0 (3), 2.0 (4) и 2.5 (5) месяцев.

тельно снизить или освободить биоценозы от токсичного действия поллютанта [11]. В результате проведенного нами исследования показана принципиальная возможность применения бактерий для детоксикации почвы и воды от загрязнений этим веществом. Отобранные в работе культуры эффективно трансформировали ТНТ в присутствии дополнительного ростового источника. Выделенные ами культуры *K. palustris* RS32, *R. opacus* 1G, *Acinetobacter* sp. VT11 были способны трансформировать ТНТ в концентрациях, которые полностью подавляли рост у ранее описанных в литературе штаммов. Проведенный эксперимент показал возможность использования отобранных бактерий для их очистки почвы от загрязнений ТНТ.

Работа поддержана грантом МНТЦ G-1408.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Esteve-Nunez A., Caballero A., Ramos J.L. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001. V. 65. № 3. P. 335–352.
2. Vorbeck C., Lenke H., Fischer P., Spain J.C., Knackmuss H.-J. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 1. P. 246–252.
3. Haidour A., Ramos J.L. // Environ. Sci. Technol. 1996. V.30. № 10 P. 2365–2370.
4. Bryant C., DeLuca M. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 7. P. 4119–4125.
5. Caballero A., Lazaro J.J., Ramos J.L., Esteve-Nunez A. // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. № 8. P. 1211–1219.
6. Kahng H.-Y., Lee B.-U., Cho Y.-S., Oh K.-H. // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2007. V. 12. № 4. P. 433–440.
7. Lee B.-U., Park S.-C., Cho Y.-S., Kahng H.-Y., Oh K.-H. // Curr. Microbiol. 2008. V. 56. № 4. P. 386–390.

8. Schlömann, M., Schmidt, E., Knackmuss, H.-J. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 9. P. 5112–5118.
9. Won W.D., DiSalvo L.H., Ng J. // Appl. Environ. Microbiol. 1976. V. 31. № 4. P. 576–580.
10. Rylott E.L., Lorenz A., Bruce N.C. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 3. P. 434–440.
11. McCormick N.G., Feeherry F.E., Levinson H.S. // Appl. Environ. Microbiol. 1976. V. 31. № 6. P. 949–958.
12. Chang H.W., Kahng H.Y., Kim S.I., Chun J.W., Oh K.N. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 65. № 3. P. 323–329.
13. French C.E., Nicklin S., Bruce N.C. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 8. P. 2864–2868.
14. Stenuit B., Eysers L., Rozenberg R., Habib-Jiwan J.-L., Agathos S.N. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 12. P. 7945–7948.
15. Klausmeier R.E., Osmon J.L., Wall D.R. // Dev. Ind. Microbiol. 1974. V. 15. № 2. P. 309–317.
16. Pasti-Grigsby M.B., Lewis T.A., Crawford D.L., Crawford R.L. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 3. P. 1120–1123.

Detoxification of High Concentrations of Trinitrotoluene by Bacteria

I. P. Solyanikova^a, B. P. Baskunov^a, M. A. Baboshin^a, A. I. Saralov^b, and L. A. Golovleva^a

^a Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia
e-mail: Golovleva@IBPM.Pushchino.ru

^b Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

Received June 7, 2011

Abstract—The ability of the strains-destroyers of various aromatic compounds to utilize trinitrotoluene (TNT) up to concentration of 70 mg/l was shown. An increase in the TNT concentration from 100 to 150 mg/l did not inhibit its conversion rate by the *Kocuria palustris* RS32 strain. The *Acinetobacter* sp. VT11 strain utilized TNT as a sole substrate for growth; 3,5-dinitro-4-methyl anilide acetate and 2,6-dinitro-4-amino-toluene were identified as intermediates of TNT degradation by active strains of *Pseudomonas* sp. VT-7W and *Kocuria rosea* RS51. At the same time, 4-methyl-3,5-dinitroformamide was discovered for the first time upon the TNT destruction by the bacteria strains of *Rhodococcus opacus* 1G and *Rhodococcus* sp. VT-7. The active bacterial strains achieved an 82–90% destruction of TNT when they were introduced into the soil.

УДК: 575.4

БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ПОЧВЕННЫМИ МИКРОБИОЦЕНОЗАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ И ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ

© 2012 г. А. Н. Бояндин*, С. В. Прудникова**, М. Л. Филипенко***, Е. А. Храпов***, А. Д. Васильев****, Т. Г. Волова*

*Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036

**Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041

***Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090

****Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, Красноярск, 660036

e-mail: ab@ibp.krasn.ru

Поступила в редакцию 7.04.2011 г.

Исследовано биоразрушение микробных линейных полимеров гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоатов, ПГА) почвенными микробиоценозами различной структуры в течение двух полевых сезонов, отличающихся погодными условиями. Показано, что на этот процесс оказывают влияние химический состав полимера, температура, влажность и микробная составляющая почвы. В процессе разрушения ПГА зафиксировано падение молекулярной массы полимеров, повышение степени кристалличности, свидетельствующее о преимущественном разрушении аморфной фазы по сравнению с кристаллической. Численность истинных деструкторов ПГА, развивающихся на поверхности полимерных образцов, ниже численности сопутствующих бактерий. В качестве доминантных деструкторов ПГА в исследованных условиях определены бактерии родов *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Xanthomonas* и микромицеты — *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium* и *Zygosporium*.

Масштабы выпуска и применения неразрушаемых в природной среде синтетических полимеров достигли 200 млн тонн в год, что становится глобальной экологической проблемой. Биоразрушаемые полиэферы гидроксисалканоовых кислот (полигидроксиалканоаты, ПГА), синтезируемые микроорганизмами, наряду с полилактоидами — реальные кандидаты для постепенной замены синтетических пластмасс. В настоящее время во многих странах функционируют пилотные и малотоннажные производства ПГА, выпускающие полимер под марками Biopol™, Nodax™, DegraPol/btc®, Mirel® [1, 2]. В связи со снижением стоимости применение ПГА все более ориентируют на изготовление разрушаемой тары и упаковки, одноразовой посуды и бытовых изделий. С ростом объемов производства и расширением областей применения ПГА актуальность приобретает исследование закономерностей процесса их разрушения в различных природных условиях.

Важным природным резервуаром для деструкции ПГА является почва. Однако большинство работ, ориентированных на изучение почвенной деструкции ПГА, выполнено в лабораторных условиях [3–10], тогда как полевые исследования немногочисленны. В одном из первых исследований биодегградации ПГА в природных условиях

[11] отмечалось, что кольцо для гольфа, изготовленный из полимера, практически полностью разрушился и почве за четыре недели; к сожалению, в этой работе не были указаны ни точный состав ПГА, ни характеристики почвы. Известно, что тип почвы влияет на процесс разрушения ПГА. Так, в мангровой и лесной почвах скорость их дегградации различается в несколько раз [12–14]. Показано влияние численности почвенных микроорганизмов на течение процесса дегградации поли-3-гидроксипутирата в садовой почве [15]. Однако работы, раскрывающие закономерности разрушения ПГА в почвах разных типов, различающихся микробной составляющей, крайне мало.

Микроорганизмы, разрушающие полимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксипутират) — первый и наиболее изученный представитель семейства полимеров этого класса, были выделены более 40 лет назад [16]. Впоследствии были идентифицированы и охарактеризованы микроорганизмы, разрушающие полимеры с различной длиной углеродной цепи мономеров [4, 17–19]. Однако вопрос о том, какие ПГА разрушаются активнее и в каких условиях среды, дискутируется до настоящего времени.

Цель работы — выделение микроорганизмов-деструкторов ПГА и исследование дегградации по-

лимеров различной химической структуры почвенными микроорганизмами в прикорневой зоне хвойных и лиственных деревьев при изменении температурного режима среды.

МЕТОДИКА

Характеристика ПГА. Исследованы образцы ПГА двух типов. Один из них – гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксibuтират, ПГБ) со степенью кристалличности (СК) 61%, средневесовой молекулярной массой (M_v) $710 \pm 1.5\%$ кДа. Другой – сополимер 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот (поли-3-гидроксibuтират-3-гидроксивалерат, ПГБВ) с включением 3-гидроксивалерата 10 мол. %, СК – 50%; M_v – $799 \pm 3.1\%$ (в эксперименте 2007 г.) и $680 \pm 1.1\%$ кДа (2010 г.). Образцы полимеров синтезированы в культуре *Wautersia eutropha* B5786. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов [20–21].

Были взяты образцы ПГБ и ПГБВ в виде пленочных дисков, полученных поливом растворов ПГА в хлороформе на полированную поверхность с последующим испарением растворителя (диаметр 30 мм, толщина 0.1 мм, масса 73 ± 5 мг). Химическую структуру ПГА анализировали после метанолиза проб полимера на хромато-масс-спектрометре 5975 Inert (“Agilent”, США).

Биодеградация ПГА. Изучение проводили на территории дендрария Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск). Предварительно взвешенные стерильные образцы ПГА размещали в чехлах из мелкоячеистой синтетической ткани (мельничного газа) на глубине 5 см в прикорневой зоне лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.) и березы повислой (*Betula pendula* L.). Почва дендрария дерново-карбонатного типа состоит из гумусового горизонта мощностью от 10–15 до 30–40 см и подстилающей его карбонатной породы.

Исследования проведены в течение двух полевых сезонов, различающихся температурным режимом. Первый сезон охватывал период с 2 июля по 19 октября 2007 г.; второй – с 7 июня по 7 сентября 2010 г. Второму сезону предшествовала суровая зима, при средней зимней температуре воздуха -22.1°C (для половины января и части февраля характерны температуры до -40°C), что на 13.5°C ниже средней температуры воздуха зимнего периода, предшествующего первому сезону (-8.6°C). Для второго сезона отмечено более позднее наступление весеннего потепления; снежный покров сохранялся до конца апреля.

В ходе эксперимента чехлы с полимерными образцами ($n = 3$ каждого типа) изымали из почвы, образцы извлекали, очищали от остатков почвы с

применением механических и ферментативных методов, промывали дистиллированной водой и высушивали при 40°C в течение 24 ч. Одновременно регистрировали температуру, pH и влажность почвы с использованием стандартных физико-химических методов [22]. Образцы взвешивали на аналитических весах IV класса точности (“Metler”, США). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПГА исследовали с использованием хроматографа для гель-проникающей хроматографии Breeze System (“Waters”, США) относительно полистироловых стандартов (“Fluka”, Швейцария, Германия). Находили средневесовую (M_v) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность ($PD = M_v/M_n$). Степень кристалличности полимеров (СК, %) определяли на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE (“Bruker”, Германия).

Микробиологические исследования. Микробиологический анализ почвы проводили в момент размещения образцов и через 3 мес, в последнем случае исследовали контрольные образцы почвы, взятые из прикорневой зоны березы и лиственницы в месте размещения образцов ПГА, и смывы с их поверхности. Ранее было показано, что качественный состав микрофлоры, выделенной с поверхности пленок ПГБ, не отличался от такового с поверхности пленок, изготовленных из сополимера ПГБВ [4, 23], поэтому пробы почвы с поверхности обоих типов ПГА не разделяли.

Для характеристики микробиоценозов почвы использовали общепринятые методы почвенной микробиологии [22]. Общую численность бактерий определяли на рыбопептонном агаре (РПА), численность прототрофов и олиготрофов – на крахмало-аммиачном агаре (КАА) и почвенном агаре (ПА) соответственно. Микромицеты выделяли на сусло-агаре (СА). Посев производили из почвенной суспензии (разведения 10^4 – 10^7) в трехкратной повторности. Чашки инкубировали при 30°C в течение 3–7 сут для учета бактерий и при 25°C в течение 7–10 сут – для микромицетов. Выделение доминантных микроорганизмов и их идентификацию проводили на основании культуральных, морфологических признаков и стандартных биохимических тестов [24, 25]. За 2 полевых сезона было выделено и проанализировано 400 изолятов.

Почвенные микромицеты идентифицированы по морфологическим признакам (структура и цвет колоний, строение мицелия и органов спороношения), широко используемым для определения систематической принадлежности этих микроорганизмов [26–29].

Для выявления истинных деструкторов ПГА проводили посевы проб, взятых с поверхности полимерных образцов, на диагностическую среду, со-

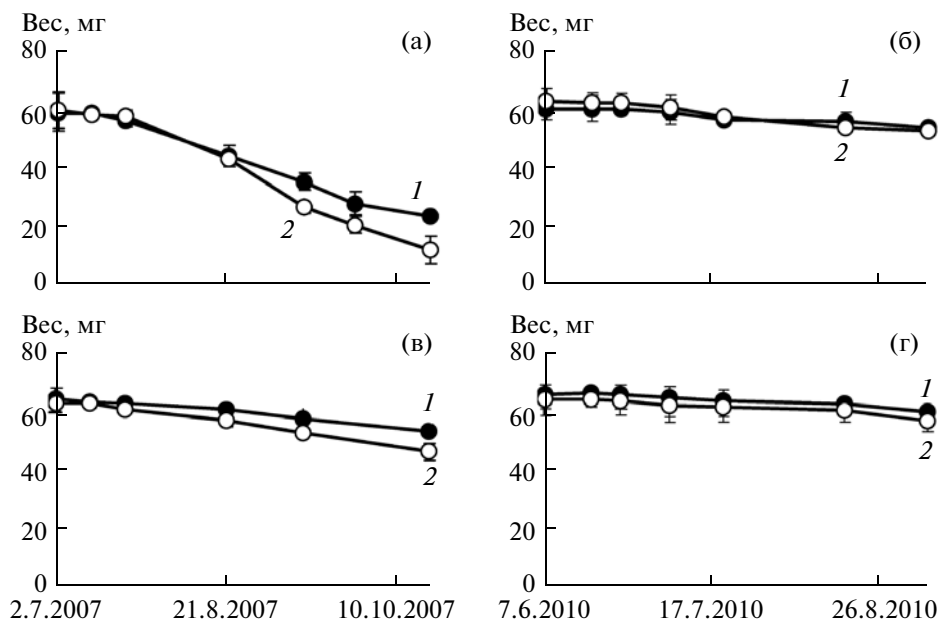


Рис. 1. Динамика уменьшения массы (мг) образцов полимера в почве прикорневой зоне лиственницы (а, б) и березы (в, г): а, в – 2007 г.; б, г – 2010 г.; 1 – ПГБ; 2 – ПГБВ.

держашую в качестве единственного источника углерода 0.25% порошкообразного ПГБ [30]. Рост микроорганизмов, обладающих ПГА-деполимерной активностью, сопровождался образованием вокруг колоний характерных прозрачных зон. Бактериальные деструкторы, помимо общепринятых морфолого- и биохимических исследований, были отобраны для идентификации секвенированием последовательностей гена 16S рРНК.

Анализ ДНК. ДНК выделяли с использованием набора реактивов AquaPure Genomic DNA Isolation (“Bio-Rad”, США). Ген 16S рРНК был амплифицирован с использованием универсальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'), соответствующих позициям 8–27 и 1510–1492 гена *Escherichia coli*. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе Mastercycler Gradient (“Eppendorf”, Германия), визуализацию и документирование – на трансиллюминаторе Doc Print (“Vilber Lourmat”, Франция). Образцы для определения нуклеотидной последовательности подвергали секвенированию методом Сенгера на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (“Applied Biosystems”, США).

Филогенетический анализ. Определенные секвенированием нуклеотидные последовательности сравнивали с гомологичными последовательностями штаммов из баз данных GenBank, EMBL и DDBJ с помощью программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), выравнивая их с использованием программы ClustalX версии 2.08.

Филогенетический анализ выполнен по модели Джукеса и Кантора в пакете программ TREECON версии 1.3b [31].

Найденные нуклеотидные последовательности (16 микроорганизмов – деструкторов ПГА) депонированы в базе данных GenBank (№№ HQ689679 – HQ689694).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика изменения массы полимерных образцов представлена на рис. 1, свидетельствующем, что на процесс разрушения ПГА оказывали влияние химический состав полимера и место размещения образцов в почве.

Для первого полевого сезона отмечалось существенное повышение температуры почвы от 18°C до 28°C в начальный засушливый период (июль 2007 г.), с постепенным падением до 8–10°C к концу исследований (октябрь 2007 г.). Активная реакция почвы была нейтральной или слабо щелочной под лиственницей (рН 7.1–8.1, с кратковременным уменьшением до 6.7 в конце июля) и слабо кислой (рН 6.1–7.1, с аналогичным падением до 4.5) под березой. Влажность почвы с конца июля до конца сентября была выше под лиственницей (18–28%), чем под березой (11–23%). Для полевого сезона 2010 г. характерна температура почвы 14–18°C в первый месяц наблюдения, с постепенным подъемом до 26°C и последующим спадом до 13–18°C к концу наблюдений. Активная реакция поч-

Таблица 1. Общая численность бактерий в пробах почвы в прикорневой зоне лиственницы и березы

Образец почвы	Общее микробное число, КОЕ в 1 г почвы	
	2007 г.	2010 г.
<i>L. sibirica</i>		
Прикорневая зона в момент размещения ПГА	$(1.47 \pm 0.08) \times 10^9$	$(3.16 \pm 0.24) \times 10^6$
Прикорневая зона в конце сезона	$(5.11 \pm 0.42) \times 10^9$	$(5.28 \pm 1.76) \times 10^7$
Поверхности ПГА	$(1.60 \pm 0.04) \times 10^{11}$	$(1.35 \pm 0.11) \times 10^8$
<i>B. pendula</i>		
Прикорневая зона в момент размещения ПГА	$(1.33 \pm 0.47) \times 10^8$	$(2.67 \pm 0.16) \times 10^5$
Прикорневая зона в конце сезона	$(2.21 \pm 0.24) \times 10^9$	$(6.77 \pm 4.51) \times 10^7$
Поверхности ПГА	$(1.29 \pm 0.08) \times 10^9$	$(1.96 \pm 0.05) \times 10^8$

вы под березой (рН 6.5–7.2) и лиственницей (рН 7.2–8.0) не проявляла заметных колебаний в течение полевого сезона. Влажность почвы была в целом выше, чем в 2007 г., но также заметно ниже в почве под березой.

Исходный микробиоценоз почвы в местах произрастания деревьев двух исследованных видов имел существенные различия по общей численности (табл. 1) и по видовому составу. Общий титр аэробной микрофлоры в начале июня 2007 г. под лиственницей был выше, чем под березой, и составил $(1.47 \pm 0.08) \times 10^9$ КОЕ/г почвы. Через 3 мес. общая численность бактерий в почве под лиственницей составила $(5.11 \pm 0.42) \times 10^9$; под березой – $(2.21 \pm 0.24) \times 10^9$ КОЕ/г почвы соответственно. Численность прототрофов и олиготрофов также была выше в образцах почвы, взятых под лиственницей, в которой коэффициент олиготрофности (ПА/РПА) составил 0.75, что свидетельствовало об активном усвоении и утилизации элементов питания из зоны рассеяния.

Бактериальная компонента микробиоценоза почвы в прикорневой зоне лиственницы была представлена доминантными бактериями *Alcaligenes* (25.0%), *Aureobacterium* (15.9%), *Pseudomonas* (4.5%), *Cellulomonas* (52.3%), *Acinetobacter* (2.3%). Микрофлора почвы под березой представлена более разнообразным микробным сообществом. В качестве доминирующих видов идентифицированы *Pimelobacter* (48.4%), *Actinomyces* (16.1%) и *Micrococcus* (9.7%); в небольшом количестве присутствовали *Flavimonas*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* и *Arthrobacter*. Из микромицетов в почве под лиственницей идентифицированы *Acremonium* (1.8% от общего количества), *Mucor* (5.5%), *Verticillium* (18.2%) и доминирующий *Penicillium* (74.5%). Под березой, помимо характерных для почвы под

лиственницей представителей *Penicillium* и *Verticillium*, идентифицированы *Cladosporium* (1.7%), *Hyphoderma* (1.7%), *Pytium* (3.3%), *Cephalosporium* (8.3%), *Beltrania* (31.7%); в качестве доминирующих определены два вида – *Beltrania* и *Penicillium*. Общий титр грибов был близким под лиственницей и березой.

В более холодном 2010 г. качественная картина микробиоценозов в целом была аналогичной 2007 г., но общая численность микроорганизмов в исходной почве была ниже (табл. 1). Общий титр аэробной микрофлоры в начале июля 2010 г. под лиственницей и березой составил соответственно $(3.16 \pm 0.24) \times 10^6$ и $(2.67 \pm 0.16) \times 10^5$ КОЕ/г. В конце эксперимента общая численность бактерий, по сравнению с данными 2007 г., была ниже на 2 порядка: под лиственницей $(5.28 \pm 1.76) \times 10^7$ и под березой $(6.77 \pm 4.51) \times 10^7$ КОЕ/г почвы.

Отличие почвенных показателей в местах произрастания деревьев и характеристик микробиоценозов оказывали влияние на процесс деградации ПГА (рис. 1а). В 2007 г. в более влажной и более населенной микроорганизмами почве под лиственницей разрушение обоих типов ПГА происходило активнее, чем под березой. К концу наблюдения остаточная масса образцов ПГБ составила 45%, сополимера – 22% от исходной; период полураспада – соответственно 83 и 68.5 сут, при средней убыли массы за полевой сезон – 0.325 и 0.44 мг/сут. В почве прикорневой зоны березы, несмотря на большее разнообразие грибов, разрушение ПГА обоих типов было замедленным. За 109 сут остаточная масса ПГБ и ПГБВ составила соответственно 84 и 74% от исходной (рис. 1б) при средней убыли массы гомополимера и сополимера 0.097 и 0.15 мг/сут.

Сополимер разрушался более активно, чем высококристаллический ПГБ. Это согласуется с ре-

Таблица 2. Показатели степени кристалличности и молекулярной массы образцов ПГА в процессе биodeградации

Условия	2007 г.						2010 г.					
	СК, %, ПГБ	СК, %, ПГБВ	М _в , кДа, ПГБ	ПД, ПГБ	М _в , кДа, ПГБВ	ПД, ПГБВ	М _в , кДа, ПГБ	ПД, ПГБ	М _в , кДа, ПГБВ	ПД, ПГБВ		
Исходное значение	61	50	710 ± 1.5%	2.05 ± 2.1%	799 ± 3.1%	1.77 ± 4.4%	710 ± 1.5%	2.05 ± 2.1%	680 ± 1.1%	2.32 ± 0.3%		
90 сут экспонирования под березой	69	54	691 ± 3%	2.22 ± 6.5%	633 ± 5.4%	2.23 ± 8.6%	704 ± 2.3%	2.32 ± 3.2%	628 ± 5.0%	2.35 ± 2.5%		
90 сут экспонирования под лиственницей	65	68	577 ± 4.6%	2.39 ± 4.1%	660 ± 2.6%	2.41 ± 2.6%	692 ± 2.9%	2.25 ± 3.4%	660 ± 2.6%	2.41 ± 2.6%		

зультатами ряда работ, в том числе нашего коллектива, в которых было показано, что сополимерные образцы ПГА разрушаются в биологических средах быстрее гомополимерного ПГБ [4, 6, 19, 32], однако в другой работе [33] зафиксирована большая скорость биodeградации гомогенного ПГБ по сравнению с ПГБВ, что авторы объяснили особенностями структуры и свойствами поверхности образцов.

В 2010 г. разрушение ПГА было менее активным и к концу наблюдения остаточная масса образцов составила для ПГБ и ПГБВ, экспонированных под лиственницей, соответственно 89.9 и 74%, для образцов, размещенных под березой – 91.4 и 89%. Незначительное падение массы полимерных образцов, имевшее место в 2010 г., не позволило достоверно выявить различия в разрушаемости исследованных типов ПГА.

Факторами, влияющими на биоразрушаемость ПГА, помимо химического состава и температуры среды, являются стереоконфигурация, степень кристалличности полимера и молекулярная масса [10, 34, 35]. В работе исследованы образцы ПГА с различными значениями степени кристалличности (табл. 2). Рентгеноструктурным анализом образцов к концу наблюдения отмечено увеличение степени кристалличности полимеров обоих типов, что служит показателем предпочтительного разрушения (вымывания) аморфной фазы полимеров по сравнению с кристаллической в процессе биodeградации ПГА в почве в исследованных условиях. Это согласуется с рядом работ [13, 35], но отличается от результатов, полученных нами при исследовании разрушения ПГА в морской воде в условиях тропиков, где кристалличность полимерных образцов практически не изменилась [36].

В связи с тем, что свойства полимеров в значительной мере зависят от величины молекулярной

массы, исследованы ее изменения в процессе разрушения образцов ПГА в почве (табл. 2). Для образцов, исследованных в 2007 г. и подвергшихся наибольшей деструкции, отмечено незначительное, но достоверное снижение значения М_в; в 2010 г. существенного изменения М_в не зарегистрировано. Значение полидисперсности полимера возрастало во всех вариантах, что свидетельствовало о деструкции цепей ПГА и изменении соотношения в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости. Это согласуется с данными, полученными нами при исследовании разрушения ПГА в морской воде в тропиках [36], а также другими работами, авторами которых установлено, что между величиной М_в и разрушением ПГА существует прямая связь [3, 37].

ПГА, в отличие от других разрушаемых полимеров (полисахариды, полилактиды), подвергаются истинной биологической деградации клеточным и гуморальным путями под воздействием фагоцитирующих клеток и ПГА-деполимеризующих ферментов, экскретируемых микрофлорой [2].

Сопоставление в конце периода наблюдений данных по общей численности и составу контрольных почвенных микробиоценов и проб, взятых с поверхности полимерных образцов, выявили существенные отличия. В почве под обоими видами деревьев отмечено увеличение численности прототрофов примерно в 3 раза по сравнению с исходной почвой. Возросшая до $(3.81 \pm 0.71) \times 10^8$ КОЕ/г почвы численность олиготрофов под березой свидетельствует о большей активности этой группы микроорганизмов. Напротив, в почве под лиственницей отмечено снижение численности олиготрофов и коэффициента олиготрофности. Возможно, высокая численность гидролитиков (первичных деструкторов органических веществ), имеющая место в почве под лиственницей,

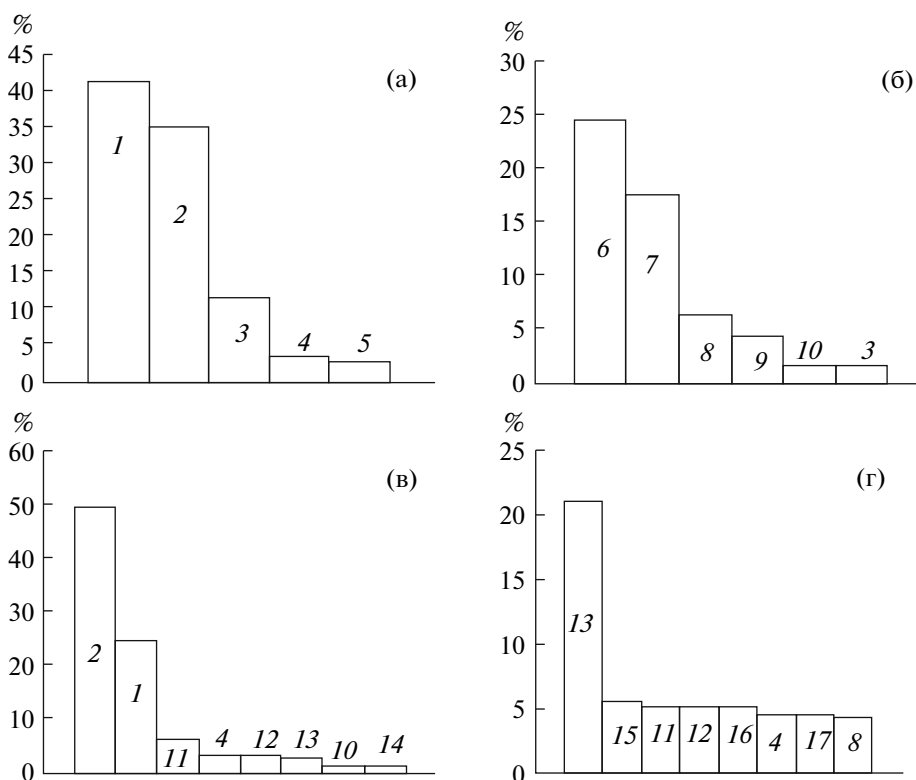


Рис. 2. Доминирующие представители бактерий, выделенные из почвы прикорневой зоны лиственницы (а) и с поверхности полимера (б); прикорневой зоны березы (в) и с поверхности полимера (г) 20.09.2007: 1 – *Micrococcus varians*, 2 – *Micrococcus roseus*, 3 – *Acinetobacter* sp., 4 – *Arthrobacter* sp., 5 – *Bacillus alvei*, 6 – *Agrobacterium* sp., 7 – *Cellulomonas* sp., 8 – *Alcaligenes* sp., 9 – *Aureobacterium* sp., 10 – *Pseudomonas* sp., 11 – *Actinomyces* sp., 12 – *Micrococcus luteus*, 13 – *Bacillus fastidiosus*, 14 – *Flavobacterium* sp., 15 – *Bacillus brevis*, 16 – *Pimelobacter*, 17 – *Nocardia* sp.

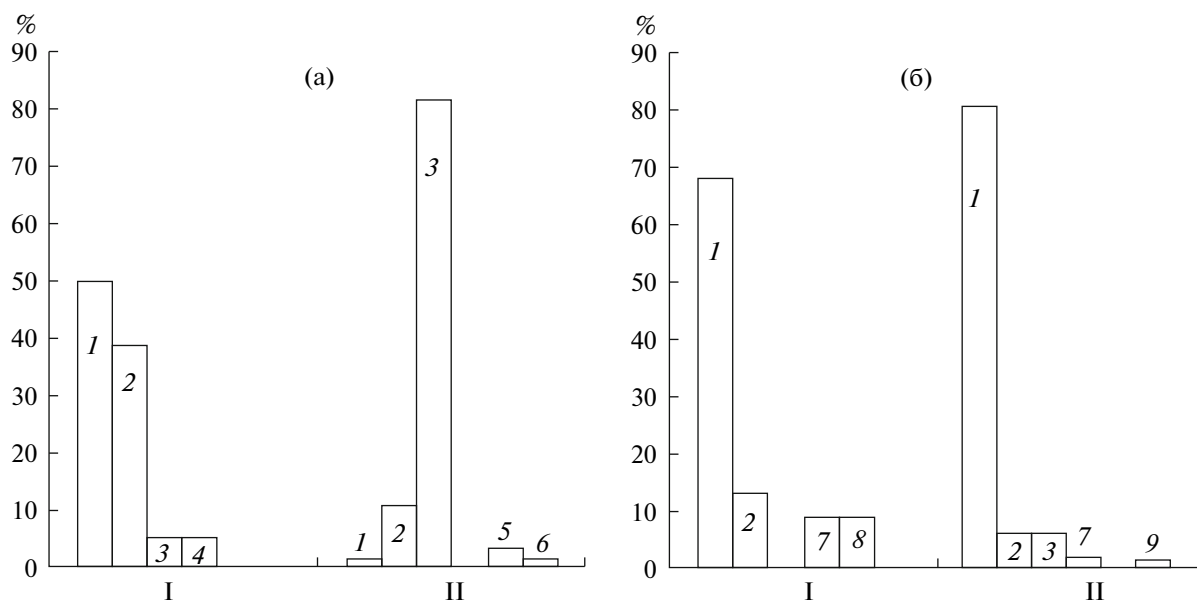


Рис. 3. Основные представители микромицетов, выделенные из почвы прикорневой зоны лиственницы (а) и березы (б): 1 – *Penicillium**, 2 – *Aureobasidium*; 3 – *Paecilomyces**; 4 – *Mycelia sterilia*; 5 – *Acremonium**; 6 – *Zygosporium**, 7 – *Verticillium**, 8 – *Trichoderma*, 9 – *Nigrospora* (звездочкой отмечены истинные деструкторы ПГА); I – контроль, II – на поверхности ПГА.

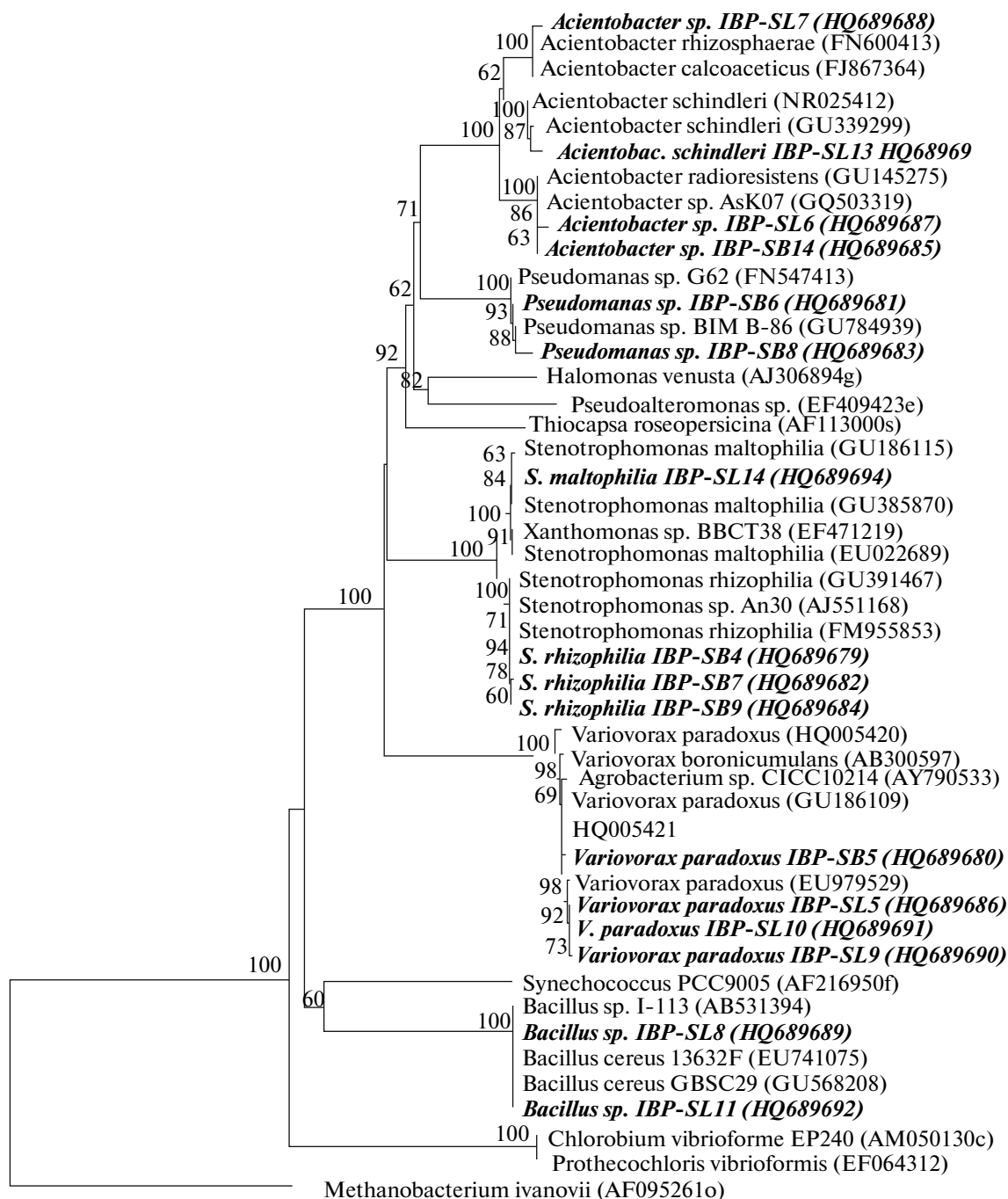


Рис. 4. Филогенетическое положение изученных в работе штаммов бактерий – деструкторов ПГА (выделены курсивом) на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК методом ближайших соседей. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 10 последовательностей. Цифрами показаны значения индекса “bootstrap” 60% и более.

подавляла развитие олиготрофов (микробиоценоза).

Количественные показатели (табл. 1) и качественный состав микроорганизмов (рис. 2), выделенных непосредственно с поверхности ПГА, имели существенные отличия от контрольных образцов почвы. Общая численность микроорганизмов

на поверхности полимерных образцов была на 2 порядка выше в 2007 г. и на порядок в 2010 г. по сравнению с титром контрольной почвы. В контрольных образцах почвы под лиственницей в качестве доминантных определены представители рода *Micrococcus* (рис. 2а); также выделены спорообразующие палочки из рода *Bacillus* и артробакте-

рии. Среди представителей грамотрицательной микрофлоры выделены бактерии из родов *Acinetobacter*, *Flavobacterium* и *Pseudomonas*. В пробах, отобранных с поверхности полимерных образцов (рис. 2б), преобладали представители родов *Agrobacterium* и *Cellulomonas*. В небольшом количестве были представлены роды *Alcaligenes*, *Aureobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Arthrobacter*. Аналогичный результат получен при анализе контрольных и экспериментальных проб почвы в прикорневой зоне березы (рис. 2в, 2г). В контрольной пробе доминировали бактерии рода *Micrococcus* (рис. 2в); на поверхности полимерных пленок преобладали бактерии рода *Bacillus*; также выделены *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Pimelobacter* и *Alcaligenes* (рис. 2г).

К концу вегетационного периода в контрольных образцах из микромицетов присутствовали представители родов *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Aureobasidium*, *Verticillium* (рис. 3) с преобладанием грибов рода *Penicillium*. Это согласуется с данными о доминировании пенициллов среди микромицетов северных почв [26]. В пробах почвы с поверхности полимерных пленок было отмечено увеличение общего числа микромицетов в 36.5 раза в ризосфере лиственницы и в 4 раза в ризосфере березы по сравнению с контролем. Это свидетельствует об активном участии грибов в деградации ПГА, что находит подтверждение в литературе [4, 38, 39].

К настоящему моменту среди активных деструкторов ПГА описаны бактерии различных видов [5, 30, 34], а также грибы [28, 3, 7, 34]. Зачастую при выявлении деструкторов ПГА анализируют микроорганизмы, выделенные из пленок обрастания на поверхности полимеров, экспонировавшихся в почве (компост, вода, и т.д.). Однако среди микроорганизмов могут присутствовать сопутствующие виды, утилизирующие мономеры и другие продукты разрушения высокомолекулярных ПГА, которые появляются в среде благодаря жизнедеятельности истинных ПГА-деструкторов. Для выделения последних необходимо использовать метод прозрачных зон [4], предусматривающий высев проб на минеральный агар, содержащий ПГА в качестве единственного источника углерода.

Исследование выделенных грибов показало, что из 8 идентифицированных таксонов только 5 обладали ПГА-деполимеразной активностью. Образование прозрачных зон было отмечено вокруг колоний представителей родов *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium* и *Zygosporium*). Основными деструкторами ПГА в почве прикорневой зоны лиственницы были представители вида *Paecilomyces lilacinus*, численность которых составила 81.5%, что согласуется с работой других ав-

торов [38]. Среди грибов, локализованных на поверхности ПГА, в ризосфере березы доминировали *Penicillium* sp. БП-1 и БП-2, суммарная численность которых достигала 81%.

На основании сходных морфотипов отобраны 16 штаммов бактерий–деструкторов ПГА, которые были идентифицированы по совокупности морфологических, культуральных, биохимических и молекулярно-генетических признаков. Штаммы IBP-SB5, IBP-SL5, IBP-SL9 и IBP-SL10 отнесены к роду *Variovorax*; штаммы IBP-SB4, IBP-SB7, IBP-SB9 и IBP-SL14 – к роду *Stenotrophomonas*, штаммы IBP-SB14, IBP-SL6, IBP-SL7 и IBP-SL13 – к роду *Acinetobacter*, штаммы IBP-SB6 и IBP-SB8 – к роду *Pseudomonas*, и штаммы IBP-SL8 и IBP-SL11 – к роду *Bacillus* (рис. 4). Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК выделенных штаммов показал высокую степень их гомологии с последовательностями ряда ранее определенных штаммов из базы данных GenBank. Штаммы формируют на дереве (рис. 4) 5 отдельных кластеров; один из них образован бета-протеобактериями рода *Variovorax* (штаммы, относящиеся к *Variovorax paradoxus*), 3 других – гамма-протеобактериями, принадлежащими к родам *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Еще один кластер соответствует грамположительным бактериям рода *Bacillus*.

Выполненные комплексные исследования процесса биоразрушения двух типов ПГА почвенными микробиоценозами различной структуры в течение двух полевых сезонов, различающихся погодными условиями, показали, что на этот процесс оказывали влияние как химический состав полимера, так и характеристика почвы – температура, влажность, микробная составляющая. В процессе разрушения ПГА зафиксировано падение молекулярной массы полимеров, а также повышение степени кристалличности, свидетельствующее о преимущественном разрушении аморфной фазы по сравнению с кристаллической. Установлено, что на поверхности полимерных образцов формируется микробиоценоз, качественно отличающийся от контрольных образцов почвы, в котором доминируют представители грибов рода *Penicillium* и бактерий рода *Micrococcus*. Обнаружено, что среди микроорганизмов, развивающихся непосредственно на поверхности полимерных образцов, наряду с истинными деструкторами, обладающими ПГА-деполимеразной активностью, за счет продуктов гидролиза ПГА активно развиваются сопутствующие бактерии. Среди истинных деструкторов ПГА идентифицировано 20 видов бактерий и 5 видов грибов. В качестве доминантных деструкторов ПГА в исследованных условиях выделены бактерии – представители родов *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*,

Bacillus. В популяции почвенных микромицетов, развивающихся на образцах полимера, доминируют виды – деструкторы ПГА *Penicillium* sp. БП-1, *Penicillium* sp. БП-2 и *Paecilomyces lilacinus*, численность которых достигала 80%.

Работа выполнена при поддержке проекта по постановлению Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор № 11.G34.31.0013), и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 96).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen G-Q. // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. № 8. P. 2434–2446.
2. Kim D.Y., Kim H.W., Chung M.G., Rhee Y.H. // J. Microbiol. 2007. V. 45. № 2. P. 87–97.
3. Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Kevbrina M.V., Kallistova A.Y., Gerasin V.A., Iordanskii A.L., Nozhevnikova A.N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2003. V. 109. № 1–3. P. 285–301.
4. Mergaert J., Webb A., Anderson C., Wouters A., Swings J. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 10. P. 3233–3238.
5. Suyama T., Tokiwa Y., Ouichanpagdee P., Kanagawa T., Kamagata Y. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 12. P. 5008–5011.
6. Woolnough C.A., Charlton T., Yee L.H., Sarris M., Foster J.R. // Polym. Int. 2008. V. 57. № 9. P. 1042–1051.
7. Мокеева В.Л., Чекунова Л.Н., Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Герасин В.А., Бонарцева Г.А. // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. № 5. С. 59–63.
8. Bhatt R., Shah D., Patel K.C., Trivedi U. // Biores. Technol. 2008. V. 99. № 11. P. 4615–4620.
9. Colak A., Güner S. // Int. Biodeterior. Biodegradation. 2004. V. 53. P. 103–109.
10. Nishida H., Tokiwa Y. // J. Environ. Polym. Degrad. 1993. V. 1. № 1. P. 65–80.
11. Mukai K., Doi Y. // RIKEN Review. 1993. №3. P. 21–22.
12. Lim S.-P., Gan S.-N., Tan I. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2005. V. 126. № 1. P. 23–32.
13. Sridewi N., Bhubalan K., Sudesh K. // Polym. Degrad. Stab. 2006. V. 91. № 12. P. 2931–2940.
14. Lopez-Llorca L.V., Colom Valiente M.F., Gascon A. // Micron. 1993. V. 24. № 1. P. 23–29.
15. Yew S.-P., Tang H.-Y., Sudesh K. // Polym. Degrad. Stab. 2006. V. 91. № 8. P. 1800–1807.
16. Chowdhury A.A. // Arch. Mikrobiol. 1963. V. 47. P. 167–200.
17. Brandl H., Puchner P. // Biodegradation. 1991. V. 2. № 4. P. 237–243.
18. Briese B.-H., Jendrossek D., Schlegel H.G. // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 117. № 1. P. 107–112.
19. Mergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J. // J. Environ. Polym. Degrad. 1994. V. 2. № 3. P. 177–183.
20. Патент РФ. 1996. № 2053292.
21. Volova T.G., Kalacheva G.S., Steinbüchel A. // J. Sib. Fed. Univ. Biol. 2008. V. 1. № 1. P. 91–101.
22. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1990. 303 с.
23. Войнова О.Н., Калачева Г.С., Гродницкая И.Д., Волова Т.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 427–431.
24. Определитель бактерий Берджи / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уильямс. М.: Мир, 1997.
25. Вейант Р., Мосс У., Уивер Р., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М. Определитель нетрициальных патогенных грамотрицательных бактерий. М.: Мир, 1999. 1784 с.
26. Егорова Л.Н. Почвенные грибы Дальнего Востока. Гифомицеты. Л.: Наука, 1986. 192 с.
27. Саттон Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Ред. Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди. М.: Мир, 2001. 468 с.
28. Кураков А.В., Новикова Н.Д., Озерская С.М., Дешевая Е.А., Геворкян С.А., Гогинян В.Б. // Авиакосмическая и экологическая медицина, 2007. Т. 41. № 5. С. 49–56.
29. Кондратюк Т.А. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 1. С. 65–66.
30. Delafield F.P., Doudoroff M., Palleroni N.J., Lusty C.J. // J. Bacteriol. 1965. V. 90. № 5. P. 1455–1466.
31. Van de Peer Y., De Wachter R. // Comput. Applic. Biosci. 1993. V. 9. № 2. P. 177–182.
32. Волова Т.Г., Луковенко С.Г., Васильев А.Д. // Биотехнология. 1992. № 1. С. 19–22.
33. Rosa D.S., Filho R.P., Chui Q.S.H., Guedes C.G.F. // Eur. Polym J. 2003. V. 39. № 2. P. 233–237.
34. Jendrossek D., Handrick R. // Annu. Rev. Microbiol. 2002. V. 56. P. 403–432.
35. Abe H., Doi Y., Aoki H., Akehata T. // Macromolecules. 1998. V. 31. № 7. P. 1791–1797.
36. Volova T.G., Boyandin A.N., Vasiliev A.D., Karpov V.A., Prudnikova S.V., Mishukova O.V., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L., Rudnev V.P., Bui Bá Xuân, Vũ Viêt Dũng, Gitelson I.I. // Polym. Degrad. Stab. 2010. V. 95. № 12. P. 2350–2359.
37. Quinteros R., Goodwin S., Lenz R.W., Park W.H. // Int. J. Biol. Macromol. 1999. V. 25. № 1–3. P. 135–143.
38. Sang B.-I., Hori K., Tanji Y., Unno H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. № 2. P. 241–247.
39. Lee K.-M., Gimore D.F., Huss M.J. // J. Polym. Environ. 2005. V. 13. № 3. P. 213–219.

Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates by Soil Microbiocoenoses of Different Structures and Detection of Microorganisms-Destructors

A. N. Boyandin^a, S. V. Prudnikova^b, M. L. Filipenko^c, E. A. Khrapov^c,
A. D. Vasil'ev^d, and T. G. Volova^a

^a Institute of Biophysics, Siberian Branch Russian Academy of Sciences, building 50, Akademgorodok 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia
e-mail: ab@ibp.krasn.ru

^b Siberian Federal University, pr. Svobodny 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

^c Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

^d Kirenskii Institute of Physics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, building 38, Akademgorodok 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

Received April 7, 2011

Abstract—Biodegradation of microbial linear polymers of hydroxyalkanoic acids (polyhydroxyalkanoates, PHAs) by soil microbiocoenoses of different structures has been studied during two field seasons in different weather conditions. This process was shown to be influenced by the polymer chemical composition, temperature, humidity, and the microbial soil component. The PHA degradation was accompanied by a decrease in the polymer molecular weight and an increase in the degree of crystallinity, indicating the preferential destruction of the amorphous phase compared to the crystalline one. The quantity of the true PHA destructors developing at the surface of the polymer samples was lower than the quantity of accompanying bacteria. The dominant PHA destructors under the test conditions were identified as bacteria of the genera *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Xanthomonas* and as micromycetes from *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium*, and *Zygosporium*.

UDC 576.8

DEGRADATION OF POLYISOPRENE RUBBER BY NEWLY ISOLATED *Bacillus* sp. AF-666 FROM SOIL

© 2012 A. A. Shah, F. Hasan, Z. Shah, Mutiullah, and A. Hameed

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad 45320, Pakistan
e-mail: alishah_75@yahoo.com

Received December 24, 2010

Various microorganisms were screened for their ability to degrade polyisoprene rubber (natural rubber latex gloves). Strain AF-666, newly isolated from a soil sample, was selected as the best strain having the ability to grow on polyisoprene containing plates. The strain identified as *Bacillus* sp. AF-666, was found to degrade polyisoprene rubber, both on basal agar plates (latex overlay) as well as in liquid medium. Qualitative analysis of degradation was done through scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. SEM showed changes in surface morphology, like appearance of pits and cracks, and marked difference in transmittance spectra of test and control due to changes in the functional groups, was detected through FTIR. CO₂ evolution as a result of rubber degradation, was calculated gravimetrically by Sturm Test. About 4.43 g/l of CO₂ was produced in case of test, whereas, 1.57 g/l in case of control. The viable number of cells (CFU/ml) was also higher in test than in control. Present study may provide an opportunity for further studies on the applications of biotechnological processes as a tool for rubber waste management.

Rubbers can be used in thousands of ways; in the fabrics, mining, power generation, agriculture, transportation, paper industries, insulation of cables, wires and various equipment of livestock sheds [1]. Natural rubber (NR) consists of C₅H₈ units (isoprene), each containing one double bond in the *cis* configuration [2, 3] and used in manufacturing of polyisoprene and various copolymers. It is a major component of rubber tyres. Billions of discarded tyres are currently stockpiled around the world and there is continuous increase in its number every year. Those tyre stockpiles are hazardous for both health and environmental [4]. Isoprene and chloroprene are listed in the National Toxicology Program's Report on Carcinogens as potential human carcinogens [5]. Extensive study on different aspects of biodegradation of rubbers is required in order to solve the environmental problems due to rubber waste. It is important to understand the necessary requirements and the mechanisms involved in the biodegradation of natural and synthetic rubbers. For this purpose it is important to understand the interactions between materials and microorganisms and the biochemical changes that occur.

Microbial degradation of polyisoprene rubber has been studied by many scientists. It is a slow process, therefore, over weeks or even months of incubation is required to obtain its degradation products for analysis. *Streptomyces coelicolor* 1A formed clear zones of hydrolysis on NR latex overlay plates in 10–12 weeks of period [6]. The analytical data indicated that an oxidative attack at the double bonds of the polymeric chain is the first step in biodegradation of the *cis*-1,4-polyisoprene chain. The degradation products were

analyzed as aldehyde and/or carbonyl groups, isolated from cultures of various rubber-degrading strains [2]. NR latex gloves and raw NR latex were treated with a *Nocardia* strain and a crude extracellular extract of a *Xanthomonas* strain respectively, resulted in the oligomers with molecular masses between 103 and 104 Da. The cleavage of the polymeric chain by oxygenative attack at the double bonds led to the appearance of carbonyl groups for each oligomer at both ends, as detected by nuclear magnetic resonance and Infrared spectroscopy. Some new rubber-degrading strains belonging to the *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* group, such as *Gordonia polyisoprenivorans* strains VH2 and Y2K, *Gordonia westfalica* strain Kb1, and *Mycobacterium fortuitum* strain NF4, *Gordonia polyisoprenivorans* Kd2T (DSM 44302T) were isolated, showing enhanced degradation of NR, NR latex gloves, and synthetic *cis*-1,4-polyisoprene rubber (IR) [7–11]. Another important analytical method that can be used to test the biodegradation of polymers is CO₂ evolution test. Sturm test is used to measure the CO₂ evolved, which gives direct information on the bioconversion of the carbon backbone of the polymer to metabolic end products [12].

In the present study, we reported the isolation of a novel strain of bacteria from soil, showing the ability to degrade polyisoprene rubber. Results obtained from SEM, FTIR and Sturm test are discussed in this article. We have performed tests such as FTIR and Sturm test for the analysis of biodegradation of rubber using this strain which has not been reported previously.

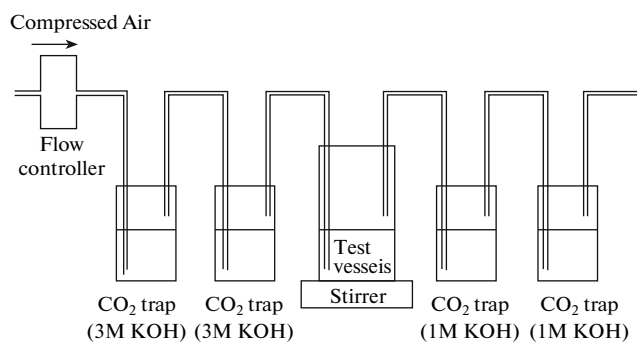


Fig. 1. Schematic diagram of Sturm test.

MATERIALS AND METHODS

Source of rubber. NR latex concentrate (1,4-polyisoprene rubber) was purchased from Sigma-Aldrich (GmbH, Germany). NR latex gloves (polyisoprene rubber) was purchased from BD Chemicals Ltd (UK). All the other chemicals/reagents used were purchased from Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Isolation of rubber degrading microorganisms. Soil samples were collected from solid waste disposal site in Islamabad, Pakistan. To isolate the rubber degrading microorganisms from soil, the NR latex glove pieces were taken in 100 ml of mineral salt medium in 250 ml Erlenmeyer flask and incubated at 37°C at 150 rpm. Mineral medium is composed of (g/l): K_2HPO_4 – 8.0, $(NH_4)_2SO_4$ – 0.5, $MgSO_4$ – 0.2, $CaCO_3$ – 0.5, KH_2PO_4 – 1.0, $MnSO_4$ – 0.0005, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.02, Na_2MoO_4 – 0.0005, $CuSO_4$ – 0.0005, $NaCl$ – 0.1, $ZnSO_4$ – 0.0005, pH 7. After a week, 0.5 ml of culture broth along with latex glove pieces was transferred into the flask containing fresh mineral medium. This step was repeated five times. At the end of experiment, the culture was spread on NR latex overlay plates for single colony isolation. Isolate which showed best growth (AF-666) was stored in 200 g/l glycerol at –80°C.

Identification of rubber degrading microorganisms. The isolate was identified through 16S rRNA gene sequencing. For this purpose, the 16S rRNA gene was amplified from DNA using 27F' and 1494R' bacterial primers. The reaction mixtures for PCR consisted of sample DNA 1 μ l, 10x PCR buffer 2 μ l, deoxynucleoside triphosphate (dNTP) mix 2 μ l, forward and reverse primer 2 μ l each, Ex taq DNA polymerase (Takara Shuzo, Otsu) 0.5 μ l, and distilled water 10.5 μ l. At first, the reaction mixture was incubated at 96°C for 4 min. Then 30 cycles were performed as follows: 96°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min 30 s. Reaction was further incubated for 7 min at 72°C. The PCR product was purified with QiaQuick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequencing was performed using Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied BioSystems, Foster City, CA) and sequence was analyzed using ABI Prism

3100 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, UK). The sequence was read using DNASIS and FinchTV. The complete sequence was compared with other 16S rRNA gene sequences using the BLASTN program in NCBI GenBank database. The sequence of strain AF-666 was deposited in GenBank under accession number FJ481932.

Analysis of biodegradation. Plate assay. In this case the degradation of NR latex concentrate by strain AF-666 was checked through plate assay. For this purpose, NR latex overlay plates were prepared by spreading 20 mg of latex concentrate solubilized in *n*-hexane, and then spread as thin film on mineral agar plates. The solvent was allowed to evaporate. The plates were inoculated with AF-666 and incubated at 37°C.

Growth conditions. NR latex glove pieces (1 g) were added to a 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of the mineral salt medium and inoculated with 5% (v/v) inoculum (Strain AF-666 was prepared in tryptic soya broth at 37°C and 150 rpm for 48 h). The flask was incubated at 37°C at 150 rpm for 3 weeks. The experiment was performed in triplicate. The inoculated mineral medium without latex glove pieces was used as control. The growth of the strain AF-666 was checked at the end of incubation, by measuring its OD_{600} through spectrophotometer.

Staining of latex gloves with Schiff's reagent. The NR latex glove pieces were removed from the flask and stained with Schiff's reagent to detect the formation of aldehyde groups on glove pieces, as the product of polyisoprene degradation. Staining was performed as described previously [13].

Scanning electron microscopy (SEM). The surface topology of the NR latex glove pieces was analyzed through scanning electron microscopy (LEO 440i, Leica, Bensheim, Germany) after culturing incubating in mineral salt medium with strain AF-666 for 3 weeks, to check for any structural changes. The washed pieces of NR latex glove were mounted on the aluminium stubs by silver coating under vacuum by evaporation in order to make the samples conducting. The images of the test (treated) and control (untreated) samples were compared.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). FTIR (FTX 3000 MX Bio Rad Ex-Clibur™ FTIR Series, USA) analysis was done to detect the degradation of NR latex glove after culturing in mineral salt medium, on the basis of changes in the functional groups. The correlation of absorption bands in the spectrum of an unknown compound with the known absorption frequencies was analyzed. The polymer pieces were mixed with KBr and made into a pellet, which was fixed to the FTIR sample plate. Spectra were taken in triplicate at 400 to 4000 wave-numbers cm^{-1} for each sample.

Biodegradation assay through Sturm test. CO_2 evolution as a result of biodegradation of polyisoprene rubber was determined by Sturm Test (Fig. 1). CO_2

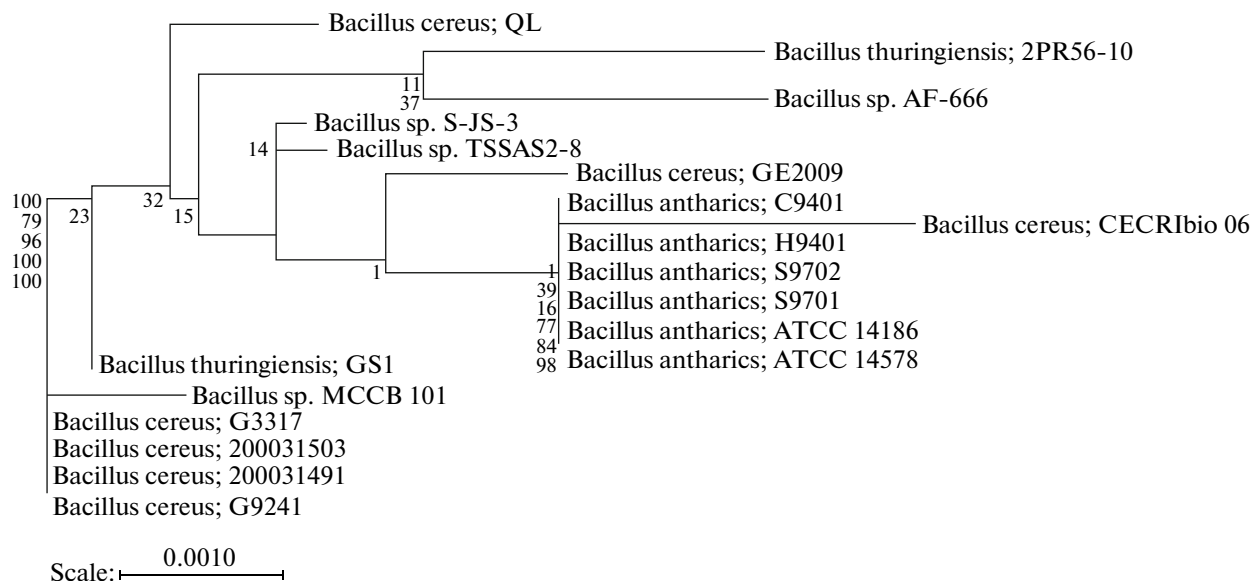


Fig. 2. Phylogenetic positions of strain AF-666 among the neighboring species. The phylogenetic tree was constructed by the method of neighbor joining, based on pair-wise comparisons of 16S rRNA sequences.

evolved as a result of degradation of polymeric chain was trapped in the absorption bottles containing KOH. Barium chloride solution was added to the CO₂ containing KOH bottles and as a result precipitates of barium carbonate (using CO₂ released by breakdown of polymer) were formed. CO₂ produced can be calculated gravimetrically by measuring amount (g/ml) of CO₂ precipitates evolved by addition of BaCl₂. Difference in the weights of precipitates both in test and control was observed [12].

RESULTS

Isolation of rubber degrading microorganisms. Ten bacterial strains isolated from soil were found capable of growing on mineral salt agar-NR latex overlay. Among them, AF-666 was chosen as the best strain, since this strain showed the maximum growth on latex agar plates.

Strain AF-666 was Gram-positive, motile and spore forming rod-shaped bacterium. The other physiological properties of strain AF-666 were as follows: casein, starch, lipid, and gelatin hydrolysis positive; urease-positive; nitrate reduction-positive; citrate positive; oxidase-negative; catalase-positive; indole production-negative. The strain could grow on glucose, lactose, fructose, mannose, and sorbitol but not on raffinose. Based on these characteristics, AF-666 was classified as a novel strain, closely resembling previously reported *Bacillus* sp. AF8 [14]. Strain AF-666 differed from *Bacillus* sp. AF-8 in respect of oxidase and urease productivity and raffinose assimilation.

Identification of polyisoprene rubber degrading microorganisms. The sequencing result of strain AF-666

showed a total of 1.378 kb nucleotides of 16S rRNA. The resultant sequence was matched with those in the NCBI GeneBank and Ribosomal Database Project (RDP). The phylogenetic analysis of the 16S rRNA sequence showed that the strain AF-666 belongs to genus *Bacillus* having 99% similarities with *Bacillus* sp. TSSAS2-8 (Fig. 2).

Biodegradation studies. Plate assay. Clear zones around the strain AF-666 colonies on the opaque mineral agar-latex overlay plates indicated the degradation of latex concentrate. The size of zone increased with the increase in incubation period. Maximum zone of clearance was observed within 25 days of incubation, beyond this period no further increase was observed. The presence of a clear zone around the colony confirmed the presence of extracellular enzymes which degrade the latex concentrate.

Growth estimation. *Bacillus* sp. AF-666 showed best growth in the presence of NR latex glove pieces, the OD increased from 0.098 at the time of inoculation to 1.436 after 3 weeks of incubation.

Staining of latex gloves with Schiff's reagent. Colonies of AF-666 were visualized on the surfaces of NR latex glove pieces at the end of incubation. When stained with Schiff's reagent, the purple color around the colonies proved that isoprene oligomers containing aldehyde groups were produced and accumulated during the microbial degradation of latex glove.

Scanning electron microscopy. The Fig. 3a indicates the surface of control piece (uninoculated) of NR latex glove, which is smooth with no pits. The glove pieces exposed to *Bacillus* sp. AF-666 for 2 weeks, showed a rough appearance unlike that of control. There were numerous irregular cracks, surface ero-

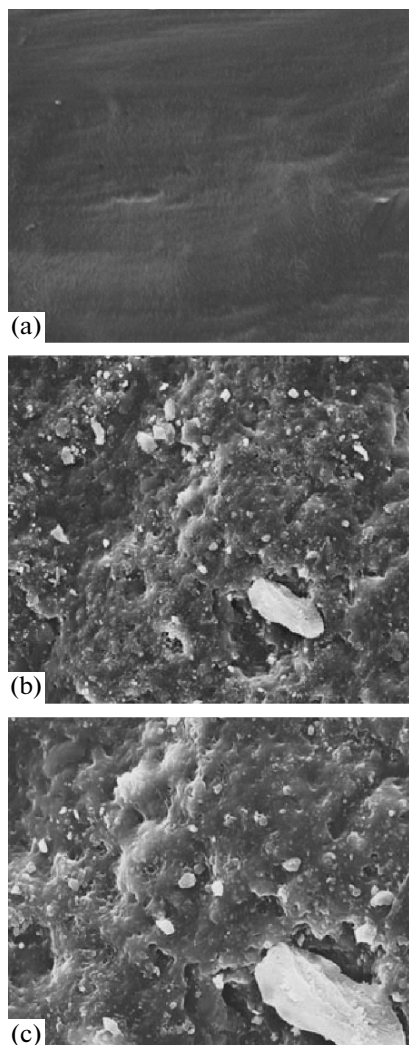


Fig. 3. Scanning electron micrographs of the polyisoprene rubber pieces after incubation in the presence of *Bacillus* sp. AF-666: (a) control (500 \times); (b) test sample (500 \times); (c) test sample (1000 \times).

sions, and pits of variable sizes on the surface of polymer film (Fig. 3b, c).

Fourier transform infrared spectroscopy. FTIR analysis of the microbially treated pieces, showed few changes in the spectra as compared to the control (no exposure to microorganisms). There was decrease in peaks at the region 1200–1400 cm^{-1} in rubber pieces treated with bacterial culture as compared to control, indicating the breakdown of important functional groups like C=C, methyl and ester bonds and the formation of carbonyl functional group as a result of microbial degradation. A peak at 3034 cm^{-1} , present in control, disappeared after microbial treatment in case of test corresponds to CH_2 stretching, the peak at 835 cm^{-1} which corresponds to cis-1, 4 double bond decreased to 834 cm^{-1} after treatment with *Bacillus* sp. AF-666. Changes in the range of 1160 cm^{-1} indicates

formation of aldehydes in case of test pieces as compared to control (Fig. 4).

Carbon dioxide evolution test (Sturm test). At the end of the experiment, gravimetric analysis of CO_2 , evolved in case of test was higher (4.43 g/l), than control (1.57 g/l). The CFU/ml was also higher in case of test (80×10^7) than control (20×10^7), at the end of incubation.

DISCUSSION

The present research work was conducted to isolate the bacterial strains having the ability to degrade rubber. In the present study, bacterial colonies growing on latex overlay basal medium agar plates were selected for this study. Among all the isolates, *Bacillus* sp. AF-666 showed best growth on basal-latex overlay plates. Kalinenko [15] also used the latex overlay technique, and isolated several actinomycetes and fungi, for example, *Aspergillus oryzae* and *Penicillium* species, claiming that they all were able to consume NR obtained from *Taraxacum kok-saghyz* (rubber dandelion).

In the present study, the ability of *Bacillus* sp. AF-666 to degrade NR latex rubber was studied by Schiff's staining, SEM, FTIR and carbon dioxide evolution. Staining with Schiff's reagent revealed the presence of aldehyde groups. Clear purple color formation provided evidence for the occurrence of aldehyde containing degradation products. The isoprene oligomers, aldehyde and ketone groups formation after incubation of latex gloves with *G. polyisoprenivorans*, were detected by staining with Schiff's reagent, whereas the decrease in the number of double bonds in the polyisoprene chain was measured by FTIR-ATR spectroscopy [16].

Berekaa et al. [17] analysed latex glove material through FTIR after removing the *Gordonia* cells mechanically, as overgrown in the form of biofilm on the sample surface. The spectra revealed signals corresponding to those for cis-1,4-polyisoprene in *Hevea*-NR. These spectra exhibited the changes when compared with non-inoculated controls, such as; decrease in cis-1,4 double bonds, the appearance of ketone and aldehyde groups and the formation of two different bonding environments. These observations were finally interpreted as the consequence of an oxidative reduction of the polymer chain, in similar manner to that shown for the *Nocardia* sp. 835A. FTIR spectra showed the formation of aldehydes as well as CH_2 -stretching and reduction in cis-1,4 double bonds. The degradation of NR latex gloves by *Gordonia* strains was analyzed through FTIR-ATR spectroscopy indicated a decrease in the number of cis-1, 4 double bonds in the polyisoprene chain, the appearance of ketone and aldehyde groups in the samples and the formation of two different bonding environments, which was a consequence from an oxidative reduction of the polymer chain length [13].

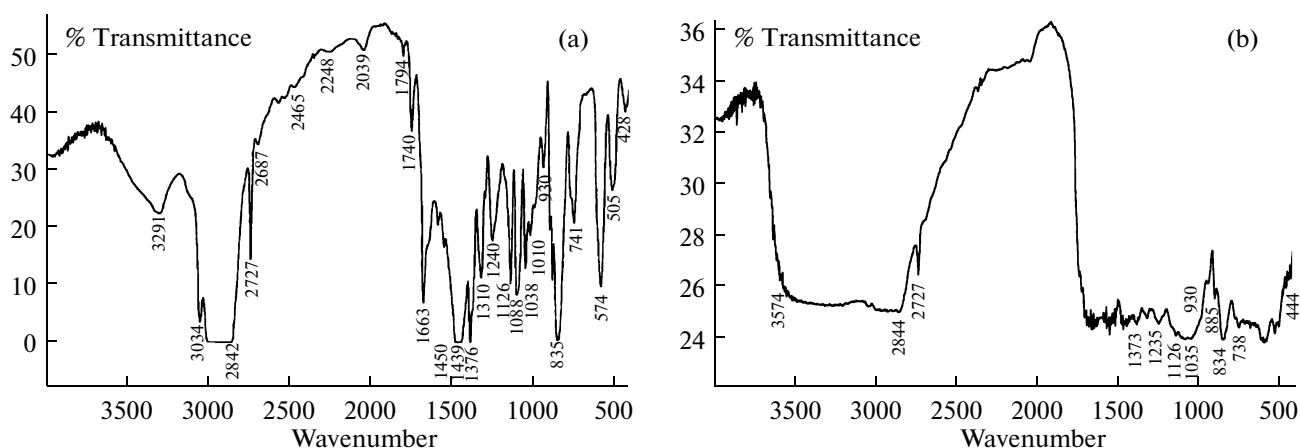


Fig. 4. FTIR spectrum of polyisoprene rubber pieces: (a) control; (b) after bacterial degradation.

In the present study the surface morphology of the polyisoprene rubber showed some changes on the surface, such as pits formation, erosions and roughness, when analyzed through SEM. Deterioration of samples of poly(cis-1,4-isoprene) and poly(trans-1,4-isoprene) by selected strains was verified by SEM after 5 weeks incubation. The surfaces of the Gutta percha (GP) films had almost totally deteriorated; cavities were confluent and separated cavities could hardly be distinguished. Cells of *G. polyisoprenivorans* VH2 caused remarkable deterioration as indicated by the appearance of large cavities in the rubber [18].

CO₂ evolution as a result of rubber biodegradation was determined by Sturm test. The microorganisms breakdown the polymers and the carbon is used for their metabolic activities and result in release of carbon dioxide as end product. The results showed the difference in amount of carbon dioxide produced by the test and the control. More amount of CO₂ was produced in case of test due to the utilization of rubber as a carbon source by microorganisms during their growth. The increased CFU/ml in case of test also proved the ability of microorganisms to utilize rubber and increase in number. Sturm test [19] was commonly employed for evaluation of the biodegradability of polymer materials [20]. Various modifications of this test have been used for the measurement of carbon dioxide evolution during degradation of biodegradable polymers [12], and the aliphatic and aromatic compounds [21]. Keeping in view the findings of these researchers we have employed the similar analytical method to determine the degradation of rubbers and were able to conclude that Sturm test can also be used to check degradation of rubbers.

The phenomenon of biodegradation of rubber can be manipulated for rubber waste management which constitute major portion of solid wastes. Present study on biodegradation may provide an opportunity for fur-

ther studies on the applications of biotechnological processes as a tool for rubber waste management. It can be concluded from the present study that *Bacillus* sp. AF-666 have a significant role in degradation of rubber and also that SEM, FTIR and Sturm test are good analytical tools that could provide the evidence of biodegradation. We have isolated a novel strain and performed tests such as FTIR and Sturm test for the analysis of biodegradation of rubber using this strain which has not been reported previously.

REFERENCES

1. Ahmed, R. and Klundert, A., Lardinois I. Rubber Waste, Options for Small-Scale Resource Recovery, Urban Waste Series 3, Nieuwehaven, Netherlands: TOOL/WASTE, 1996.
2. Rose, K. and Steinbüchel, A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, no. 6, pp. 2803–2812.
3. Tanaka, Y. and Sakdapipanich, J.T., *Biopolymers*, vol. 2. *Polyisoprenoids*, Eds. T. Koyama, A. Steinbüchel, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Press, 2000.
4. Melnick, R.L. and Sills, R.C., *Chem. Biol. Interact.*, 2001, vol. 135–136, pp. 27–42.
5. Begeman, P., Christova-Georgieva, I.N., Sangaiah, H.K., Zhang, D., Golding, T.B., Gold, A., and Swenberg A.J., *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, vol. 17, pp. 929–936.
6. Bode, H.B., Kerkhoff, K., and Jendrosseck, D., *Bio-macromolecules*, 2001, vol. 2, no. 1, pp. 295–303.
7. Arenskotter, M., Baumeister, D., Berekaa, M.M., Potter, G., Kroppenstedt, R.M., Linos, A., and Steinbüchel, A., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, vol. 205, no. 02, pp. 277–282.
8. Arenskotter, M., Broker, D., and Steinbüchel, A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 5, pp. 3195–3204.
9. Linos, A., Berekaa, M.M., Steinbüchel, A., Kim, K.K., Sproer, C., and Kroppenstedt, R.M., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, vol. 52, pp. 1133–1139.
10. Linos, A. and Steinbüchel, A., *Kautsch Gummi Kunstst.*, 1998, vol. 51, pp. 496–499.

11. Linos, A., Steinbuchel, A., Sproer, C., and Kroppenstedt, R.M., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, vol. 49, no. 4, pp. 1785–1791.
12. Muller, R.J., Augusta, J., and Pantke, M., *Mat. Org. Polym.*, 1992, vol. 27, no. 3, pp. 179–189.
13. Linos, A., Berekaa, M.M., Reichelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H., Kroppenstedt, R.M., and Steinbuchel, A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, no. 4, pp. 1639–1645.
14. Shah, A.A., Hasan, F., Akhter, J.I., Hameed, A., and Ahmed, S., *Annals Microbiol.*, 2008, vol. 58, no. 3, pp. 381–386.
15. Kalinenko, V.O., *Mikrobiologiya*, 1938, vol. 17, pp. 119–128.
16. Ibrahim, E.M., Arenskötter, M., Luftmann, H., and Steinbüchel, A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 5, pp. 3375–3382.
17. Berekaa, M.M., Linos, A., Reichelt, R., Keller, U., and Steinbuchel, A., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, vol. 184, no. 2, pp. 199–206.
18. Warneke, S., Arenskötter, M., Tenberge, K.B., and Steinbüchel, A., *Microbiology*, 2007, vol. 153, no. 2, pp. 347–356.
19. Sturm, R.N.J., *J. Oil Chem. Soc.*, 1973, vol. 50, pp. 159–167.
20. Calmon, A., Dusserre-Bresson, L., Bellon-Maurel, V., Feuilloy, P., and Silvestre, F., *Chemosphere*, 2000, vol. 41, no. 5, pp. 645–651.
21. Kim, M.N., Lee, B.Y., Lee, I.M., Lee, H.S., and Yoon, J.S., *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 2001, vol. 36, pp. 447–463.

UDC 576.8

ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FLUORIDE RESISTANT BACTERIA: POSSIBLE ROLE IN BIOREMEDIATION

© 2012 S. Chouhan*, U. Tuteja**, and S.J.S. Flora*

*Division of Pharmacology and Toxicology, Defence Research and Development Establishment, Jhansi Road, Gwalior-474 002, India

**Division of Microbiology, Defence Research and Development Establishment, Jhansi Road, Gwalior-474 002, India
e-mail: address: sjsflora@hotmail.com; sjsflora@drde.drdo.in

Received December 10, 2010

Microorganisms found in industrial effluents and near the sites of the contamination can be used to indicate pollution and detoxify the contaminated water resources. Emergence of xenobiotic resistant bacteria among them might be potential application in bioremediation. The objective of this study was to isolate and characterize fluoride resistant bacteria from soil and water samples of different regions of India. Five isolates were recovered from different samples which were found to be fluoride resistant. Two of them effectively reduced the fluoride from their media. Through the current study it can be predicted that fluoride pollution results in selective pressure that leads to the development of fluoride resistant among bacterial populations, probably through the mechanism which involved high affinity anion binding compounds called ionophores. Resistant microbes may play a bioremediative role by transforming and concentrating these anions so that they are less available and less dangerous.

Every trace element is potentially toxic when safe and adequate exposure is exceeded. Fluoride (F) ion is protoplasmic poison and a very small amount of this element can be tolerated by any living cell and known to cause several biochemical alterations [1]. In many parts of the world, toxic effects of fluoride are a major public health problem resulting mainly from long-term consumption of water with high F levels [2]. Fluoride concentration in drinking water up to 1 ppm is safe for human body but above this limit is considered deleterious to health [3]. It is found to induce oxidative stress and DNA damage, leading to apoptosis and cell cycle changes in rat oral mucosal cells and hepatocytes [4]. It has been established that therapeutic exposure to fluoride may result in their covalent binding to DNA, which may lead to DNA damage and could be an initial event in the process of chemical carcinogenesis [5]. It is a chemically active ionized element which can affect oxygen metabolism and induce the production of O_2^- free radicals [1, 6].

The problem of fluoride concentration in ground water resources has become one of the most important toxicological and geo-environmental issues in India [7, 8]. Treating fluoride-containing wastewater has been an important issue following the development of the various industries. Various physical and chemical techniques are employed for the decontamination of water. In this context, several methods have been proposed to remove F from aqueous solution. Unlike organic pollutants, the toxicity of fluoride ion is inherent in its atomic structure, and it cannot be further trans-

muted or mineralized to a totally innocuous form. However, its oxidation state, solubility and association with other inorganic and organic molecules can vary; microbes as well as higher organisms may play a bioremediative role by transforming and concentrating these anions so that they are less available and less dangerous.

Microorganisms have acquired a variety of mechanisms for adaptation to the presence of toxic elements. Among the various adaptation mechanisms, metal sorption, mineralization, uptake and accumulation, extracellular precipitation and enzymatic oxidation or reduction to a less toxic form, and efflux of xenobiotics from the cell has been reported [9–13]. These mechanisms are sometime encoded in plasmid genes facilitating the transfer of toxic metal resistance from one cell to another [14]. The detoxifying ability of these resistant microorganisms can be manipulated for bioremediation of toxic elements in wastewater. Microbial species, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus*, have been shown to be relatively efficient in bioaccumulation of uranium, copper, lead, and other metal ions from polluted effluents [15–17]. The bioremediation of xenobiotics using microorganisms has received a great deal of attention in recent years, not only as a scientific novelty but also for its potential application in industry. Many plants and bacteria secrete high-affinity anion-binding compounds called ionophores. The ionophores bind specific chemical forms of anions [18, 19]. This anion-ionophore complex is

then absorbed back into the organism for utilization. Such organisms may provide the opportunity to make fluoride less available and less dangerous.

The aim of the study was to isolate, identify and characterize fluoride resistant bacteria that may play a role in bioremediation of excessive fluorides from environments.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. Environmental samples of water and soil were collected from different sites of Gwalior and Morena regions of Madhya Pradesh, India. Fifteen water samples (2 well water, 7 tap water and 6 drinking water supply) from in and around the Defence Research and Development Establishment (DRDE), Gwalior and 10 (5 well water and 5 drinking water supply) from different regions of Gwalior and Morena, were collected in 50 ml in pre-sterilized containers. 5 soil samples (3 from the grounds of Railway station, Morena and 2 from grounds of DRDE, Gwalior); 5 g each were collected in pre-sterilized containers.

Isolation and detection of bacteria from samples. The water samples of well/tap/drinking water were allowed to stay at room temperature (RT) for 2 h for the debris to settle down. 0.5 ml supernatant of each of these samples inoculated into 5 ml brain heart infusion (BHI) broth and incubated at 37°C for overnight. 1 g of soil samples in quantity each was inoculated in 10 ml of sterile 0.05 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 and incubated at RT for 2 h for the debris to settle down. The rest of the procedure was the same as given for water samples.

Adaptation of cultures on media with sodium fluoride. The samples showing turbidity in BHI broth tubes were cultured (100 µl each) on BHI agar media containing different concentrations of sodium fluoride (from 5 mM to 200 mM) and incubated at 37°C overnight. Different colonies were picked up from agar media with 100 mM sodium fluoride and inoculated each in 5 ml BHI broth with 100 mM sodium fluoride. After overnight incubation at 37°C these broth cultures were further sub-cultured on BHI agar plates with the same concentrations of fluoride and incubated at 37°C for overnight. After 3 to 4 consecutive subcultures on media with 100 mM sodium fluoride cultures were subjected to Gram's staining, biochemical characterization, protein profiling by SDS-PAGE and identification of their bacterial origin by 16s rDNA PCR.

Identification of bacterial isolates. Biochemical characterization of bacteria was carried out according to Bergey's manual [20]. Following tests were performed for characterization of isolates.

Methyl red test. To check the ability of bacteria to perform mixed-acid fermentation we used methyl red

test. The test organisms were inoculated in the culture tubes containing sterile glucose (5 g)- phosphate (5 g)-peptone (7 g) mixture prepared in 1.0 l of distilled water. Control tube contained sterile glucose-phosphate-peptone mixture without bacteria. Tubes were inoculated with 100 µl of overnight culture in 5 ml of broth and cultivated at 37°C for overnight. After that 5 drops of methyl red solution were added in each tube and appearance of bright red colour was observed.

Voges-Proskauer (V-P test). V-P test used to detect acetone in a bacterial broth culture. The test organisms were inoculated in the culture tubes containing sterile glucose-phosphate-peptone mixture as described above. Control tube contained sterile mixture without bacteria. Both inoculated and control tubes were incubated at 37°C for overnight. After the incubation was over, 12 drops of V-P reagent and 2–3 drops of reagent V-P 2 were added in each tube. The tubes were agitated gently for 30 s for aeration. The tubes were then kept for 30 min at room temperature. The development of crimson to pink colour in the medium was observed.

Catalase test. Catalase test was performed following the method of Evans and Kloos [21]. One drop of hydrogen peroxide (H₂O₂) solution was placed on the glass slide. Single colony of overnight grown culture was picked up from BHI agar medium and mixed with H₂O₂ drop. Formation of bubbles indicated the presence of catalase.

Oxidase test. Oxidase reagent (1% N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) was prepared. Filter paper was moistened with this reagent. Overnight grown organisms were smeared over the paper with the help of a glass rod or plastic loop or platinum wire. Change in the colour was observed within 10 s. Formation of purple colour shows the presence of oxidase.

Indol test. The test organisms were inoculated in the culture tubes containing sterile 1% peptone. Control tube contained sterile peptone without bacteria. Both inoculated and control tubes were incubated at 37°C for overnight. After that, 1 ml of Kovac's reagent containing isoamyl alcohol (75 ml), *p*-dimethylaminobenzaldehyde (5 g) and concentrated hydrochloric acid (25 ml) was added gently and after 10–15 min red colored ring in the surface alcohol layer of the broth was appeared.

Nitrate reduction test. In order to determine if bacteria can reduce nitrate, the test organism is inoculated into nitrate reduction broth, an undefined medium that contains large amounts of nitrate. Both inoculated and control tubes were incubated at 37°C for 18–24 h. After incubation reagent A (0.8 g sulfanilic acid and 100 ml 30% acetic acid) and reagent B (500 mg N,N-dimethyl-1-naphthylamine and 100 ml 30%

acetic acid) each of 0.5 ml were added. Then 10 µl of zinc (1.0%) was added and results were recorded. Positive test develops as red color after the addition of sulfanilic acid and N,N-dimethyl-1-naphthylamine which disappears on addition of zinc. Negative test means that no color appears after the addition of the same reagents which turns red on addition of zinc.

Triple sugar iron agar test (TSI). To test the ability of bacteria to ferment sugars and to produce hydrogen sulfide we used TSI test. TSI agar medium (HI Media, India) was used to prepare the slants for the test. The test culture was streaked on it and incubated at 37°C for 24 h. Black color developed along the streak line or throughout the medium indicated H₂S production.

Yellow color appeared in the butt shown acid production due to glucose fermentation. Red /pink color of the butt shown no acid production. Yellow color developed in the slant indicated acid production due to lactose or sucrose fermentation of broth. Pink color of the slant indicated that fermentation of lactose or sucrose did not occur.

Protein profiling. SDS-PAGE was carried out for the protein profiling of all the isolates according to the procedure of Laemmli [22]. Overnight-grown broth cultures of all the isolates (1 ml each) were sedimented by centrifugation at 3000 g for 30 min and suspended in 1.0 ml of sterile distilled water. 1.0 ml of 2× sample buffer was added and boiled for 10 min in a water bath for preparation of protein samples. 10–15 µl of the samples along with standard molecular weight markers were loaded on 10% SDS-PAGE. Electrophoresis was carried out initially at 10 mA till the samples crossed stacking gel and then the current was increased to 15 mA till the dye front reached the bottom of the 10% gel. The gel was removed from the plate and stained using Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma, USA) overnight and destained using the destaining solution (acetic acid- methanol- water in the ratio of 10 : 30 : 60) with 2–3 changes till the stained bands were clearly visible.

Amplification of 16Sr DNA. *Chromosomal DNA preparation.* The chromosomal DNA was prepared from 5 ml 24 h- grown cultures of every isolate according to the standard procedure of Maniatis et al. [23]. Briefly, each culture was harvested by centrifugation at 3000 g for 20 min and the pellet was suspended in 1 ml of solution I [25 mM Tris Cl buffer (pH 8.0), containing 10 mM EDTA and 50 mM glucose] followed by 2.0 ml of solution II (0.2 M NaOH, 1% SDS) at RT for 5 min. Then equal volume of phenol–chloroform (2 : 1) was added, vortexed and centrifuged at 18000 g for 15 min to collect the aqueous layer. After that equal volume of chloroform–isoamyl alcohol (24 : 1) was added twice to remove the proteins. DNA from this aqueous layer was precipitated by 1/10th volume of so-

dium acetate and 2 volumes of absolute alcohol at –20°C overnight or at –70°C for 3 h followed by centrifugation at 18000 g for 30 min. The pellet of DNA was suspended in 70% ethanol, air dried and dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 1mM EDTA. The purity of the DNA was checked in gel electrophoresis using 0.8 percent agarose and stored at –20°C until use.

Primers and PCR protocol. Primers for universal regions in 16S rRNA gene for confirmation of bacterial identity were obtained from M/S Genetix (New Delhi). The two universal oligonucleotide primers used to amplify the 16S rRNA samples were as follows: forward primer, 5'-CGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; and reverse primer, 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTGTTACGACTT-3'; annealing temperature was 50°C. An initial denaturation at 95°C for 3 min was followed by denaturation at 95°C for 40 s, annealing at 50°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min. This was followed by a final extension at 72°C for 7 min. Product formation was confirmed by 1% (w/v) agarose gel electrophoresis

Measurement of fluoride content in the medium. Isolates were grown in liquid BHI media as described above. Fluoride content was estimated at the day 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12. Cells were harvested by centrifugation at 2500g for 10 min at 4°C. After centrifugation, supernatants were collected and fluoride content was measured by using Orion ion analyzer (Orion, EA, USA). Since only isolates 1 and 4 were showed extra protein bands in protein profiling only these isolates were used for estimation of fluoride uptake whereas isolate no. 5 was used as a control.

RESULTS

Isolation of fluoride resistant bacteria. BHI broth inoculated water samples (well/tap/drinking) and soil samples of Gwalior and Morena regions showed bacterial turbidity after overnight incubation at 37°C. Following subculture in BHI broth/agar plates supplemented with different concentrations of NaF ranging from 5 mM to 200 mM, the growth was observed only with well water or soil samples. Three isolates were recovered from well water sources, 2 from Gwalior region and one from Morena region while 2 isolates were recovered from soil samples collected from Morena region. No growth was observed with tap/drinking water samples. After 3–4 consecutive subcultures in BHI broth/agar plates supplemented with 5 mM to 200 mM NaF these 5 isolates (isolate 1 and 2 from well water, Gwalior, isolate 3 from well water, Morena, and isolate no. 4 and 5 from soil samples of Morena region) could show their growth till 100 mM concentration of

Table 1. Biochemical testing of fluoride resistant isolates

Isolate no.	Methyl red	Voges-Proskauer test	Oxidase	Catalase	Indol	Nitrate reduction test	Triple sugar iron test*	Organism identified
1	–	+	+	+	–	–	K/K	<i>Micrococcus luteus</i>
2	–	+	+	+	+	–	K/A	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	–	+	+	+	–	+	K/A	<i>Micrococcus varians</i>
4	–	+	+	+	–	–	K/K	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5	+	–	–	+	+	–	A/A	<i>Escherichia coli</i>

* A/A – Glucose, sucrose, lactose fermentation. K/A – Glucose fermentation, no H₂S production. K/K – No acid, no H₂S production.

NaF after which a decline in the growth of these isolates was observed.

Gram staining and biochemical characterization.

Out of the 2 well water isolates of Gwalior region one was found to be gram-positive and the other was found to be gram-negative bacillus. The well water isolate of Morena region was found to be gram-positive and the soil isolates of Morena region were found to be gram-negative cocco bacilli (data not shown). Table 1 depicts results of biochemical testing of all the fluoride resistant isolates. Isolates no. 1, 2, 3, 4 and 5 were identified as *Micrococcus luteus*, *Aeromonas hydrophila*, *Micrococcus varians*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* respectively. Fig. 1 shows the colony of bacterial strains grown on BHI agar in the presence of 100 mM fluoride. Growing colonies are identified as *Micrococcus luteus*, *Micrococcus varians* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Protein Profile. To study the protein profile, all the fluoride resistant isolates were grown in BHI broth with or without 100 mM fluoride, overnight at 37°C. The

proteins were resolved on to 10% SDS-PAGE. Approximately 25–30 bands could be observed with all the isolates after staining. Isolate no. 1 grown in BHI broth with 100 mM fluoride showed the expression of protein at 30 kDa regions in comparison to its growth in BHI broth without fluoride. No significant difference was observed with the protein profiles of isolates no. 2 and 3 when grown in BHI broth with or without fluoride (Fig. 2). Isolate no.4 revealed the expression of three extra protein bands with molecular weights of 20, 22 and 25 kDa in presence of fluoride (Fig. 3).

PCR identification of universal region of 16srDNA in fluoride resistant bacteria. DNA was extracted from all the fluoride resistant bacterial isolates. Optimum concentrations of MgCl₂ and annealing temperatures were worked out on to these DNA for standardization of PCR protocol. Following standardization, optimum amplification of 1.5 kb fragment in DNA samples of all the isolates was obtained with 1.5 mM MgCl₂ and annealing temperature of 50°C for 30 cycles. Presence of DNA can be confirmed by the elec-

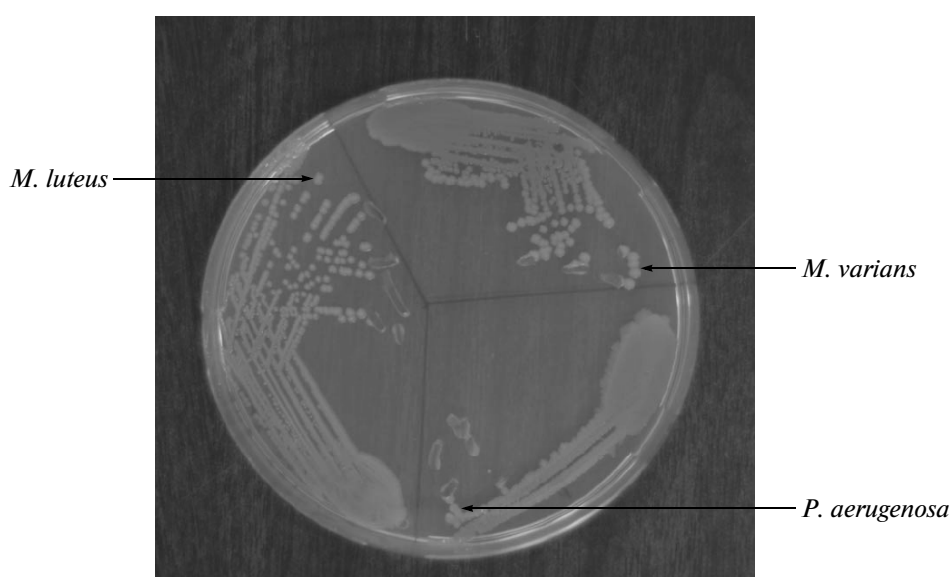


Fig. 1. Growth of fluoride resistant isolates on BHI agar plate with 100 mM NaF.

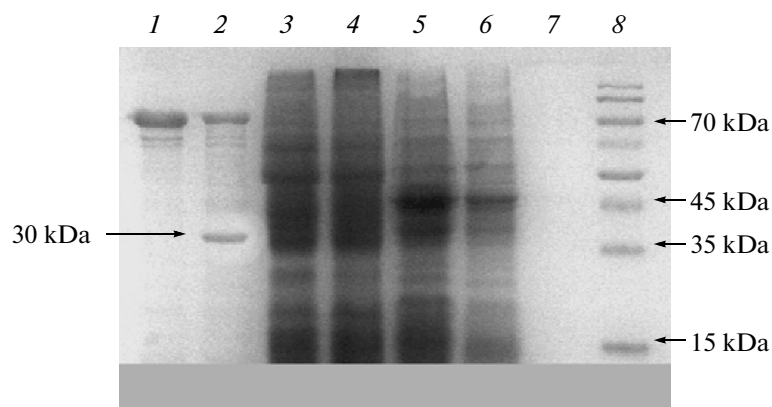


Fig. 2. SDS-PAGE of bacterial isolates grown on the medium with or without fluoride. 1 – isolates no. 1, medium without fluoride; 2 – isolate no. 1, medium with fluoride; 3 – isolate no. 2, medium without fluoride; 4 – isolate no. 2, medium with fluoride; 5 – isolate no. 3, medium without fluoride; 6 – isolate no. 3, medium with fluoride; 7 – control without protein; 8 – molecular weight markers.

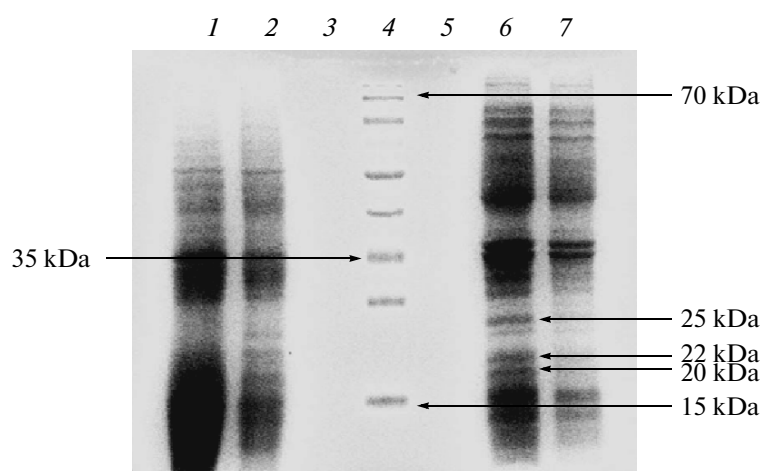


Fig. 3. SDS-PAGE of bacterial isolates grown on the medium with or without fluoride. 1 – isolate no. 5, medium with fluoride; 2 – isolate no. 5, medium without fluoride; 3 – control without protein; 4 – molecular weight markers; 5 – control without protein; 6 – isolate no. 4, medium with fluoride; 7 – isolate no. 4, medium without fluoride.

trophoresis of the PCR product on an agarose gel containing 4 μ l of ethidium bromide (2 mg/ml of distilled water). PCR identification for universal regions in 16S rRNA gene of bacterial isolates confirms the bacterial identity of isolates (Fig. 4).

Fluoride reduction by isolates. Since protein profiling of isolates 1 and 4 revealed different patterns when

grown with and without fluoride, these two isolates were estimated further for the percentage reduction in the fluoride content. Percentage reduction was determined for 7 alternate days i.e. at the day 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12. As indicated in Table 2 the percentage reduction after day 12 through isolate no.1 and 4 were found to be 19.8% and 22.1% respectively whereas iso-

Table 2. Reduction of fluoride by isolates no. 1, 4 and 5

Isolates no.	Reduction in fluoride content (%) after days (0–12)						
	0	2	4	6	8	10	12
1	0.0	0.4	3.4	5.1	10.4	12.8	19.8
4	0.0	1.8	6.1	7.8	13.2	18.3	22.1
5	0.0	0.0	0.5	0.8	1.1	1.4	1.4

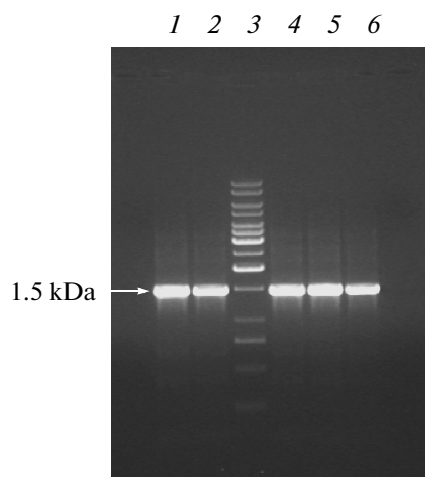


Fig. 4. PCR-amplification of 1.5 kb fragment of 16S rDNA from different bacterial isolates. 1 – isolate no. 1; 2 – isolate no. 2; 3 – 1 kb DNA ladder; 4 – isolate no. 3; 5 – isolate no. 4; 6 – isolate no. 5.

late 5 did not show any difference in the percentage reduction of the fluoride content.

DISCUSSION

Xenobiotics exert their toxic effects on microorganisms through various mechanisms. Tolerant bacteria could survive in these habitats and could be isolated and selected for their potential application in the bioremediation of contaminated sites [24, 25]. In the present study, 5 bacterial isolates which were found to be fluoride resistant were isolated from water and soil samples. The isolates then further identified and characterized by biochemical properties. All the isolates were found to be gram-negative. They were tested for their capability to accumulate fluoride and found to significantly reduce the fluoride content from the media.

Fluoride compounds have been used for many years as additives in toothpaste, mouthwash, and drinking water in order to reduce the incidence of caries. Once entered into the human system fluoride readily gets absorbed through gastrointestinal tract or lungs, based on the route of exposure. Excess to fluoride exposure leads to a disease known as fluorosis. The incidences of fluorosis being recorded at regular intervals in our country imply that the problem of endemic fluorosis is highly pertinent in India and other developing countries. Abnormal levels of fluoride in drinking water and prevalence of hydrofluorosis have been reported in several regions of India [26, 27].

Several methods have been adapted for defluoridation of water. The removal of excessive fluorides from water is usually been accomplished by means of activated clay [28], magnisite [29] and activated carbon from coconut shell impregnated with aluminum ions [30]. However, these existing technologies have the problem of leachates that might alter the water quality,

making it unsuitable for drinking process. These methods could not find any practical application because of high capital and operating cost and complexity of operating procedure. Moreover conventional methods consume high amounts of energy and large quantities of chemical reagents. Bioremediation of toxic xenobiotics has advantageous over other techniques as it is cheap, non destructive and contamination remains localized [31]. It is well recognized that microorganisms have a high affinity for metals and non metals by variety of mechanisms [32, 33]. Since microorganisms have high surface area to volume ratio because of their small size therefore they provide a large contact area that can interact with elements in the surrounding environment [34]. These bacteria are capable of accumulation of xenobiotics and exist in soil and near the site of contamination have adapting mechanisms to the contaminant and such adaptation might allow strains to achieve dominance in a localized habitat. Researches show that several plaque populations like *Actinomyces*, *Neisseria spp.* are capable of initial growth in fluoride [35] Strains of *Streptococcus matins* is capable of *in vitro* growth at levels up to 1.0 mg F/ml. Bacterial cell have the unique property of concentrating fluoride within their cells [36, 37].

Fluoride is more likely to exist with the combination with proton (HF), which can readily cross cell membrane and acts similarly to a proton conductor. Keeping this in mind, microorganisms with the ability to tolerate and reduce fluoride can be employed for the detoxification of environments contaminated with fluoride.

Hence, concerted efforts should be made to develop bioremediation method using microorganisms. Microbial remediation of fluoride may prove to be effective and need attention as it requires no chemicals and microbes are native to the contaminated water. Moreover there is no study undergoing with bioremediation of fluoride contaminant. The present study was undertaken to isolate, identify and characterize microorganisms from environmental samples of water and soil that can to grow in presence of fluoride. Five bacterial strains, 3 from well water supplies and 2 from soil samples collected from Gwalior or Morena regions of India were recovered. These isolates were grown in BHI broth/agar media with or without different concentrations of sodium fluoride ranging from 5–200 mM. Stable resistance to 100 mM fluoride has been demonstrated by all these isolates after three to four consecutive subcultures.

Presumptive identification of these isolates was done by Gram staining and biochemical tests (Table 1). Isolates no.1 and 2 obtained from well water source of Gwalior region were identified as *Micrococcus luteus* and *Aeromonas hydrophyla* respectively. The isolates no. 3 and 4 obtained from well water source of Morena region were identified, as *Micrococcus varians* and *Pseudomonas aeruginosa* respectively. The isolate no. 5 obtained from soil sample collected from Morena region was identified as *E. coli*. 16srDNA PCR employing universal primers further confirmed the simi-

larity of these isolates. The DNA extracted from all these isolates could amplify 1.5 kb universal region of prokaryotic 16S rRNA gene (Fig. 4). A molecular approach based on 16S rDNA is useful in detecting bacterial community structure changes, because these genes are conserved and present in all bacteria [38]. To check out the pattern of protein expression in the present study, the isolates recovered from well water and soil samples of both Gwalior and Morena regions were grown on media supplemented with 100 mM fluoride and proteins were resolved on 10% SDS-PAGE. Staining revealed the appearance of extra protein band at 30 kDa regions in isolate no. 1 grown in media with fluoride in comparison to its growth in media without fluoride. Similarly the isolate no. 4 revealed the expression of three extra protein bands with molecular weights of 20, 22 and 25 kDa when grown in presence of fluoride as compared to its growth in media without fluoride (Fig. 3). In these isolates extra protein bands expressed in response to fluoride may act as ionophores. Many plants and bacteria secrete high-affinity anion-binding compounds called ionophores that can bind specific chemical forms of anions from their environment [18, 19]. One of the important finding of the present study was that both the isolates recovered were able to reduce the fluoride concentration up to a significant level. Reduction was found to be up to 19.8% and 22.1% after 12 days through isolate no. 1 and 4 respectively. Isolate 5 which was used as control did not show any significant change in the fluoride reduction. These results support the hypothesis that the isolates expressing ionophores within the cytosol are found to be efficient in removing fluoride from the media.

The results conclusively suggest that these bacteria actively reduce fluoride contamination that may provide opportunity to develop a new bioremediation technique for extracting excess of fluoride in a simple way. These organisms may play a bio-remedial role by transforming and concentrating the fluoride anions from the environments so that they are less available and less toxic. However, the present study deals in the restricted domain of identifying the fluoride concentrating microbes and not on the development of bio-remedial system for the purpose. Thus we further recommend that after fluoride accumulation, removal of these cultures must be an integral part of bio-remedial process for reducing fluoride burden of water-bodies.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Dr. R. Vijayaraghavan, Director of the establishment for his support and encouragement. Swapnila Chouhan thanks Defense Research and Development Establishment, Gwalior for a Senior Research Fellowship.

REFERENCES

- Eren, E., Ozturk, M., Mumcu, E.F., and Canatan, D., *Toxicol. Ind. Hlth.*, 2005, vol. 21, no. 10, pp. 255–258.
- Hanaa, A., Mokhtar, I., and Yousef, B., *Fd. Chem. Toxicol.*, 2009, vol. 47, no. 9, pp. 2332–2337.
- Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride, and Fluorine (F). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, 1993.
- He, L.F. and Chen, J.G., *World J. Gastroenterol.*, 2006, vol. 12, no. 7, pp. 1144–1148.
- Zhang, M., Wang, A., Xia, T. and He, P., *Toxicol. Lett.*, 2008, vol. 179, no. 1, pp. 1–5.
- Chouhan, S., Lomash, V., and Flora, S.J.S., *J. Appl. Toxicol.*, 2010, vol. 30, no. 1, pp. 63–73.
- Susheela, A.K., Bhatnagar, M., Vig, K., and Mondal, N.K., *Fluoride*, 2005, vol. 38, no. 2, pp. 98–108.
- Misra, U.K., *Neurol. India*, 2010, vol. 58, no. 2, pp. 338–507.
- Hussein, H., Moawad, H., Farag, S., *Arab. J. Biotech.*, 2004, vol. 7, no. 1, pp. 13–22.
- Mergeay, M., *Trends Biotechnol.*, 1991, vol. 9, no. 1, pp. 17–24.
- Hughes, M.N. and Poole, R.K., *J. Gen. Microbiol.*, 1991, vol. 137, no. 4, 725–734.
- Nies, D.H., *Plasmid*, 1992, vol. 27, no. 1, pp. 17–28.
- Joshi-Tope, G.A. and Francis, J., *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, no. 8, pp. 1989–1993.
- Silver, S. and Phung, L.T., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1996, vol. 50, pp. 753–789.
- Mullen, M.D., *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, vol. 55, no. 12, pp. 3143–3149.
- Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.A.Z., Talbi, M., and Blaghen, M., *Curr. Microbiol.*, 1999, vol. 41, no. 3, pp. 151–156.
- Gupta, A., Phung, L.T., Taylor, D.E., and Silver, S., *Microbiology*, 2001, vol. 147, pp. 3393–3402
- Dolowy, K., *Cell. Biol. Mol. Lett.*, 2001, vol. 6, no. 2A, pp. 343–347.
- Kim, K.S., Cui, C., and Cho, S. J., *J. Phys. Chem. B*, 1998, vol. 102, no. 2, pp. 461–463.
- Holt, J.G., *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Baltimore (1st edition), 1984.
- Evans, J.B. and Kloos, E.W., *Appl. Microbiol.* 1972, vol. 23, no. 2, pp. 326–331.
- Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.
- Rajbhansi, A., *Our Nature*, 2008, vol. 6, no. 1, pp. 52–57.
- Wasi S., Jeelani G., and Ahmad M., 2008, *Chemosphere*, vol. 71, no. 7, 1348–1355.
- Wodeyar, B.K. and Sreenivasan, G., *Curr. Sci.*, 1996, vol. 70, pp. 71–74.
- Aithani, P.B., Gurjar, R., Banerji, R., Balaji, B.K., Ramachandran, S., and Singh, R. *Curr. Sci.*, 1998, vol. 74, no. 9, pp. 773–777.

28. Arulananthan, A., Ramakrishna, T.V., and Balasubramanian, N., *Ind. J. Env. Protect.*, 1992, vol. 12, no. 7, pp. 531–536.
29. Singano, J.J., Mashauri, D.A., Dahi, E., and Mtalo, F.W., In: *Proceedings of the First International Workshop on Fluorosis and Defluorosis of Water* / Eds. D. Eli and B. Henrik. Ngurdoto, Tanzania, ISFR, 1995.
30. Doble, M. and Kumar, A., *J. Hydr. Engg.*, 2006, vol. 132, no. 1, pp. 116–117.
31. Vidali, M., *Pure Appl. Chem.*, 2001, vol. 73, no. 7, pp. 1163–1172.
32. Harrison, J.J., Rabie, M., Turner, R.J., Badry, E.A., Sproule, K.M., and Ceri, H., *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2006, vol. 55, no. 3, pp.479–491.
33. Pas, M., Milacic, R., Draslar, K., Pollak, N., and Raspor, P., *Biometals*, 2004, vol. 17, no. 1, pp. 25–33.
34. Ledin, M., *Earth Sci. Rev.*, 2000, vol. 51, no. 1–4, pp. 1–31.
35. Bowden, G. H. W., Odlum, O., Nolette, N., and Hamilton, I. R., *Infect. Immun.*, 1982, vol. 36, no. 1, pp. 247–254.
36. Beighton, D. and McDougll, W.A., *J. Dent. Res.*, 1977, vol. 56, pp. 1185–1191.
37. Beighton, D. and Colman, G., *J. Dent. Res.*, 1976, vol. 55, no. 5, pp. 875–878.
38. Moyer, C.L., Dobbs, F.C., and Karl, D.M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, no. 4, pp. 1555–1562.

UDC 576.8

CHARACTERIZATION OF THE FUNGICIDAL ACTIVITY OF *Calothrix elenkinii* USING CHEMICAL METHODS AND MICROSCOPY

© 2012 C. Natarajan*, R. Prasanna*, V. Gupta*, P. Dureja**, and L. Nain*

*Division of Microbiology, Indian Agricultural Research Institute (IARI), New Delhi - 110012, India

**Division of Agricultural Chemicals, Indian Agricultural Research Institute (IARI), New Delhi – 110012, India

e-mail: radhapr@gmail.com

Received May 24.2011

An investigation was directed towards biochemical characterization of cyanobacterium *Calothrix elenkinii* and analysis of the chemical nature and mode of action of its fungicidal metabolite(s) against oomycete *Pythium debaryanum*. Biochemical characterization of the culture in terms of carbohydrate utilization revealed the facultative nature of *C. elenkinii*. Unique antibiotic markers were also found for this strain. 16S rDNA sequencing of the strain revealed 98% similarity with *Calothrix* sp. PCC7101. The fungicidal activity was tested by disc diffusion assay of different fractions of the culture filtrate. A minimum inhibitory concentration of 10 µl was recorded for ethyl acetate fraction of the 7-weeks old culture filtrates. HPLC, followed by NMR spectral analysis demonstrated the presence of a substituted benzoic acid in the ethyl acetate fraction. Microscopic examination revealed distinct granulation, followed by disintegration of the hyphae of *Pythium* sp., indicating the presence of an active metabolite in the culture filtrates of *Calothrix* sp. The fungicidal activity of *C. elenkinii* can be attributed to the presence of 3-acetyl-2-hydroxy-6-methoxy-4-methyl benzoic acid. This is the first report of a benzoic acid derivative having fungicidal activity in cyanobacteria.

Cyanobacteria comprise the only coherent group of prokaryotes which proliferate both in eutrophic and oligotrophic type of marine and freshwater habitats. Besides these habitats, they are widespread in tropical/temperate rice fields, in which they play a significant role in the maintenance of soil fertility [1]. They have been identified as one of the most promising group of organisms, which produce a wide range of biologically active and novel secondary metabolites such as cyclic peptides, alkaloids and lipopolysaccharides [2–4]. The production of secondary metabolites gives a competitive advantage to these microorganisms for survival in diverse environmental conditions.

Research on biological control of plant pathogens has increased considerably over the past years due to public concern about the use of hazardous chemical pesticides. A number of cyanobacteria belonging to genera *Anabaena*, *Nostoc*, *Microcystis* exhibit algicidal, antibacterial and antifungal properties [3, 5]. The antifungal cyclic peptides – laxaphycin A and B are known to be produced by *Anabaena laxa* [6]. *Calothrix fusca* was found to produce calophycin, a cyclic decapeptide compound of 1248 Da molecular weight, exhibiting fungicidal activity [7].

In this study, we used *Calothrix elenkinii* strain which had shown fungicidal activity against *Rhizoctonia bataticola*, *Pythium aphanidermatum* and *Pythium debaryanum* [8, 9]. The aim of the study is to investigate the mode of action and chemical nature of the fungicidal metabolite(s) of *C. elenkinii*.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions. *Calothrix elenkinii* strain (CCC 124) was originally isolated from the rice fields of Indian Agricultural Research Institute (New Delhi, India) and tested for fungicidal activity against phytopathogenic fungus *Pythium debaryanum* ITCC 95 taken from Indian Type Culture Collection, Division of Plant Pathology, Indian Agricultural Research Institute. The cyanobacterial strain was axenized by standard procedures employing a set of antibiotics [10]. Cultivation of *C. elenkinii* was done in nitrogen free BG-11 medium [11] at 28 ± 2°C under light: dark cycle (16 : 8 h) and intensity of white light 5W m⁻². The fungal culture was grown [8, 9], and maintained in potato dextrose agar at 28°C in BOD incubator (Colto, India)

Characterization of *C. elenkinii*. The antibiotic sensitivity profile of *C. elenkinii* was generated by taking 5 ml of homogenized suspension of the axenic culture, mixing well with 0.8% top agar by vortexing and plated on the solidified bottom agar (1.2%) on Petri dish with diameter (9 mm). The agar plates were allowed to solidify and incubated under optimal conditions of light and temperature. After 5 days, 5 mm discs containing different antibiotics (HiMedia Laboratories, India) were placed on the cyanobacterial lawn and zones were recorded up to 10 days of incubation.

In order to characterize the strain, in terms of carbohydrate utilization pattern, 50 µl of the cell suspension of the axenized late log phase (21 d) culture of *C. elenkinii* was inoculated in each well of HiCarbohy-

drate Kit (HiMedia Laboratories, India). Different sets were incubated in 16 : 8 light: dark cycle and continuous dark conditions (24 h) and colour changes were recorded according to manufacturer's instructions.

The amount of protein in pellet and filtrate of different age culture was determined spectrophotometrically with bovine serum albumin as standard [12].

16S rDNA analysis. DNA isolation was done using Plant Ultra Clean DNA isolation kit (MoBio, USA) and quantified by Alpha Imager Gel Documentation system 1220 (Alpha Innotech Corporation, USA). PCR amplification and agarose gel electrophoresis were performed according to standard procedures [13]. DNA ladders were purchased from MBI Fermentas (Burlington, Canada) and all PCR related chemicals were obtained from Bangalore Genei (India). PCR amplification of the 16S rDNA was performed by the same set of primers as used earlier [14–16]. PCR amplification was done using 10 ng genomic DNA. PCR conditions consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, 30 cycles at 95°C (2 min), 42°C (30 s), and 72°C (2 min), plus one additional cycle with a final 10 min chain elongation. The single bands of desired amplicons were excised from the gels, purified using gel extraction kit (Qiagen, USA) and sequenced directly using the same set of primers as used for amplification. The CAP program was used for sequence assembly [17].

In silico analysis of 16S rDNA sequences of *C. elenkinii* was done by NCBI BLASTN program [18]. Multiple sequence analysis was made with available 16S rDNA sequences of different *Calothrix* species from the NCBI data base, using CLUSTALW software. The phylogenetic tree in the form of dendrogram was generated using the neighbor-joining method and maximum-parsimony algorithms as implemented in the program MEGA package version 4.1 [19].

Disc diffusion assay for antifungal activity. The cell pellet and filtrate of culture of different ages (1 to 7 weeks) were separated by centrifugation at 6,000 g for 10 min. The cells in pellet were broken down by sonication (at output 2 s pulse, 50% duty cycles, output control setting 8 for 2 min using Labsonic L.B. Braun Sonicator Biotech International, Germany) and used to evaluate fungicidal activity by disc diffusion assay [3]. The inhibition zone formed was evaluated as positive for antifungal activity and its diameter (in mm) was measured. The culture filtrates were also tested by the same procedure. The culture filtrates were then partitioned using ethyl acetate as solvent and both the phases were used for disc diffusion assay to determine the nature of solubility of the toxic compound.

Microscopy. Microscopic examination was also undertaken in order to investigate the mode of antifungal action of sample using phase contrast light microscope attached with Canon Power Shot S50 Digital Camera and Canon utilities Remote Capture Version

2.7.2.16 software (Japan). The lactophenol cotton blue stained hyphal specimens were observed at 40X magnification.

Minimum Inhibitory concentration (MIC). MIC was determined in microtitre plates using 50 µl obtained from 1 ml of filtrate generated using 10 mg dry biomass of organism. The samples included culture filtrates and the solvent and aqueous phases of 1 ml culture filtrate extracted with equal volume of ethyl acetate. Different dilutions of the filtrates and extracts were tested keeping the final volume as 50 µl. *Pythium debaryanum* grown in PDA plates was removed and suspended in sterile water (100 mg of fungal hyphae/ml sterile water) before use as inoculum. Microtitre plates were prepared with 200 µl of PDA per well and inoculated with 50 µl of homogenized fungal inoculum. After 1 day of growth at 28°C, 50 µl of different age culture filtrate(s) of *C. elenkinii* were inoculated along with controls of ethyl acetate (50 µl), nystatin (100 U/50 µl) and sterile water (50 µl). Inhibition was observed visually after 2 days of incubation and scored for calculation of MIC and IC₅₀.

Chemical characterization of fungicidal compound. The cell free filtrates (from 1–7 weeks old cultures of *C. elenkinii*) were analyzed using preparative thin layer chromatography (TLC). For partial purification of fungicidal compound, ethyl acetate fraction of cell free filtrate (from 6- and 7-weeks old culture) was condensed using Rotary vacuum film evaporator (Perfit, India) kept at 500 mm Hg at 45°C. The extract was dissolved in acetone and separated by TLC (Silica gel 60, Merck, USA) using different solvent systems containing benzene-acetone (45 : 5) and n-hexane-benzene (1 : 1). The different fractions obtained were eluted using acetone (90%), tested for fungicidal activity against *Pythium* sp. and purified.

Samples were also analyzed by HPLC (Varian Prostar, UK) with an RP₁₈ reverse phase column (4.5 cm length) as stationary phase and methanol-water (80 : 20 v/v) as mobile phase maintained at a flow rate of 1 ml min⁻¹ with the detector wavelength set at 270 nm.

The spectra were generated using ¹H-NMR and ¹³C-NMR, in the Division of Agricultural Chemicals, IARI, (New Delhi, India). The proton nuclear magnetic resonance spectra were recorded using Varian EM 360L (60 MHz), and Bruker 400 AC (400 MHz) instruments (USA). All 1D and 2D spectra were obtained using the standard Bruker software (Bruker AVANCE-400 NMR with TopSpin 1.3 software). The samples were dissolved in a deuterated CHCl₃. Tetramethyl silane Si(CH₃)₄ was used as internal standard reference signal. The observed chemical shifts (δ) were recorded in ppm and the coupling constant (J) was recorded in Hz. Several modern NMR techniques were performed in order to elucidate the structure of isolated compound [20].

Biochemical characterization of *C. elenkinii* in terms of utilization of different compounds

Compound	Utilization pattern		Compound	Utilization pattern	
	light	dark		light	dark
Lactose	–	–	Inulin	–	+
Xylose	–	–	Sodium gluconate	–	–
Maltose	–	–	Glycerol	–	–
Fructose	–	–	Salicin	–	–
Dextrose	–	–	Glucosamine	–	+
Galactose	+	+	Dulcitol	–	–
Raffinose	–	–	Inositol	–	–
Trehalose	–	–	Sorbitol	–	–
Melibiose	–	–	Mannitol	–	–
Sucrose	–	+	Adonitol	–	–
L-Arabinose	–	+	α - Methyl-D-glucose	–	–
Mannose	+	+	Ribose	+	–
Rhamnose	–	–	Malonate	+	+
Melezitose	–	–	Sorbose	–	–
α - Methyl-D-mannoside	–	–	Lysine utilization	+	+
Xylitol	–	–	Ornithine	+	+
ONPG	+	+	Urease production	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	Phenylalanine deamination	+	+
D-Arabinose	–	–	Nitrate reduction	+	+
Citrate	+	+	H ₂ S production	–	–

The Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS) was carried out using Thermo Electron LC-MS spectrometer (Thermo Electron Corporation, USA). Detection of mass was done by electron spray ionization (ESI) source with Finnigan LCQ tune plus program fitted with MAX-detector. Xcalibur software (Thermo Finnigan LCQ LC/MS/MS Classic, USA) was used for the purpose of identification, quantification and fragmentation of required masses. The MS parameters were optimized in direct infusion mode; spray voltage: 3–5 to 5 kV, sheath gas flow rate 10 ml min⁻¹, auxiliary gas flow rate 5 ml min⁻¹, spray current 0.5, capillary temperature 225°C, capillary voltage 20–35 V and tube lens offset 40–65.

Statistical analysis. Standard deviation (SD) values were calculated using SPSS version 10.0 and depicted in the graphs as error bars.

RESULTS

Biochemical characterization of *C. elenkinii*. The biochemical characterization using chromogenic system revealed that *C. elenkinii* utilized mannose, citrate, lysine, ornithine and ONPG (O-nitrophenyl β -D-galacto-pyranoside) in light and dark conditions of incubation. Besides that esculin hydrolysis, urease production, phenylalanine deamination and nitrate

reduction were observed under both the conditions. A very slow rate of utilization of sugars (>48 h) such as galactose, sucrose, L-arabinose, and glucosamine during dark incubation and galactose and ribose during light incubation was also recorded (Table).

The *Calothrix* strain was also characterized in terms of its resistance and susceptibility to a set of 20 antibiotics. The cyanobacterium was found to be highly sensitive to metronidazole (5 μ g) and zone of inhibition was observed within 24 h, while carbenicillin (100 μ g) led to inhibition of cyanobacterial growth within 3 days of incubation. Distinct zones were produced only after 6 to 9 days of incubation in the case of streptomycin (100 μ g), tetracycline (30 μ g) and erythromycin (10 μ g). On the other hand, *C. elenkinii* was not sensitive to amoxicillin (10 μ g), amphotericin (20 μ g), ampicillin (20 μ g), chloramphenicol (10 μ g), gentamycin (10 μ g), kanamycin (30 μ g), lincomycin (2 μ g), nalidixic acid (30 μ g), novobiocin (5 μ g), penicillin (10 μ g), polymixin B (50, 300 μ g), rifampicin (30 μ g), spectinomycin (100 μ g) and trimethoprim (25 μ g).

16S rDNA analysis. The PCR amplification for 16S rDNA of *C. elenkinii* generated a 1197 bp sequence (the sequence has been deposited in GenBank with Accession no. GU29083) which showed 98% sequence similarity with *Calothrix* sp PCC 7101 gene 16S rDNA

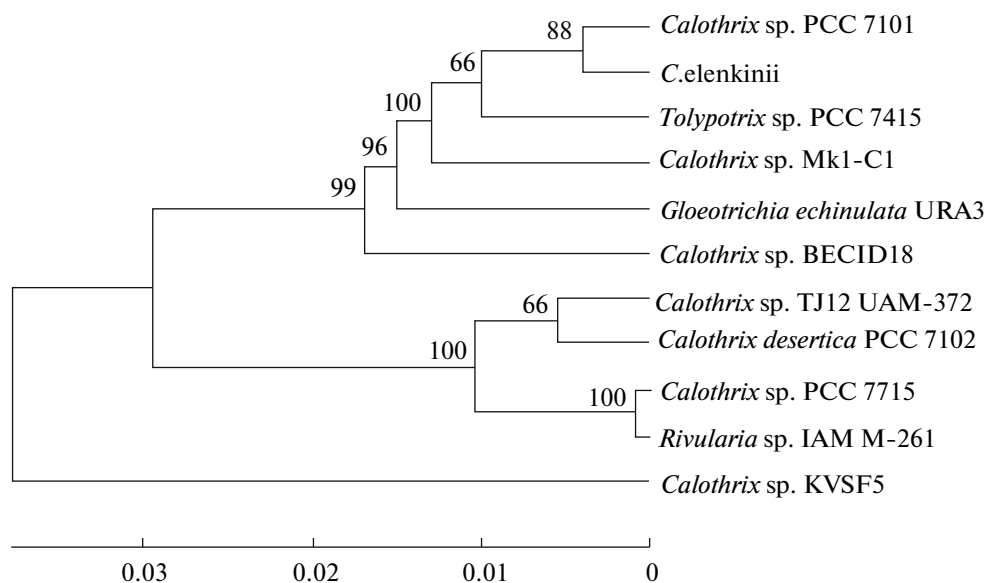


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences from different *Calothrix* sp. and related genera using neighbour joining method. The data of sequences other than *Calothrix elenkinii* are taken from GenBank.

partial sequence (Accession No. AB325535.1). Multiple sequence alignment with CLUSTAL W showed that the *C. elenkinii* 16S rDNA sequence obtained in this study was closely related to *Calothrix* sp. PCC 7101 (Fig. 1).

Disc diffusion assay. An investigation was undertaken to test the fungicidal activity of sonicated cell pellet, culture filtrate and ethyl acetate fraction of culture filtrate by disc diffusion assay. The ethyl acetate fraction from 6 and 7 weeks old cultures showed the highest inhibition zone of 16.5 and 17 mm respectively (Fig. 2).

Microscopy. The microscopic examination of the fungal hyphae from the inhibition zone of growth produced by the culture filtrate and ethyl acetate fraction

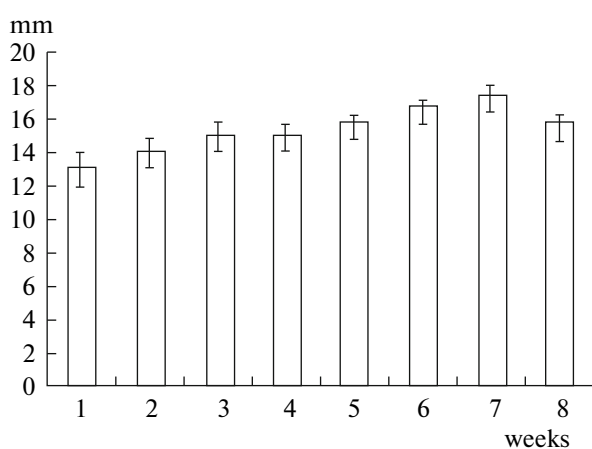


Fig. 2. Influence of culture age on fungicidal activity (measured as zone of inhibition) of *C. elenkinii*.

of culture filtrate of *C. elenkinii* was undertaken. Distinct ultra structural changes such as granulation of cytoplasm, degeneration and disintegration of the hyphae and dissolution of internal contents were clearly visible as compared to control (Fig. 3a–3c).

Minimum Inhibitory concentration (MIC). MIC was observed in 10 μ l of ethyl acetate fraction of cell free filtrate of 7-weeks old culture followed by 1.5 μ l of cell free filtrate of seven week culture. The IC_{50} was equal to 0.5 μ l of ethyl acetate fraction of 7-weeks old cell free filtrate (data not shown).

Chemical characterization of fungicidal compound. TLC analysis of the cell free filtrates from 1–7 weeks old cultures revealed a single band only in the samples from 6- and 7-weeks old cultures. A R_f value of 0.85 was recorded which exhibited fungicidal activity (data not shown). After resolution through HPLC, a compound with retention time of 4.43 min was revealed.

The 1H -NMR spectrum of the HPLC purified fraction revealed the presence of an aromatic proton at δ 6.2 (one proton), δ 3.85 (3H, singlet OCH_3), δ 2.4 (3H, singlet $COCH_3$), δ 1.9 (3H, singlet CH_3). The ^{13}C -NMR revealed peaks of 196 corresponding to carbonyl group ($C=O$), 176 (COO); 169, 159, 149, 117 and 100 (aromatic carbon); 107 (aromatic CH); 57 aliphatic group (CH_3); 23 (aliphatic CH_3); 12 (aliphatic CH_3). The mass spectrum showed molecular ion peak at m/z 224. Based on these data the corresponding compound responsible for fungicidal activity was identified as 3-acetyl-2-hydroxy-6-methoxy-4-methyl benzoic acid (Fig. 4).

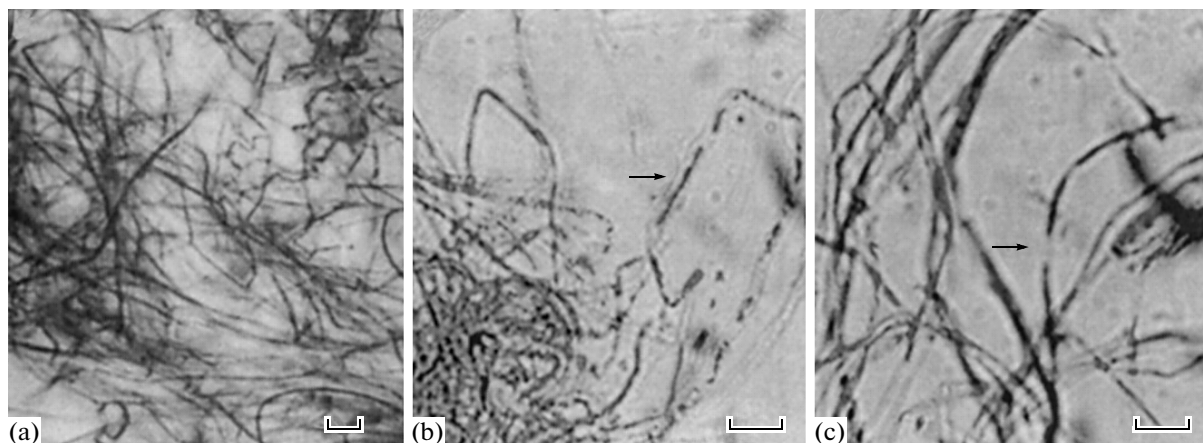


Fig. 3. Microscopic analysis of the effect of cell free filtrate and solvent fraction on the morphology of *P. debaryanum*: (a) control, (b) effect of cell free filtrate, (c) ethyl acetate fraction. The horizontal bars represent 50 μm .

DISCUSSION

Soil borne fungal pathogens are a scourge to most agriculturally important crops and cause severe monetary losses, especially in vegetables. *Pythium* spp. which lead to severe economic losses by causing diseases in seedling nurseries are the most notorious among them. Many cyanobacteria have been found to produce bioactive molecules which show antifungal/fungicidal activity [3]. The genus *Calothrix* is known to be a rich source of valuable bioproducts including pigments and fatty acids, besides biocidal molecules [21]. In the course of our investigations, we have isolated and identified a *C. elenkinii* strain, which exhibits fungicidal activity [9] and its biocontrol potential has been demonstrated against damping of disease of solanaceous vegetables under controlled conditions in the National Phytotron Facility, IARI [8]. Therefore, a need was felt to identify the most potent age of the culture and chemical nature of fungicidal compound, as a prelude to formulating an effective biocontrol agent, using this organism and its metabolites.

Biochemical characterization and antibiotic profiling can serve as markers for *C. elenkinii* for its future use as a biocontrol agent. In our study, the *Calothrix* strain was found to utilize a large number of sugars in light and dark. The genus *Calothrix* is known to be a facultative photoautotroph, with ability to grow in dark under heterotrophic conditions [22], which was in consonance with our studies. The potential to grow heterotrophically in the dark seems to be widespread amongst *Calothrix* sp. than for cyanobacteria in general. The *C. elenkinii* strain was also sensitive to metronidazole, carbenicillin, streptomycin, tetracycline and erythromycin, and resistant to the other antibiotics tested.

A polyphasic approach was utilized to investigate a set of isolates (which included *Rivularia* and *Calothrix* genera) with a high degree of trichome tapering [23]. Analysis of the PC operon (phycocyanin), intervening intergenic spacer (*cpcBA*-IGS) and 16S rRNA gene se-

quence revealed great heterogeneity and the need for revising the classification of these genera. In our study, 16S rDNA sequencing revealed high level of similarity with the *Calothrix* sp. PCC 7101 sequence available in database.

Disc diffusion assay revealed that 6- and 7-weeks cultures showed the greatest fungicidal activity. This is indicative of the fact that the compound(s) responsible for this activity may be a gradually secreted like chitinase in *Pseudomonas aeruginosa* [24] or a secondary metabolite such as norharmaline produced during the late exponential phase or stationary phase in batch cultures of *Nostoc insulare* [25]. Cyanobacterial metabolism depends strongly on environmental factors such as light, temperature, salt concentration and also on the nutrient supply to a greater extent. The production of biocidal compounds by *Anabaena* sp. and *Calothrix* sp. was found to be dependent on the light intensity, temperature, phosphorus concentration and pH of the medium [9]. In older cultures, the change in nutrient concentrations may also lead to qualitative and quantitative changes in the production of secondary metabolites [26]. In the present study, maximal fungicidal activity was observed in ethyl acetate fraction of 7-weeks old culture filtrate (18 mm diameter inhibition zone).

Microscopic observations revealed that the cyanobacterial metabolite from *Calothrix* sp. induced diverse morphological abnormalities in the encountering hy-

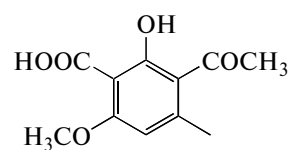


Fig. 4. Molecular structure of the main compound having fungicidal activity isolated from *C. elenkinii* – 3-acetyl-2-hydroxy-6-methoxy-4-methyl-benzoic acid.

phae of the test organism. Such observations have been earlier reported in studies with *Bacillus subtilis* which is known to produce lipopeptides that induce novel structures, composed of aggregates of lipopeptide and solubilized cell wall in fungi [27], and also recorded in *Pythium* sp. [28]. Our microscopic studies of interaction of the metabolite revealed that most fungal hyphae had lost their cytoplasmic content, as reported earlier for *Fusarium oxysporum*-*Bacillus theobromae* interaction [29].

A major part of the cyanobacterial secondary metabolites are peptides or peptidic substructures, they are synthesized by nonribosomal peptide synthetase or nonribosomal peptide synthetase/polyketide synthase hybrid pathways [30]. Lyngbyabellin B is a cyclic hexapeptide containing two thiazoles and modified octanoic acid [31]. Earlier studies have shown that simple brominated phenols are produced by *Calothrix brevissima* [32]. Other *Calothrix* strains have also been reported to contain heterocyclic quinone compounds which exhibit biocidal activity against malarial parasite and human HeLa cancer cells by inhibiting the RNA polymerase activity [33]. Calophycin, cyclic decapeptide has also been isolated from *Calothrix fusca* which showed antifungal activity against *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* at very low concentrations [7].

This is the first report on the presence of benzoic acid related compounds in cyanobacteria. Benzoic acid is known to exhibit antifungal activity against several fungi, including *Fusarium moniliforme*, *Penicillium* sp. and *Candida* sp. [34, 35]. The presence of benzoic acid derivatives opens up a new perspective on the nature of fungicidal metabolites from cyanobacteria. These substances are widely used in preservation of food as an antifungal agent and in the treatment of fungal skin infections because of their keratolytic activity. Benzoate is also reported to bring about a lowering of intracellular pH, leading to inhibition of phosphofructokinase, glycolysis and growth in yeasts [36]. Therefore, in our investigation, the fungicidal activity can be attributed to the benzoic acid derivative present in the ethyl acetate fraction of the culture filtrate, which may inhibit growth followed by slow disintegration of the fungal mycelia.

Further work is being undertaken to construct a genomic library of *Calothrix elenkenii*, identify, sequence and validate genes responsible for the production of benzoic acid derivative.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Post Graduate School and Director, Indian Agricultural Research Institute (New Delhi, India) for providing for fellowship towards Ph.D program of C. Natarajan. The study was also partly funded by the AMAAS Network Project on Microorganisms, granted by the Indian Council of Agricultural Research (ICAR), New Del-

hi. We are extremely grateful to Dr. V. Ramamurthy and project staff of Network Project on Insect Biosystematics in the Division of Entomology for the microscopic work. We are thankful to the Division of Agricultural Chemicals and Division of Microbiology, IARI, New Delhi for providing necessary facilities for undertaking this study.

REFERENCES

- Mandal, B., Vlek, P.L.G., and Mandal, L.N., *Biol. Fertil. Soils.*, 1999, vol. 27, no. 4, pp. 329–342.
- Jaiswal, P., Prasanna, R., and Singh, P.K., *Can. J. Microbiol.*, 2008, vol. 54, pp. 701–717.
- Prasanna, R., Lata, N., Tripathi, R., Gupta, V., Middha, S., Joshi, M., Ancha, R., and Kaushik, B.D., *J. Basic Microbiol.*, 2008, vol. 48, pp. 186–194.
- Prasanna, R., Sood, A., Jaiswal, P., Nayak, S., Gupta, V., Chaudhary, V., Joshi, M., and Natarajan, C., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010, vol. 46, no. 2, pp. 133–147.
- Namikoshi, M. and Rinehart, K.L., *J. Indus. Microbiol.*, 1996, vol. 17, no. 5–6, pp. 373–384.
- Frankmole, W.P., Larsen, L.K., Caplan, F.R., Patterson, G.M.L., Knubel, G., and Moore, R.E., *J. Ant.*, 1992, vol. 45, no. 9, pp. 1451–1457.
- Moon, S.S., Chen, J.L., Moore, R.E., and Patterson, G.M.L., *J. Org. Chem.*, 1992, vol. 57, no. 4, pp. 1097–1103.
- Manjunath, M., Prasanna, R., Lata, Dureja, P., Singh, R., Kumar, A., Jaggi, S., and Kaushik, B.D., *Arch. Phytopathol. Plant Protect.*, 2010, vol. 43, no. 7, pp. 666–677.
- Radhakrishnan, B., Prasanna, R., Jaiswal, P., Nayak, S., and Dureja, P., *Biologia*, 2009, vol. 64, no. 5, pp. 881–889.
- Kaushik, B.D. *Laboratory Methods for Blue Green Algae*, New Delhi: Associated Publ. Co., 1987.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandal, M., and Cohen-Bazire, G., 1971, *Bacteriol. Rev.*, vol. 35, no. 2, pp. 171–305.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, pp. 265–275.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J., *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, no. 2, pp. 697–703.
- Nubel, U., Pichel, F.G., and Muyzer, G., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol. 63, no. 8, pp. 3327–3332.
- Song, T., Martensson, L., Eriksson, T., Zheng, W., and Rasmussen, U., *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005, vol. 54, no. 1, pp. 131–140.
- Huang, X. and Madan, A., *Genome Res.*, 1999, vol. 9, no. 9, pp. 868–877.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W., and Lipman, D.J., *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, pp. 403–410.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S., *Mol. Biol. Evol.*, 2007, vol. 24, no. 8, pp. 1596–1599.

20. Braun, S., Kalinowski, H.-O., and Berger, G., 150. and More Basic NMR Experiments : a Practical Course / S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger. 2nd Ed. Weinheim : Wiley-VCH, 1998.
21. Olvera-Ramirez, R., Cedillo, M.C., Villanueva, R.O.C., Jeronimo, F.M., Noyola, T.P., and Leal, E.R., *Biore-source Technol.*, 2000, vol. 72, no. 2, pp. 121–124.
22. Huang, T.C. and Chow, T.J., *Bot. Bull. Academia Sinica*, 1992, vol. 33, pp. 23–31.
23. Berrendero, E., Perona, E., and Mateo, P., *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 2008, vol. 58, pp. 447–460.
24. Folder, J., Algra, J., Roelofs, M.S., Van Loon, L.C., Tommasse, N.J., and Bitter, W., *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, no. 24, pp. 7044–7052.
25. Volk, R.B., *J. Appl. Phycol.*, 2007., vol. 19, no. 5, pp. 491–495.
26. Armstrong, J.E., Janda, K.E., Alvarado, B., and Wright, A.E., *J. Appl. Phycol.*, 1991, vol. 3, no. 3, pp. 277–282.
27. Etchegaray, A., Bueno, C.C., de Melo, I.S., Tsai, S.M., Fiore, M.F., Silva-Stencio, M.E., Moraes, L.A.B., and Teschke, O., *Arch. Microbiol.*, 2008, vol. 190, no. 6, pp. 611–622.
28. Deora, A., Hashidoko, Y., and Tahara, S., *J. Basic Microbiol.*, 2008, vol. 48, no. 2, pp. 71–81.
29. Swain, M.R., Ray, R.C., and Nautiyal, C.S., *Curr. Microbiol.*, 2008, vol. 57, no. 5, pp. 407–411.
30. Christiansen, G., Dittmann, E., Via Ordorika, L., Rip-pka, R., Herdman, M., and Borner, T., *Arch. Microbiol.*, 2001, vol. 176, no. 6, pp. 452–458.
31. Luesch, H., Yoshida, W.Y., Moore, R.E., and Paul, V.J., *J. Nat. Prod.*, 2002, vol. 63, no. 10, pp. 1106–1112.
32. Pedersen, M. and DaSilva, E.J., *Planta* (Berl.), 1973, pp. 115, no. 1, pp. 83–86.
33. Rickards, R.W., Rothschild, J.M., Willis, A.C., deC-hazal, N.M., Kirk, J., Kirk, K., Saliba, K.J., and Smith, G.D., *Tetrahedron.*, 1999, vol. 55, no. 47, pp. 13513–13520.
34. Rittich, B., Pirochtova, M., Hrib, J., Jurtikova, K., and Dolezal, P., *Czech. Chem. Commun.*, vol. 57, no. 5, pp. 1134–1142.
35. Lopez, A., Ming, D.S., and Towers, G.H.N., *J. Nat. Prod.*, 2002, vol. 65, no. 1, pp. 62–64.
36. Krebs, H.A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., and Bed-doya, F., *Biochem. J.*, 1983, vol. 214, no. 3, pp. 657–663.

УДК 577.152: 577.113: 579.252

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *Penicillium canescens* С ВЫСОКОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К ГИДРОЛИЗУ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

© 2012 г. П. В. Волков*, А. М. Рожкова*, А. Г. Правильников*, Р. М. Андрианов*, Г. С. Доценко**, А. О. Беккаревич***, А. В. Кошелев***, О. Н. Окунев***, И. Н. Зоров*, А. П. Сеницын**

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071
e-mail: inbi@inbi.ras.ru

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119999
e-mail: info@rector.msu.ru

***Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пуцино, 142290,

Поступила в редакцию 11.03.2011 г.

Получены ферментные препараты на основе рекомбинантных штаммов *Penicillium canescens*, обладающие активностью целлобиогидролазы I, II, эндо-1,4-β-глюканазы *Penicillium verruculosum* и β-глюкозидазы *Aspergillus niger*. Показано, что для наиболее эффективного гидролиза измельченной осиновой древесины оптимальным соотношением ферментных препаратов целлобиогидролазы и эндо-1,4-β-глюканазы является 8 : 2 (по белку). Установлено также, что необходимым компонентом ферментного комплекса для гидролиза гемицеллюлозной матрицы осиновой древесины является гомологичная ксиланаза, секретируемая грибом *Penicillium canescens*.

Возрастающий дефицит запасов ископаемого сырья вынуждает проводить поиск альтернативных источников энергии, рассматривать использование возобновляемого растительного сырья, в том числе различных видов древесины, соломы и другие отходы промышленности и сельского хозяйства для получения биотоплива.

Один из способов превращения растительного сырья в полезные продукты заключается в его ферментативном гидролизе и дальнейшей (био)конверсии сахаров в органические кислоты и их производные, аминокислоты, эфиры, спирты (биотопливо) и другие продукты [1]. Глубокая биоконверсия целлюлозосодержащего растительного сырья в сахара осуществляется под действием полиферментного комплекса карбогидраз, включающего эндоглюканазы, целлобиогидролазы и β-глюкозидазы (целлобиазы). Качественный и количественный состав этого комплекса, а также активность входящих в него ферментов, определяют эффективность гидролиза целлюлозосодержащих субстратов. Следует учитывать, что для каждого конкретного вида растительного сырья существует оптимальное соотношение ключевых гидролитических ферментов, позволяющее достигать наиболее глубокой конверсии с максимальным выходом сахаров [2].

Ранее было установлено, что мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* секретирует комплекс гидролитических ферментов, таких, как целлобио-

гидролаза I и II (ЦБГ I и ЦБГ II) и эндоглюканаза II (ЭГ II), обладающих высокой осаживающей активностью [2]. Однако β-глюкозидаза *P. verruculosum*, являющаяся одним из ключевых ферментов целлюлозного комплекса и осуществляющая гидролиз промежуточного продукта конверсии целлюлозы — целлобиозы до глюкозы, является минорным ферментом и не обладает достаточной высокой активностью по отношению к целлобиозе, в отличие от β-глюкозидазы *Aspergillus niger* [3]. Более того, штамм *P. verruculosum* характеризуется относительно длительным временем культивирования и требует осуществления процесса ферментации с подпиткой, что затрудняет контроль процесса культивирования.

Одним из подходов к созданию полиферментного комплекса карбогидраз, имеющего оптимальное соотношение целлюлолитических ферментов для гидролиза конкретного вида растительного сырья, является использование смесей ферментных препаратов (ФП), каждый из которых обладает повышенной активностью определенного фермента, необходимого компонента комплекса [4]. Такие ФП можно получать на основе рекомбинантного штамма гриба *Penicillium canescens*, являющегося лабораторной моделью для получения штаммов-продуцентов целевых ферментов. По сравнению с другими грибами данный штамм имеет ряд преимуществ: обладает более высокой скоростью роста и синтеза внекле-

точных ферментов; штамм выращивается на простой и дешевой среде со свекловичным жомом; процесс ферментации легко масштабируется; получен штамм-реципиент с ауксотрофным признаком селекции; отработана система экспрессии и трансформации штамма экзогенной ДНК [5].

Цель работы – получение ФП на основе штаммов *P. canescens* с гетерологичной экспрессией ЦБГ I и II, ЭГ II *P. verruculosum* и β -глюкозидазы *A. niger* (БГЛ), а также оптимизация состава препарата для эффективного осахаривания модельного субстрата – микрокристаллической целлюлозы, а также природного сырья – измельченной осинового древесины.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали *P. canescens* PCA10 (Δ niaD) – ауксотрофный штамм по гену *niaD*⁻, ответственному за синтез фермента нитратредуктазы, реципиентный для плазмидной трансформации. Штамм *P. verruculosum* 221-151 использовали для выделения геномной ДНК, являющейся матрицей для амплификации генов *cbh1*, *cbh2*, *egl2*, кодирующих ЦБГ I, ЦБГ II, ЭГ II соответственно. Штамм *Aspergillus niger* – для выделения геномной ДНК, являющейся матрицей для амплификации гена *bgl1*, кодирующего синтез БГЛ.

Ферментные препараты. Использовали сухие ФП, полученные лиофильным высушиванием культуральных жидкостей исходного штамма *P. canescens* PCA-10 и рекомбинантных штаммов с гетерологичными генами *cbhI* (РСА-ЦБГ I), *cbhII* (РСА-ЦБГ II), *eglI* (РСА-ЭГ II) *P. verruculosum* и *bglI* (РСА-БГЛ) *A. niger*, выращенных на среде, содержащей (%): свекловичный жом – 3.0, пептон – 5.0, KH_2PO_4 – 2.5. Культивирование проводили в 1 л ферментерах в течение 5 сут при 28°C. Сухие ФП были получены в ИБФМ РАН (Пушино, Россия).

Определение биохимических характеристик. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в 12%-ном ПААГ в присутствии Na-ДДС на приборе Mini Protean (“Bio-Rad”, США). Белковые полосы в гелях окрашивали ку-масси бриллиантовым синим G-250 (“Ferak”, Германия). Перед электрофорезом исследуемые растворы ферментов предварительно обрабатывали 1%-ным ДДС-Na и 5%-ным β -меркаптоэтанолом при 100°C в течение 5–10 мин. В качестве стандартов использовали смесь белков MW-SDS-118 (19–118 кДа, “Fermentas”, Литва).

Определение ферментативных активностей. Активность ферментов определяли по отношению к МКЦ (целлобиогидролаза), Na-соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) (эндоглюканаза), глю-

куроноксилазу березы (ксиланаза) при 50°C и рН 5 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС). Концентрацию ВС определяли методом Шомоди–Нельсона [6]. Концентрация полисахаридного субстрата в реакционной смеси составляла 5 г/л.

Активность ферментов по отношению к п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозиду (ПНФГ) определяли по начальной скорости образования п-нитрофенола (ПНФ) по методике [7]. Раствор 0.05 М субстрата в 0.1 М, Na-ацетатном буфере, рН 5.0, инкубировали с ферментом при 40°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1.0 М раствора Na_2CO_3 . Образовавшийся в растворе ПНФ определяли спектрофотометрически при 400 нм, используя коэффициент молярного поглощения.

Активность целлобиазы определяли, инкубируя 2.5 мМ раствор целлобиозы с ферментом и отбирая пробы для определения концентрации глюкозы через 5, 10 и 15 мин. Концентрацию глюкозы (Г) определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом [6].

Активность ферментов выражали в международных единицах. За 1 единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при действии ферментов на соответствующий субстрат.

Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта БСА.

Определение моно-, ди- и олигосахаридов в гидролизатах измельченной осинового древесины. При гидролизе осинового древесины ферментными препаратами через 48 ч реакции отбирались пробы. Анализ сахаров в пробах проводили с использованием хроматографической системы Agilent 1100 (“Agilent”, США) с электрохимическими детектором Coulochem III (“ESA”, США) с колонкой CarboPac PA-20 (“Dionex”, США). Образцы наносили в 7 мМ растворе NaOH. Илюцию проводили в изократическом режиме в течение первых 7 мин, затем линейным градиентным до 40 мМ NaOH в течение 15 мин. Детектирование проводили в режиме пульсирующей амперометрии (+100 мВ 400 мс, –2000 мВ 20 мс, +600 мВ 30 мс, –100 мВ 50 мс). Калибровку для идентификации и расчета концентрации сахаров в анализируемых образцах проводили с использованием стандартов D-глюкозы, D-ксилозы, D-маннозы, L-арабинозы, D-галактозы, 1,4- β -D-ксилобиозы, 1,4- β -D-ксилотриозы и целлобиозы (“Serva”, “Merck”, Германия).

Растительные субстраты. В качестве субстратов были использованы: измельченная предобработанная осинового древесины и МКЦ (ООО “МК Центр”, Дзержинск). Измельчение осинового

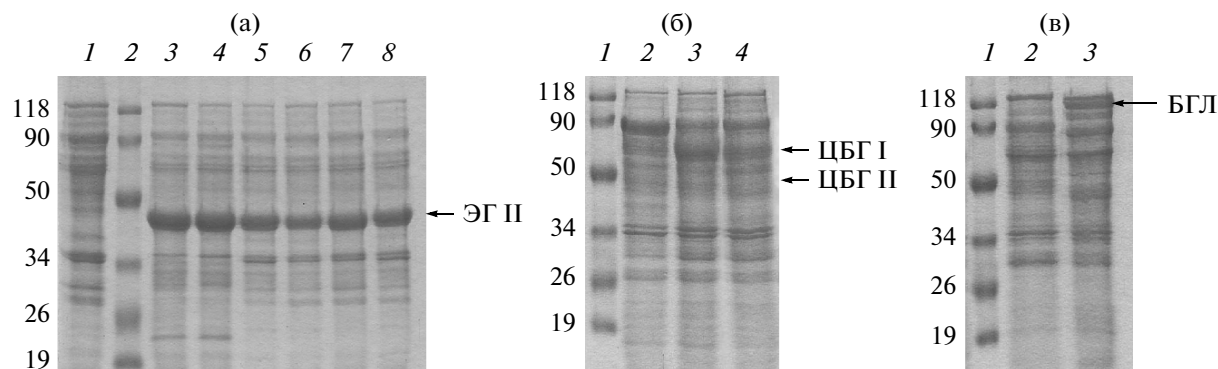


Рис. 1. ДДС-электрофорез ферментных препаратов *P. canescens*. (а) – ФП РСА: 1 – РСА10, 2 – белковый маркер, 3 – ЭГП-1, 4 – ЭГП-2, 5 – ЭГП-3, 6 – ЭГП-4, 7 – ЭГП-5, 8 – ЭГП-6; (б) – ФП РСА: 1 – маркер, 2 – ЦБГ I, 3 – ЦБГ II, 4 – РСА10; (в) – ФП РСА: 1 – маркер, 2 – РСА10, 3 – БГЛ.

древесины проводили в ГосНИИ синтезбелок (Москва) на планетарной мельнице-активаторе типа АГО-2С, размер частиц после помола составлял 1–3 мкм.

Проведение гидролиза растительных субстратов. Эксперимент проводили в термостатируемой при 50°C ячейке, помещенной в шейкер “INNOVA 40 Thermo Shaker” (США). Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л (в пересчете на сухое вещество). Реакцию проводили в 0.1 М ацетатном буфере при перемешивании (250 об/мин). В реакционную смесь добавляли следующие ферментные препараты (в расчете на белок): РСА-ЦБГ I : РСА-ЭГ II и РСА-ЦБГ II : РСА-ЭГ II в соотношениях: 2 : 8, 4 : 6, 6 : 4, 8 : 2 соответственно. Конечная концентрация белка в реакционной смеси составляла 10 мг/г сухого субстрата, объем реакционной смеси – 20 мл. В реакционную смесь добавляли также ФП целлюлазы РСА-БГЛ из расчета 40 ед. активности на 1 г сухого субстрата. Гидролиз проводили в течение 2 сут. В контроль вместо раствора ФП в реакционную смесь добавляли соответствующее количество буферного раствора.

Реакционная ячейка представляла собой пластиковый сосуд с крышкой объемом 50 мл, для обеспечения дополнительного перемешивания реакционной смеси в ячейку помещали металлический цилиндр ($d = 7$ мм, $h = 10$ мм) из нержавеющей стали.

Через определенные промежутки времени (3, 12 и 24 ч) из реакционной смеси отбирали пробы (по 0.5 мл), центрифугировали 3 мин при 10000 g и измеряли в супернатанте концентрацию ВС методом Шомоди–Нельсона [6] и Гл глюкозооксидазным методом [7].

Анализ состава ферментного препарата. Для фракционирования ФП использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии

(FPLC), колонки и носители фирмы “Pharmacia” (Швеция). Для подготовки образцов, а также для их обессоливания и замены буфера использовали систему низкого давления Econo-System фирмы “BioRad” (США). ФП осаждали при 80% насыщения сульфатом аммония, затем обессоливали на колонке с носителем Биогель-Р4 (“BioRad”, США). Колонку уравнивали 20 мМ буфером Bis-Tris-HCl, pH 6.8, далее проводили анионообменную хроматографию на колонке с носителем Source 15Q (“Pharmacia”, Швеция). Образец наносили в стартовом буфере Bis-Tris-HCl при pH 6.8, связавшиеся белки элюировали в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.4 М. Несвязавшиеся с Source 15Q белки подвергали фракционированию с помощью гидрофобной хроматографии на колонке Source 15ISO. Белковую фракцию наносили на колонку при начальной концентрации сульфата аммония 1.4 М в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5.0. Элюирование белков проводили в линейном от 1.4 до 0 М градиенте сульфата аммония. В полученных фракциях измеряли активность по отношению к МКЦ, КМЦ, ксилану и ПНФГ, а также определяли концентрацию белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства ферментных препаратов. Используя методы генной инженерии и микробиологии в исходный штамм-реципиент были трансформированы экспрессионные плазмиды, несущие гены ЦБГ I (*cbh1*), ЦБГ II (*cbh2*), ЭГ II (*egl2*) *P. verruculosum* и БГЛ (*bglI*) *A. niger* под контролем промотора гена ксиланазы (*xylA*) *P. canescens* [2–4]. Из культуральной жидкости новых штаммов-продуцентов были получены лиофильно высушенные сухие ФП РСА-ЦБГ I, РСА-ЦБГ II, РСА-ЭГ II и РСА-БГЛ. В качестве контроля был использован ФП, полученный с помощью штамма-реципиента *P. canescens* – РСА-10. ДДС-элек-

Таблица 1. Характеристика активности препаратов

Ферментный препарат	КМЦаза, ед./мг белка	Авицелаза, ед./мг белка	Целлобиаза, ед./мг белка	Ксиланаза, ед./мг белка	β -глюкозидаза, ед./мг белка
РСА-ЭГП-6	20.3 \pm 1.0	0.29 \pm 0.01	0.030 \pm 0.001	8.4 \pm 0.6	0.050 \pm 0.002
РСА-ЦБГ I	3.9 \pm 0.5	0.51 \pm 0.03	0.30 \pm 0.05	48.5 \pm 3.0	0.20 \pm 0.01
РСА-ЦБГ II	5.1 \pm 0.5	0.45 \pm 0.03	0.32 \pm 0.05	55.1 \pm 3.0	0.30 \pm 0.01
РСА-БГЛ	0.7 \pm 0.1	0.050 \pm 0.001	30.2 \pm 2.0	2.6 \pm 0.4	5.8 \pm 0.4
РСА-10	2.9 \pm 0.1	0.070 \pm 0.002	0.070 \pm 0.002	80.4 \pm 4.0	0.10 \pm 0.01

трофорез ферментных препаратов представлен на рис. 1. На электрофореграммах присутствуют полосы белков, не свойственных секретируемому ферментному комплексу *P. canescens*, такие, как ЭГП ~40 кДа (рис. 1а), ЦБГ I и ЦБГ II в пределах 70 и 60 кДа соответственно (рис. 1б), а также БГЛ ~120 кДа (рис. 1в).

Содержание белка и удельная активность ФП по отношению к различным субстратам представлены в табл. 1. Активности целлобиогидролазы, эндоглюканызы и β -глюкозидазы (целлобиазы) определяли по гидролизу МКЦ, КМЦ, целлобиозы и ПНФГ соответственно [7]. Очевидно, что ФП с гетерологичными ЦБГ I и II имели в 7.3 и 6.5 более высокую удельную активность по отношению к МКЦ (0.51 и 0.45 ед./мг), чем контрольный ФП РСА-10. ФП с гетерологичной ЭГ II имел 22.5 раз более высокую активность по отношению к КМЦ (20.3 ед./мг) по сравнению с ФП РСА-10. ФП с БГЛ *A.niger* имел в 58 и 430 раз более высокую активность по ПНФГ и целлобиозе 5.8 и 30.2 ед./мг соответственно по сравнению с контрольным ФП РСА-10.

Осахаривающая способность ферментных препаратов. Осахаривающую способность полученных ФП определяли по отношению к МКЦ и измельченной осиновой древесине в качестве субстратов.

Для определения оптимального соотношения ФП с активностью целлобиогидролазы и эндоглюканызы, при котором будет наблюдаться их максимальная гидролитическая активность, ФП смешивали в соотношении: 2 : 8, 4 : 6, 6 : 4, 8 : 2 мг/г сухой массы субстрата (первая цифра соответствует количеству препарата по белку с ЦБГ I или ЦБГ II, вторая – с эндоглюканызой). Общее количество белка ФП во всех случаях составляло 10 мг/г сухой массы субстрата.

В качестве критерия осахаривающей способности препаратов принимали выход ВС и Гл через 48 ч после начала гидролиза.

Из шести полученных ФП с активностью гетерологичной эндоглюканызы при гидролизе из-

мельченной осиновой древесины и МКЦ, лучшим по выходу ВС и Гл, как видно из рис. 2, был препарат РСА-ЭГП-6. Этот препарат обеспечивал увеличение выхода ВС и Гл в 3 раза при гидролизе измельченной осиновой древесины по сравнению с контрольным ФП РСА-10. При гидролизе МКЦ препарат РСА-ЭГП-6 также проявлял большую осахаривающую активность и обеспечивал выход ВС и Гл в 4 и 3 раза больше соответственно по сравнению с контролем, поэтому ФП РСА-ЭГП-6 был выбран для дальнейших экспериментов по осахариванию целлюлозосодержа-

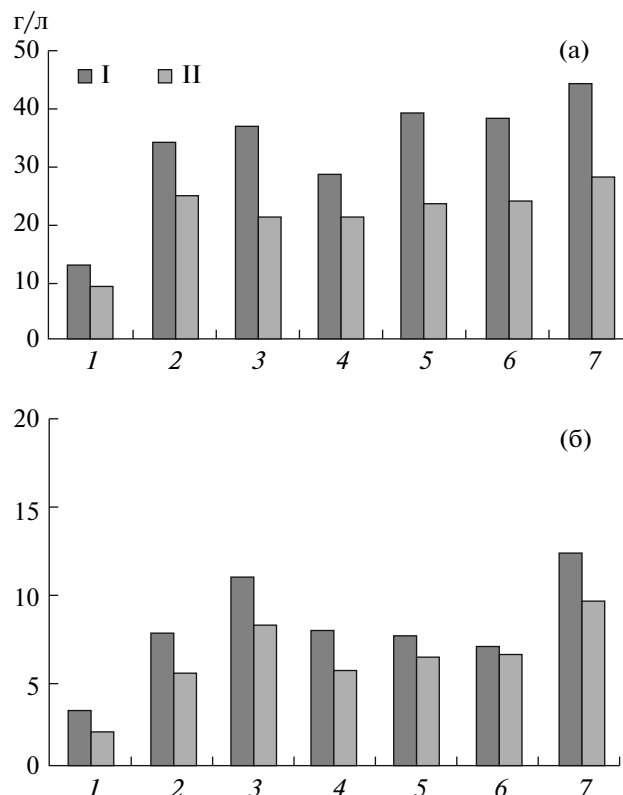


Рис. 2. Выход ВС (I) и Гл (II) при гидролизе измельченной осиновой древесины (а) и МКЦ (б) ФП РСА-ЭГП. 1 – РСА10, 2 – ЭГП-1, 3 – ЭГП-2, 4 – ЭГП-3, 5 – ЭГП-4, 6 – ЭГП-5, 7 – ЭГП-6.

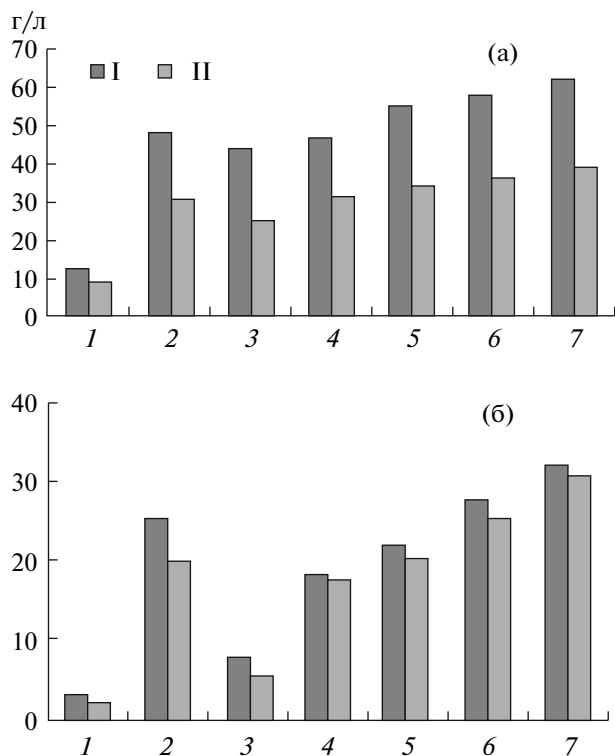


Рис. 3. Выход ВС (I) и Гл(II) при гидролизе измельченной осиновой древесины (а) и МКЦ (б) ФП РСА-ЦБГ. 1 – РСА (10 мг), 2 – ЦБГ I (10 мг), 3 – ЭГ II (10 мг), 4 – 2 : 8, 5 – 4 : 6, 6 – 6 : 4, 7 – 8 : 2.

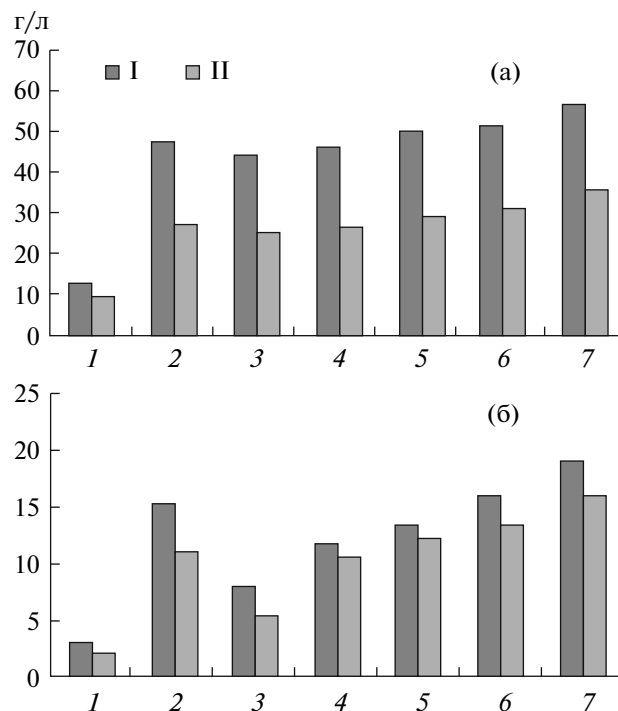


Рис. 4. Выход ВС (I) и Гл (II) при гидролизе измельченной осиновой древесины (а) и МКЦ (б) ФП РСА-ЦБГ. 1 – РСА 10 мг, 2 – ЦБГ II – 10 мг, 3 – ЭГ II – 10 мг, 4 – 2 : 8, 5 – 4 : 6, 6 – 6 : 4, 7 – 8 : 2. Условия гидролиза см. в “Методике”.

ших материалов (**ЦСМ**) смесями ферментных препаратов.

Наиболее эффективным соотношением ФП, при котором наблюдались максимальные значения ВС и Гл было 8 мг (по белку) препарата целлобиогидролазы (как ЦБГ I, так и ЦБГ II) к 2 мг препарата ЭГ II. Как видно из рис. 3а, при гидролизе измельченной осиновой древесины ферментной смесью в соотношении 8 : 2 (РСА-ЦБГ I и РСА-ЭГ II) выход ВС и Гл составил 62 и 38 г/л соответственно, что в 5 и 4 раза больше чем при гидролизе того же субстрата контрольным ФП РСА-10. При гидролизе того же субстрата ферментной смесью, содержащей РСА-ЦБГ II и РСА-ЭГ II выход ВС и Гл (рис. 4а) составил 56 и

35 г/л соответственно, что в 4.5 и 4 раза больше контроля.

При осахаривании модельного субстрата – МКЦ выбранное ранее соотношение оказалось оптимальным – 8 мг препарата РСА-ЦБГ I и 2 мг препарата РСА-ЭГ II. Выход ВС и Гл при использовании этой смеси ФП составил 31 и 30 г/л соответственно, что в 9 и 13 раз больше контроля. При гидролизе ферментной смесью, содержащей РСА-ЦБГ II и РСА-ЭГ II, в том же соотношении выход ВС и Гл составил 19 и 16 г/л соответственно, что в 5.5 и 7 раз больше контроля (рис. 4б).

Состав сахаров в гидролизатах осиновой древесины. Гидролизат измельченной осиновой древесины, полученный при применении наиболее ак-

Таблица 2. Состав сахаров в гидролизате измельченной осины через 48 ч гидролиза

Ферментная смесь, мг/г субстрата	Концентрация сахаров, г/л			
	ВС	глюкоза	целлобиоза	ксилоза
ЦБГ I + ЭГ II (8 : 2) + БГЛ (40 ед.)	62.1 ± 3.1	38.5 ± 1.3	3.10 ± 0.03	9.2 ± 0.1
ЦБГ II + ЭГ II (8 : 2) + БГЛ (40 ед.)	56.3 ± 2.3	35.2 ± 1.1	2.60 ± 0.15	8.40 ± 0.08
РСА + БГЛ (40 ед.)	26.1 ± 1.1	17.8 ± 0.5	2.5 ± 0.2	4.90 ± 0.05

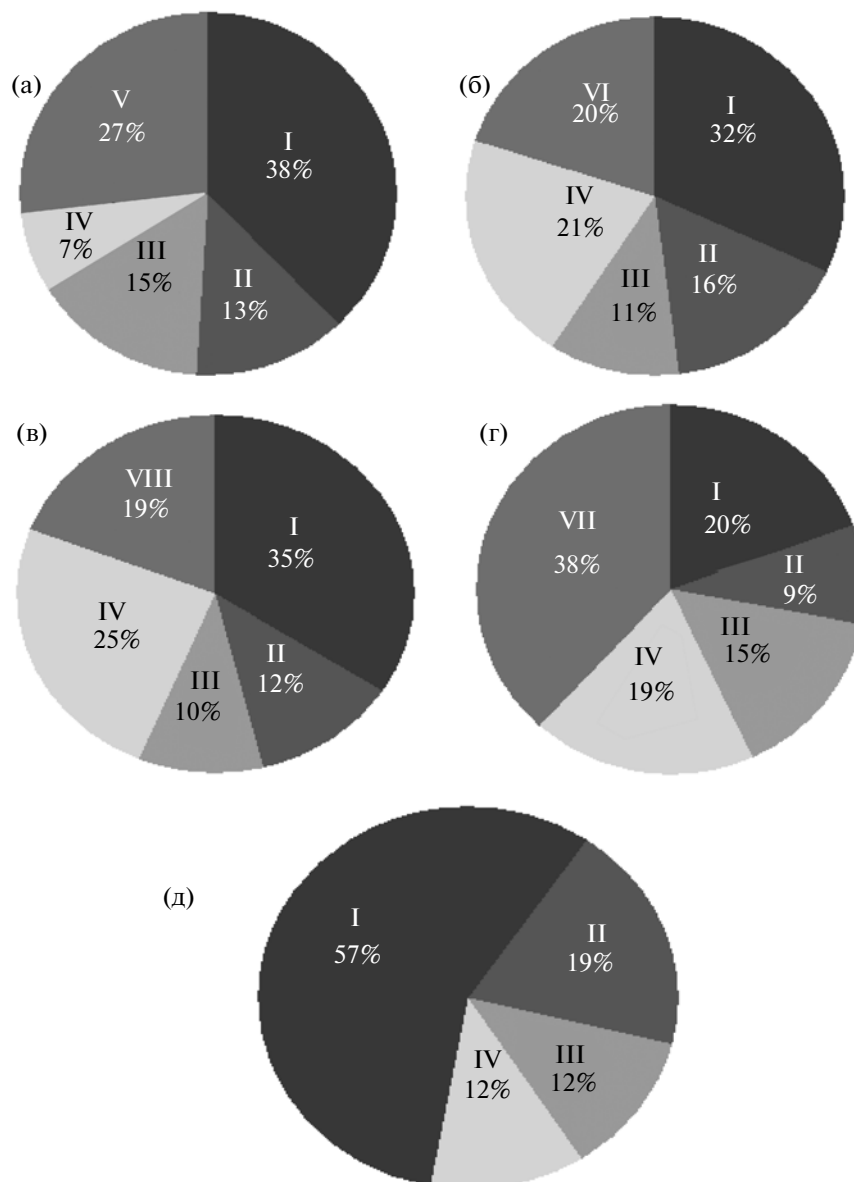


Рис. 5. Компонентный состав сухих ФП по данным FPLC-фракционирования (в % от общего содержания белка). (а) РСА-ЦБГ I, (б) РСА-ЦБГ II, (в) РСА-БГЛ, (г) РСА-ЭГП-6, (д) РСА-10. I – ксиланаза, II – β -галактозидаза, III – арабинофуранозидаса, IV – другие белки, V – ЦБГ I, VI – ЦБГ II, VII – ЭГП, VIII – БГЛ.

тивной ферментной смеси, содержащей 8 мг ЦБГ I (или ЦБГ II) и 2 мг ЭГП был проанализирован с помощью ВЭЖХ. В составе гидролизата были обнаружены глюкоза (35.2–38.5 г/л, табл. 2), являющаяся основной структурной единицей целлюлозы глюкоанов, и ксилоза (8.5–9.2 г/л), структурный элемент ксилана, основного компонента гемиллюлозы осиновой древесины. Данные табл. 2 полностью коррелируют с составом основных полимеров осиновой древесины [1]. Следует отметить,

что присутствие в среде незначительного количества целлюлозы (2.5–3.0 г/л) свидетельствует о достаточном количестве в реакционной смеси препарата РСА-БГЛ (40 ед./г сухого субстрата).

Состав ферментных препаратов. Было проведено двухстадийное аналитическое фракционирование сухих ФП препаратов РСА-10, РСА-ЦБГ I, РСА-ЦБГ II, РСА-БГЛ, а также препарата РСА-ЭГП-6, обладающего лучшей осакcharивающей способностью при использовании в качестве суб-

стратов измельченной осиновой древесины и МКЦ.

Фракционирование проводили, как описано в методике, использовали одинаковое количество белка (10 мг). В полученных фракциях определяли активность по отношению к МКЦ, КМЦ, активность ксиланазы и β -глюкозидазы, β -галактозидазы, арабинофуранозидазы, а также содержание белка. Зная общую активность соответствующей фракции и общее содержание в ней белка, а также учитывая удельную активность ферментов (гомогенных целлобиогидролаз, эндоглюканаз, β -глюкозидазы и других секретируемых ферментов *P. canescens* [2, 8]) рассчитывали содержание соответствующего фермента в общем пуле секретируемого белка с целью определения компонентного состава полученных ФП.

На рис. 5 приведен компонентный состав ФП. Препараты РСА-ЦБГ I и РСА-ЦБГ II содержали 20–27% гетерологичных целлобиогидролаз I, II от общего пула секретируемого белка. При этом содержание собственной (гомологичной) ксиланазы *P. canescens* составляло 32–38%. Состав лучшего эндоглюканазного ФП РСА-ЭГП-6 характеризовался значительным содержанием гетерологичной эндоглюканазы (38,3%) при сохранении высокого уровня собственной ксиланазы *P. canescens* (19,5%). Препарат РСА-БГЛ имел 33% гетерологичной β -глюкозидазы *A. niger*. В исходном (контрольном) ФП РСА-10 отмечалось наибольшее содержание собственной ксиланазы (57%) и отсутствие целлюлолитических ферментов.

Полученные с помощью фракционирования на FPLC данные по составу ФП коррелируют с данными табл. 1, отражающей активности ФП по отношению к различным субстратам – препараты с увеличенным содержанием целлобиогидролазы имеют увеличенную активность по МКЦ, с увеличенным содержанием эндоглюканаз – увеличенную КМЦазную активностью, с увеличенным содержанием β -глюкозидазы – увеличенную активность по ПНФГ. Следует отметить, что увеличенная активность ксиланазы в препаратах РСА-ЦБГ I и РСА-ЦБГ II объясняется большим содержанием целлобиогидролаз, которые, как показано в работе [9], обладают также ксиланазной активностью.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были получены ФП на основе гриба *P. canescens*, характеризующиеся значительным содержанием гетерологичных ферментов ЦБГ I, ЦБГ II, ЭГ II *P. verruculosum* и БГЛ *A. niger*, а также проведена оптимизация состава смесей целлюлолитических ФП для гидролиза МКЦ и измельченной осиновой древесины. Уста-

новлено, что для наиболее эффективного осахаривания целлюлозосодержащих субстратов оптимальным было соотношение 8 мг (по белку) препаратов ЦБГ I или ЦБГ II к 2 мг препарата ЭГ II в расчете на 1.0 г сухой массы субстрата. Следует отметить, что при ферментативном гидролизе измельченной осиновой древесины важную роль в увеличении выхода продуктов реакции сыграло присутствие в ферментном гидролитическом комплексе значительного количества собственной (гомологичной) ксиланазы *P. canescens*, что позволило гидролизовать также и гемицеллюлозу осиновой древесины, составляющую 15% от массы данного субстрата.

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (2009–2013 гг.) и программы ПНР-5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar R., Singh S., Singh O.V. // J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. № 5. P. 377-91.
2. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матвеев В.Ю., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 674–680.
3. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Сеницын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 5. С. 699-70.
4. Скомаровский А.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Соловьева И.В., Бубнова Т.В., Кондратьева Е.Г., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 2. С. 210–212.
5. Рожкова А.М., Волков П.В., Кондратьева Е.А., Сатрутдинов А.Д., Рубцова Е.А., Бушина Е.А., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Сеницын А.П., Кошелев А.В., Беккаревич О.А., Бубнова Т.В., Окунев О.Н. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2010. № 7. С. 37–39.
6. Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Итоги науки и техники. Сер. “Биотехнология”. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. С. 30–37.
7. Польшалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. М.: ДеЛи Принт, 2003. С. 147–169.
8. Патент РФ. 2009. № 2358756.
9. Патент РФ. 2008. № 2322354.

Production of Enzyme Preparations on the Basis of *Penicillium canescens* Recombinant Strains with a High Ability for the Hydrolysis of Plant Materials

P. V. Volkov^a, A. M. Rozhkova^a, A. G. Pravilnikov^a, R. M. Andrianov^a, G. S. Dotsenko^b,
A. O. Bekkarevich^c, A. V. Koshelev^c, O. N. Okunev^c, I. N. Zorov^a, and A. P. Sinitsin^b

^a *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

e-mail: inbi@inbi.ras.ru

^b *Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119999 Russia*

e-mail: info@rector.msu.ru

^c *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Moskovskaya oblast, 142290 Russia*

Received March 11, 2011

Abstract—An enzyme preparation has been produced on the basis of *Penicillium canescens* strains with the activity of cellobiohydrolase I, II; endo-1,4- β -glucanase of *Penicillium verruculosum*; and β -glucosidase of *Aspergillus niger*. It was shown that for the most effective hydrolysis of aspen wood pulp the optimal ratio of cellobiohydrolase and endo-1,4- β -glucanase in enzyme preparations was 8 : 2 (by protein). It was also established that the homologous xylanase secreted by the *Penicillium canescens* fungus is a required component for the enzyme complex for hydrolysis of the hemicellulose matrix of aspen wood.

УДК 582.284:547.458.5

РАЗВЕТВЛЕННЫЙ ГЛЮКАН ПЛОДОВЫХ ТЕЛ *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) Karst.

© 2012 г. Д. Н. Оленников*, С. В. Агафонова**, А. В. Рохин***, Т. А. Пензина**,
Г. Б. Боровский**

* Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047;
e-mail: oldaniil@rambler.ru

** Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033

*** Иркутский государственный университет, Иркутск, 664033

Поступила в редакцию 17.01.2011 г.

Из плодовых тел *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) Karst. (сем. Fomitopsidaceae) был выделен новый глюкан – пиптопоран I с молекулярной массой 270 кДа. С применением комплекса физико-химических методов установлено, что пиптопоран I представляет собой разветвленный глюкан, основная цепь которого построена из остатков α -(1 \rightarrow 3)-глюкопиранозы, замещенной на 17.3% по положению С-6 единичными остатками β -D-глюкопиранозы. Полисахарид с подобным строением выделен впервые из грибов рода *Piptoporus*.

Базидиомицеты занимают важное место в структуре растительных и лесных биоценозов. Благодаря исследованиям последних десятилетий стало известно, что базидиальные грибы являются продуцентами биологически активных веществ. *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) Karst. (сем. Fomitopsidaceae) – ксилотрофный базидиомицет, повсеместно встречающийся в зоне умеренного пояса России и поражающий исключительно представителей рода *Betula* [1]. Несмотря на широкое распространение гриба, информация о химическом составе *P. betulinus* ограничена; известно о присутствии в плодовых телах данного вида ланостановых тритерпенов [2, 3], жирных кислот [4], пиптамина [5], 2-(4-гидрокси-3-метил-2-бутенил)-гидрохинона [6] и эфирного масла [7]. Для экстрактов и индивидуальных соединений *P. betulinus* выявлено наличие антибактериальной [5, 8], противовоспалительной [2], антигиалуронатлиазной [3] и антиметаллопротеиназной [6] активности. Ранее упоминалось о присутствии в плодовых телах *P. betulinus* α -глюканов [9, 10], но химическое исследование полисахаридов данного базидиального вида не проводилось. Сведения о выраженной иммуностимулирующей и противоопухолевой активности базидиальных α -глюканов и их производных [11, 12], а также сырьевой доступности *P. betulinus*, позволяют рассматривать данный базидиальный вид в качестве потенциального источника для получения лекарственных препаратов с заданным видом фармакологического действия.

Цель работы – выделение и структурная характеристика доминирующего полисахарида плодовых тел *P. betulinus*.

МЕТОДИКА

Плодовые тела *P. betulinus*. Плодовые тела были собраны в Усть-Кутском районе Иркутской области в июле 2008 г. Сырье после сбора разрезали на куски и высушивали до постоянной массы при 60°C, после чего измельчали до частиц размером 0.5 мм. Видовая принадлежность определена Пензиной Т.А. (СИФИБР СО РАН). Образцы *P. betulinus* хранятся в гербарии СИФИБР СО РАН.

Выделение фракции щелочерастворимых глюканов из *P. betulinus*. Высушенные и измельченные плодовые тела *P. betulinus* (170 г) экстрагировали в аппарате Сокслета последовательно хлороформом, этилацетатом и метанолом. Обезжиренное сырье высушивали до полного удаления растворителей, после чего экстрагировали водой на кипящей водяной бане (1 : 50; 5-кратная экстракция по 60 мин) и далее 5%-ным раствором КОН при 50°C (1 : 20; 3-кратная экстракция по 180 мин). Щелочные извлечения объединяли, подкисляли концентрированной уксусной кислотой до pH 4.5 и оставляли при 10°C на 4 ч. Выпавший осадок центрифугировали (30 мин, 6000 г), промывали 5%-ной уксусной кислотой и ледяной водой до нейтральной реакции и высушивали. Получено 7.412 г щелочерастворимой фракции ПБЩ-1.

Фракцию ПБЩ-1 (7 г) обрабатывали кипящим 80%-ным этанолом (4 раза по 150 мл, 60 мин), нерастворившийся осадок отфильтровывали, про-

мывали 96%-ным этанолом и высушивали. В результате получено 4.123 г фракции ПБЩ-2.

Фракцию ПЩБ-2 (4 г) растворяли в 100 мл 5%-ного раствора КОН, после чего к полученному раствору приливали 20 мл 5%-ного раствора сульфата железа (II) и оставляли при постоянном перемешивании в течение 60 мин. Выпавший осадок центрифугировали (30 мин, 6000 g), супернатант нейтрализовали концентрированной HCl до pH 6.8 и диализовали в диализных трубах с пределом диализа 2 кДа ("Sigma-Aldrich Inc.", Германия) против дистиллированной воды в течение 48 ч. Диализат осаждали ацетоном (1 : 6), выпавший осадок центрифугировали (15 мин, 3000 g), промывали ацетоном и высушивали. Получено 2.244 г фракции ПБЩ-3.

Углеводы определяли антрон-серноокислотным методом в пересчете на глюкозу [13], урсоловые кислоты – 3,5-диметилфенол-серноокислотным методом в пересчете на галактуроновую кислоту [14], фенолы – методом Фолина в пересчете на галловую кислоту [15], белок – по методу Бредфорд с применением кумасси G250 ("Силекс", Россия) [16]. Оптическое вращение измеряли для 0.5%-ных растворов в 5%-ной КОН на поляриметре СМ-3 ("Загорский оптико-механический завод", Россия) в кювете 1 дм при 20°C; pH – с применением pH-метра pH-410 ("Аквилон", США). Спектроскопические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 ("Ломо", Россия) в кварцевых кюветах 10 мм.

ИК-спектроскопия. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре ФТ-801 ("Симекс", Россия) в интервале 4000–600 см⁻¹ в таблетке с бромидом калия (1 : 100).

Гель-хроматография. Использовали Sephacryl 300HR ("Sigma-Aldrich Inc.", Германия), колонка 1.6 × 60 см, элюент – фосфатный буфер pH 5.5, скорость потока – 800 мкл/мин, объем элюатов – 1 мл, температура колонки – 20°C. Колонку градуировали с использованием стандартов декстранов с молекулярными массами 6, 100, 200, 500 кДа ("Fluka", Швейцария). Внешний объем колонки определяли по синему декстрану (2000 кДа, "Pharmacia", Швеция). Концентрация раствора полисахарида – 10 мг/мл, стандартов декстранов – 1 мг/мл, объем вводимой пробы – 1 мл. Объем выхода определяли спектрофотометрическим фенол-серноокислотным методом при 480 нм [17].

Полный гидролиз. Растворяли 10 мг полисахарида в 5 мл 2 М ТФУ и нагревали при 120°C в течение 2 ч. ТФУ удаляли в вакууме в присутствии метанола, остаток растворяли в бидистиллированной воде и анализировали методом ВЭЖХ.

ВЭЖХ. Проводили на жидкостном хроматографе Милихром А-02 ("Эконова", Россия) на

колонке Separon 5-NH₂ (80 × 2 мм, 5 мкм, "Tessek Ltd.", Чехия). Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (3 : 1), скорость подвижной фазы 0.1 мл/мин, температура колонки 22°C. Детектирование проводили при 190 нм.

Выделение глюкана ПБЩ-3-2. Выделение проводили с применением препаративной гель-хроматографии в условиях, описанных ранее, на колонке Sephacryl 300HR размером 2.6 × 60 см; объем фракций – 5 мл. Фракции, содержащие доминирующий компонент, объединяли, диализовали и диализат лиофильно высушивали. Из 1.5 г ПБЩ-3 получено 675 мг компонента ПБЩ-3-2.

Периодатное окисление и деградация по Смитсу. Растворяли 100 мг ПБЩ-3-2 в 50 мл фосфатного буфера, pH 5.5, приливали 20 мл 0.2 М раствора периодата натрия и оставляли при 4°C. Через каждые 24 ч отбирали аликвоту раствора и анализировали на содержание периодат-иона спектрофотометрическим методом по уменьшению поглощения при 223 нм [18] и концентрацию муравьиной кислоты определяли титрованием 0.01 М NaOH. Деградацию по Смитсу проводили после периодатного окисления по методу [19]. Получено 63 мг деградированного полисахарида ПБЩ-3-2-д.

Окисление хромовым ангидридом. Реакцию проводили с хромовым ангидридом после предварительного ацетилирования по методу Хоффмана [20].

Метилирование. Метилирование полисахарида осуществляли йодистым метилом по методу [21] с последующим формолизом, гидролизом перметилата [22] и анализом методом ГХ/МС.

Газовая хроматография/масс-спектрометрия (ГХ/МС). ГХ/МС анализ проводили на хромато-масс-спектрометре 5973N/6890N MSD/DS ("Agilent", США) с масс-селективным детектором (№ 5973) с диффузным насосом с применением капиллярной колонки PH-Innowax (30 м × 250 мкм × 0.50 мкм). Градиент температуры – 150–250°C, скорость нагрева 2°/мин. Газ-носитель – гелий, скорость 1 мл/мин.

Спектроскопия ЯМР. Спектры ¹³C-ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S ("Varian", США), рабочая частота 125.7 МГц. Спектры получены для 1%-ных растворов в DMSO-d₆.

Реакция с конго красным. По 2 мг полисахарида растворяли в 2 мл 0.15–0.7 М растворов NaOH, после чего приливали 60 мкл 0.01 М раствора конго красного ("Sigma-Aldrich Inc.", Германия) в 95%-ном этаноле. Через 10 мин определяли вид спектров поглощения полученных растворов. Контролем служили пахиман ("Biosuppliers", Австралия) и крахмал ("Merck", Германия).

Таблица 1. Характеристика щелочерастворимых фракций *P. betulinus*

Фракция	Выход, %	Содержание, %				Содержание глюкозы, мол. %
		углеводы	уроновые кислоты	фенолы	белок	
ПБЩ-1	4.4*	27.8	0.9	44.1	4.5	19.6
ПБЩ-2	58.9**	52.7	1.7	14.7	2.4	47.4
ПБЩ-3	56.1***	98.5	—	—	—	98.2

* Выход от массы плодового тела. ** Выход от массы ПБЩ-1. *** Выход от массы ПБЩ-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выделения щелочерастворимых полисахаридов плодовые тела *P. betulinus* предварительно обрабатывали рядом растворителей в аппарате Сокслета для удаления липофильных и фенольных соединений, после чего проводили экстракцию водой и раствором гидроксида калия. Из щелочных извлечений после подкисления была выделена щелочерастворимая фракция ПБЩ-1 с выходом 4.4% от массы плодовых тел. Фракция ПБЩ-1 представляла собой пигментированную аморфную субстанцию, в которой по данным химического анализа присутствовали фенольные (44.1%), углеводные (27.8%) и белковые компоненты (4.5%) (табл. 1). Высокое содержание фенольных соединений свидетельствовало о том, что ПБЩ-1 является мелано-углеводным комплексом. Для очистки данной фракции ее подвергли экстракции 80%-ным этанолом, что позволило освободиться от части фенольных пигментов; в результате была получена фракция ПБЩ-2, содержащая 52.7% углеводов и 14.7% фенольных соединений. Удаление оставшегося количества фенолов проводили после растворения ПБЩ-2 в 5%-ном растворе КОН и осаждения раствором

сульфата железа (II). Данная последовательность операций привела к получению депигментированного продукта ПБЩ-3, содержащего 98.5% углеводов и представляющего собой фракцию щелочерастворимых полисахаридов.

Исследование моносахаридного состава показало, что глюкоза является единственным продуктом полного гидролиза ПБЩ-3. С применением гель-хроматографии установлено, что в составе исследуемой фракции присутствовало 3 компонента с молекулярными массами 320 (ПБЩ-3-1), 270 (ПБЩ-3-2) и 70 кДа (ПБЩ-3-3) (рис. 1а). Доминирующим является компонент ПБЩ-3-2, выделение которого с помощью препаративной гель-хроматографии привело к получению гомогенного препарата полисахарида (рис. 1б).

В составе ПБЩ-3-2 была обнаружена только глюкоза, а растворы обладали высоким положительным удельным вращением ($[\alpha]_D + 107^\circ$). В ИК-спектре ПБЩ-3-2 присутствовал интенсивный пик при 847 см^{-1} , указывающий на доминирование α -связей в структуре полисахарида (рис. 2). Наличие пика при 824 см^{-1} характерно для (1 \rightarrow 3)-связанных полимеров [23]. Слабое поглощение при 890 см^{-1} являлось следствием присутствия небольшого количества остатков с β -конфигурацией аномерного центра.

При периодатном окислении ПБЩ-3-2 расходовалось 0.29 моль периодат-иона на ангидрозвено, выделение муравьиной кислоты составило 0.15 моль/ангидрозвено. Дальнейшая обработка продуктов периодатного окисления борогидридом натрия и разбавленной серной кислотой (деградация по Смитсу) привела к получению деградированного продукта ПБЩ-3-2-д с молекулярной массой 225 кДа (рис. 1б). В составе продуктов гидролиза был обнаружен глицерин. Полученные результаты указывали на наличие в структуре ПБЩ-3-2 периодат-устойчивой области, что возможно в случае (1 \rightarrow 3)-типа связи и некоторого количества точек ветвления, из которых образовался глицерин.

Для определения конфигурации аномерных центров глюкозы в ПБЩ-3-2 и ПБЩ-3-2-д было

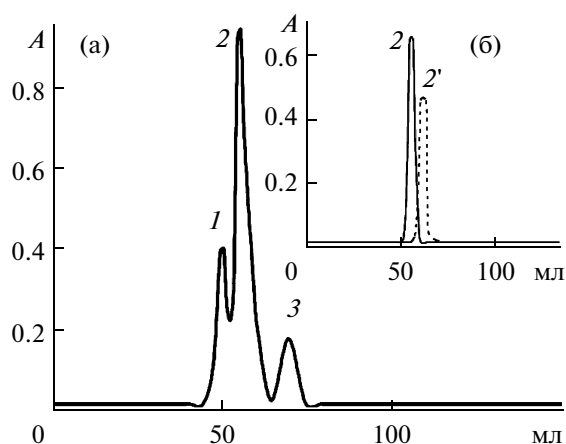


Рис. 1. Гель-хроматограмма фракции ПБЩ-3 (а), очищенного препарата ПБЩ-3-2 и ПБЩ-3-2-д (б). 1 – ПБЩ-3-1, 2 – ПБЩ-3-2, 3 – ПБЩ-3-3, 2' – ПБЩ-3-2-д.

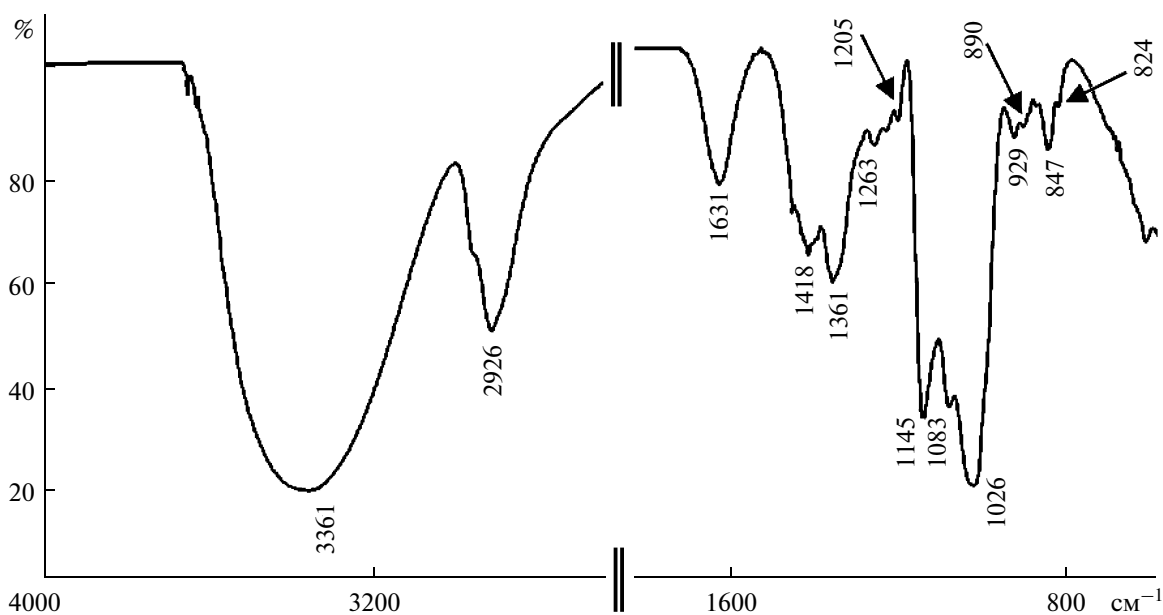


Рис. 2. ИК-спектр ПБЩ-3-2. Цифрами обозначены значения волновых чисел.

проведено их исследование с применением окисления хромовым ангидридом. В гидролизатах продуктов окисления установлено наличие глюкозы, что возможно в случае ее α -конфигурации.

Согласно данным ГХ/МС анализа, после метилирования в составе продуктов гидролиза ПБЩ-3-2 обнаружены 2,3,4,6-тетраметилглюкопираноза, 2,4,6-триметилглюкопираноза и 2,4-диметилглюкопираноза в соотношении 1 : 4,8 : 1 (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что основная цепь ПБЩ-3-2 состоит из остатков незамещенной (1 \rightarrow 3)-связанной глюкопиранозы и имеется небольшое число точек ветвления основной цепи по положению С-6, причем боковые цепи представлены единичными остатками глюкопиранозы. В составе продуктов метилирования ПБЩ-3-2-д обнаружена 2,4,6-триметилглюкопираноза и следы 2,3,4,6-тетраметилглюкопиранозы, что указывает на линейный характер полимера, который представляет собой основную цепь макромолекулы ПБЩ-3-2.

Полученные сведения о строении ПБЩ-3-2 указывают на то, что он является α -(1 \rightarrow 3)-глю-

каном, содержащим небольшое количество боковых цепей у атомов С-6, однако остается невыясненным факт наличия полосы β -связей в ИК-спектре ПБЩ-3-2. Для исследования данного вопроса было проведено изучение ПБЩ-3-2 и ПБЩ-3-2-д с применением ¹³С-ЯМР-спектроскопии. На рис. 3 приведен ¹³С-ЯМР-спектр ПБЩ-3-2, величины химических сдвигов сигналов (м.д.) и их интерпретация для ПБЩ-3-2 и ПБЩ-3-2-д – в табл. 3.

В аномерной области ¹³С-ЯМР-спектра ПБЩ-3-2 присутствуют три сигнала при 101.5, 101.8 и 106.3 м.д., отнесенные к атомам С-1 остатков незамещенной и замещенной глюкопиранозы основной цепи и глюкопиранозы боковых цепей соответственно. Положения первых двух сигналов указывают на α -конфигурацию аномерных центров глюкозы в основной цепи. Для сигналов С-1 глюкозы боковых цепей наблюдается сильное смещение в слабое поле, что объясняется ее β -конфигурацией. Смещение сигналов атомов С-3 замещенной и незамещенной глюкопиранозы основной цепи в слабое поле (85.3 и 86.3 м.д.)

Таблица 2. Результаты метилирования ПБЩ-3-2 и ПБЩ-3-2-д

Метилированный остаток	Содержание, %		Тип связи
	ПБЩ-3-2	ПБЩ-3-2-д	
2,3,4,6-тетраметилглюкопираноза	14.7	следы	глюкопираноза-(1 \rightarrow \rightarrow 3)-глюкопираноза-(1 \rightarrow \rightarrow 3,6)-глюкопираноза-(1 \rightarrow
2,4,6-триметилглюкопираноза	70.5	99.8	
2,4-диметилглюкопираноза	14.8	–	

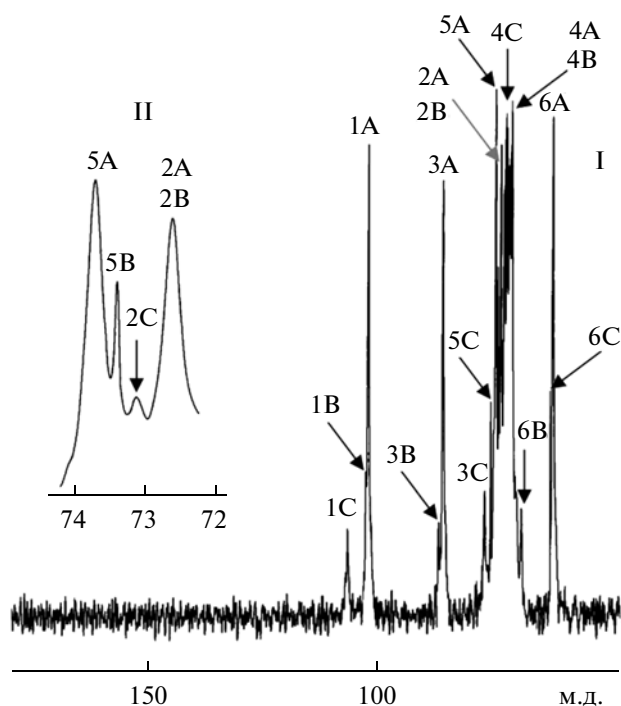


Рис. 3. ^{13}C -ЯМР-спектр ПБЩ-3-2 (I). А – остаток 3-О- α -D-глюкопиранозы, В – остаток 3,6-ди-О-замещенной- α -D-глюкопиранозы, С – остаток β -D-глюкопиранозы, 1–6 – номер атома углерода. Участок ^{13}C -ЯМР-спектра в диапазоне 72–74 м.д. (II).

относительно такового свободной α -D-глюкопиранозы указывает на их участие в образовании связи (1 \rightarrow 3)-типа, а расположение сигнала атома С-6 замещенных остатков при 68.1 м.д. подтверждает наличие замещения по данному положению. Следует также отметить наличие сдвига сигнала атома С-5 замещенной глюкопиранозы в сильное поле (73.5 м.д.), что подтверждает присутствие заместителя у атома С-6 [25]. Соотноше-

ние интегральных интенсивностей сигналов С-3 незамещенной и замещенной глюкопиранозы основной цепи составляет 4.77, что близко к результату, полученному ранее методом метилирования (4.76).

Значения химических сдвигов атомов С-2–С-6 глюкопиранозы боковых цепей близки к таковым свободной β -D-глюкопиранозы, т.е. в боковых цепях присутствуют единичные остатки β -D-глюкопиранозы.

В ^{13}C -ЯМР-спектре ПБЩ-3-2-д обнаружено 6 сигналов при 100.1, 71.4, 84.9, 69.8, 73.4 и 60.9 м.д, отнесенных к атомам С-1, С-2, С-3, С-4. С-5 и С-6 соответственно, что указывает на его структуру в виде линейного α -(1 \rightarrow 3)-глюкана.

Таким образом, проведенные исследования показали, что полисахарид ПБЩ-3-2 из *P. betulinus*, названный нами пиптопоран I, является разветвленным глюканом, основная цепь которого построена из остатков α -(1 \rightarrow 3)-глюкопиранозы, замещенной на 17.3% по положению С-6 единичными остатками β -D-глюкопиранозы. Глюканы смешанного типа, содержащие одновременно α - и β -связи, ранее были обнаружены в *Pleurotus florida* (β (1 \rightarrow 3)-глюкан, замещенный по С-6 глюкопиранозы основной цепи остатками α -глюкопиранозы) [26] и *P. sajor-caju* (α -(1 \rightarrow 2)-, (1 \rightarrow 3)- и (1 \rightarrow 6)-глюкан, замещенный по С-6 α -глюкопиранозы основной цепи остатками β -глюкопиранозы) [27]. Из плодовых тел *P. florida* также был выделен α -глюкан, у которого в боковых цепях, кроме единичных остатков β -глюкопиранозы, обнаружены цепочки из трех остатков β -(1 \rightarrow 3)-связанной глюкопиранозы [28]. Глюканы со структурой, аналогичной пиптопорану I, ранее описаны не были.

Для определения пространственной организации молекулы пиптопорана I были проведены ис-

Таблица 3. Положение и интерпретация сигналов ^{13}C -ЯМР спектров ПБЩ-3-2 и ПБЩ-3-2-д

Моносахаридный остаток цепи полимера	^{13}C -химический сдвиг (δ), м.д.					
	С-1	С-2	С-3	С-4	С-5	С-6
ПБЩ-3-2						
3-О- α -D-глюкопиранозил	101.5	72.6	85.3	70.1	73.8	61.2
3,6-ди-О- α -D-глюкопиранозил	101.8	72.6	86.3	70.1	73.5	68.1
β -D-глюкопиранозил	106.3	73.1	76.1	71.3	75.8	61.8
ПБЩ-3-2-д						
3-О- α -D-глюкопиранозил	100.1	71.4	84.9	69.8	73.4	60.9
α -D-глюкопираноза*	92.7	72.1	73.4	70.4	72.1	61.3
β -D-глюкопираноза*	96.5	74.8	76.4	70.3	76.6	61.5

* [24].

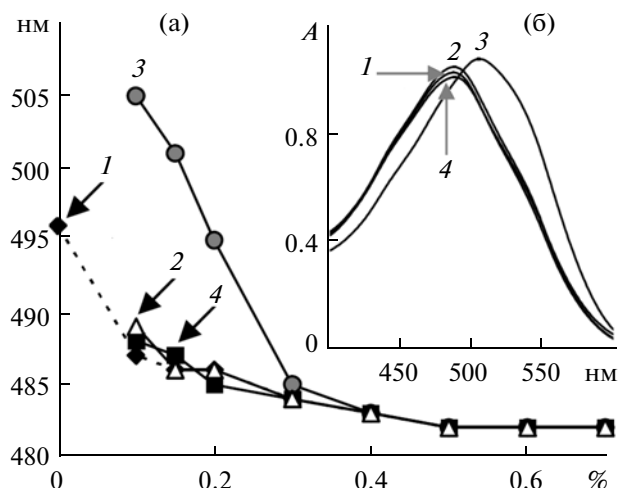


Рис. 4. Влияние концентрации NaOH (%) на положение максимума поглощения конго красного и его комплексов с полисахаридами (а). Спектры поглощения конго красного в присутствии полисахаридов в 0.15 М NaOH (б). 1 – конго красный, 2 – ПБЦ-3-2, 3 – пахиман, 4 – крахмал.

следования с использованием реакции комплексообразования с конго красным, которая применяется для выявления наличия спиральной (helical) конфигурации у полисахаридов. Установлено, что присутствие пиптопорана I не влияет на положение максимума поглощения конго красного, что указывает на отсутствие спиральной конфигурации у макромолекулы изучаемого полисахарида (рис. 4). В отличие от пиптопорана I для β -(1 \rightarrow 3)-глюкана пахимана наблюдается выраженный bathochromic сдвиг на 18 нм при концентрации NaOH 0.15 М. Ранее было выявлено отсутствие спиральной конфигурации для α -(1 \rightarrow 3)-глюканов [29], однако для смешанных глюканов подобный факт установлен впервые.

Работа выполнена при финансовой поддержке регионального конкурса РФФИ (р_сибирь_а № 08-04-98045) и Лаврентьевского конкурса молодежных проектов СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 6. С. 597–608.
2. Kato T., Asanoma M., Shibata H., Hirota M. // J. Natur. Prod. 2003. V. 66. № 8. P. 1104–1106.
3. Wangun H.V., Berg A., Hertel W., Nkengfack A.E., Hertweck C. // J. Antibiot. (Tokyo). 2004. V. 57. № 11. P. 755–758.
4. Řezanka T., Rozentsvet O.A., Dembitsky V.M. // Folia Microbiol. 1999. V. 44. № 6. P. 635–641.
5. Schlegel B., Luhmann U., Härtl A., Gräfe U. // J. Antibiot. (Tokyo). 2000. V. 53. № 9. P. 973–974.

6. Kawagishi H., Hamajima K., Inoue Y. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V. 66. № 12. P. 2748–2750.
7. Rösecke J., Pietsch M., König W.A. // Phytochemistry. 2000. V. 54. № 8. P. 747–750.
8. Karaman M., Mimica-Dukić N., Knežević P., Svirčev Z., Matavuly M. // Int. J. Med. Mushrooms. 2009. V. 11. № 3. P. 269–279.
9. Jelsma J., Kreger D.R. // Arch. Microbiol. 1978. V. 119. № 3. P. 249–253.
10. Jelsma J., Kreger D.R. // Carbohydr. Res. 1979. V. 71. № 1. P. 51–64.
11. Bao X., Duan J., Fang X., Fang J. // Carbohydr. Res. 2001. V. 336. № 1. P. 127–140.
12. Lin Y., Zhang L., Chen L., Jin Y., Zeng F., Jin J., Wan B., Cheung P.C.K. // Int. J. Biol. Macromol. 2004. V. 34. № 2. P. 231–236.
13. Olennikov D.N., Tankhaeva L.M., Samuelsen A.B. // Chem. Natur. Comp. 2006. V. 42. № 3. P. 265–268.
14. Usov A.T., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Marina. 1995. V. 35. № 1. P. 43–51.
15. Folin O., Ciocalteu V. // J. Biol. Chem. 1927. V. 73. № 2. P. 627–650.
16. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 2. P. 248–254.
17. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350–356.
18. Gutierrez A., Prieto A., Martinez A.T. // Carbohydr. Res. 1996. V. 281. № 1. P. 143–154.
19. Olennikov D.N., Rokhin A.V., Tankhaeva L.M. // Chem. Natur. Comp. 2009. V. 45. № 3. P. 300–303.
20. Hoffmann J., Lindberg B., Svenson S. // Acta Chem. Scand. 1972. V. 26. № 4. P. 661–667.
21. Ciukanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. № 2. P. 209–217.
22. Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. // Chem. Natur. Comp. 2007. V. 43. № 5. P. 501–507.
23. Sermour F.R., Julian R.L., Jeanes A., Lamberts B.L. // Carbohydr. Res. 1980. V. 86. № 2. P. 227–246.
24. Шапков А.С., Чижов О.С. // Биоорганическая химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437–497.
25. Olennikov D.N., Agafonova S.V., Nazarova A.V., Rokhin A.V. // Chem. Natur. Comp. 2010. V. 46. № 3. P. 444–445.
26. Rout D., Mondal S., Chakraborty I., Pramanik M., Islam S.S. // Carbohydr. Res. 2005. V. 340. № 16. P. 2533–2539.
27. Pramanik M., Chakraborty I., Mondal S., Islam S.S. // Carbohydr. Res. 2007. V. 342. № 17. P. 2670–2675.
28. Santos-Neves J.C., Pereira M.I., Carbonero E.R., Gracher A.H.P., Alquini G., Gorin P.A.J., Sasaki G.L., Iacomini M. // Carbohydr. Polym. 2008. V. 73. № 2. P. 309–314.
29. Stone B.A., Clarke A.E. Chemistry and biology of (1 \rightarrow 3)- β -glucans. Victoria: La Trobe University Press. 2009. P. 81–85.

Branched Glucan from the Fruiting Bodies of *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) Karst.

D. N. Olennikov^a, S. V. Agafonova^b, A. V. Rokhin^c, T. A. Penzina^b, and G. B. Borovskii^b

^a Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Sakh'yanovoi 6, Ulan-Ude, 670047 Russia

^b Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

^c Irkutsk State University, Irkutsk, 664033 Russia

e-mail: oldaniil@rambler.ru

Received January 17, 2011

Abstract—A new glucan, namely, piptoporane I, with a molecular mass of 270 kDa was isolated from fruiting bodies of *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) Karst. (Fomitopsidaceae). Using a combination of physicochemical methods, it was established that piptoporane I was a branched glucan with a backbone consisting of α -(1–>3)-glucopyranose residues substituted at the C-6 position by single residues of β -D-glucopyranose by 17.3%. A polysaccharide with such a structure was isolated for the first time from the fungus genus *Piptoporus*.

УДК 619.611.573.616:092.632.636.578:582.29

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ МИКРОМИЦЕТОВ В СОСТАВЕ ЛИШАЙНИКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2012 г. Г. П. Кононенко*, А. А. Буркин*, Т. Ю. Толпышева**

*Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН,
Москва, 123022

e-mail: kononenkogp@mail.ru

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

Поступила в редакцию 22.02.2011 г.

В слоевищах кустистых лишайников родов *Cladonia*, *Cetraria*, *Evernia*, *Bryoria* и *Usnea* исследован состав низкомолекулярных биологически активных метаболитов, свойственных микроскопическим грибам. Методом иммуноферментного анализа установлено присутствие стеригматоцистина, эмодаина, микофеноловой кислоты, цитринина, альтернариола и диацетоксисцирпенола, которые встречались регулярно и в большинстве случаев с частотой от 55 до 100%. Наибольшие уровни накопления эмодаина составляли 0.001–0.003%, альтернариола и цитринина – 0.0002%, стеригматоцистина, микофеноловой кислоты – 0.0001%, а диацетоксисцирпенола – 0.00005% от массы воздушно-сухого материала. Другие метаболиты (циклопиазоновая кислота, эргоалкалоиды, охратоксин А, РR-токсин, дезоксиниваленол, зеараленон, фумонизины) обнаруживались у этих лишайников реже, в ряде случаев только при расширении территории сбора образцов, и их содержание не превышало 0.00005%. Обсуждены особенности компонентного состава и уровни накопления грибных метаболитов в лишайниках разной таксономической принадлежности.

Лишайники являются ценными кормовыми растениями, применяются в медицине, диетологии, косметической и парфюмерной промышленности.

Давно сложившееся представление о том, что их функционально однородный организм является продуктом симбиоза гриба и водоросли и (или) цианобактерий, в последующие годы пополнялось новыми сведениями. К настоящему времени известно, что на талломе лишайников могут развиваться не только лишенофильные [1], но и микроскопические грибы, большинство из которых являются свободноживущими и слабо специализированными сапротрофами [2, 3]. При микологических посевах слоевищ после их поверхностной стерилизации было получено значительное видовое многообразие культур, принадлежащих родам *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* и многим другим [3].

Для метаболитов микроскопических грибов, обладающих физиологической активностью, в последние годы бурное развитие получила методология иммуноферментного анализа (ИФА), которая обеспечивает высокую избирательность и чувствительность их определения в разнообразных объектах растительного и животного происхождения. С помощью этого метода в отобранных на Европейском севере России образцах ягеля, смеси видов лишайников родов *Cladonia* и *Cetraria*, нами было обнаружено несколько микотоксинов,

свойственных несовершенным грибам родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* и *Fusarium* [4].

Цель работы – исследование практически значимых видов кустистых лишайников, принадлежащих семействам Cladoniaceae и Parmeliaceae, на содержание микотоксинов методом ИФА.

МЕТОДИКА

Объектами были 4 вида эпигейных лишайников – *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouz et Vězda, *Crangiferina* (L.) F.H. Wigg., *C. arbuscula* (Wallr.) Flot, *Cetraria islandica* (L.) Ach. и 4 вида эпифитных лишайников – *Evernia mesomorpha* NyL, *Bryoria chalybeiformis* (L.) Brodo et D. Hawksw., *Usnea filipendula* Stirt., *U. subfloridana* Stirt. Сбор слоевищ производили в 2009 и 2010 гг. на севере (Мурманская область, Карелия) и в средней полосе Европейской части России (Тверская, Московская обл.), в Приморском крае, а также в Швеции и Норвегии с разных субстратов (эпифитные с хвойных и лиственных пород деревьев, эпигейные – с почвы). Образцы укладывали в отдельные бумажные пакеты и хранили до анализа в воздушно-сухом состоянии.

Для экстракции к навескам слоевищ добавляли 10-кратный избыток (г/мл) смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84 : 16, плотно закрывали, интенсивно встряхивали, выдержи-

вали 14–16 ч при комнатной температуре и ещё раз перемешивали. В экстрактах после 10-кратного разбавления 0.15М фосфатно-солевым буфером рН 7.5, состоящим из 0.01 М Na₂HPO₄, 0.14 М NaCl и 0.05% Твин 20 (ФСБ-т), определяли микотоксины методом непрямого конкурентного ИФА. Аналитические характеристики и метрологические показатели иммуноферментных тест-систем описаны в следующих работах: Т-2 токсин (Т-2) [5], диацетоксисцирпенол (ДАС) [6], дезоксиниваленол и его моноацетаты (ДОН) [7], зеараленон (ЗЕН) [8], фумонизины группы В (ФУМ) [9], афлатоксин В₁ (АВ₁) [10], стеригматоцистин (СТЕ) [11], охратоксин А (ОА) [12], цитринин (ЦИТ) [13], циклопиазоновая кислота (ЦПК) [14], микофеноловая кислота (МФК) [15], PR-токсин (PR) [16], эргоалкалоиды (ЭА) [17], альтернариол (АОЛ) [18], эмодин (ЭМО) [19] и роридин А (РОА) [20]. Нижний предел количественных измерений считали по 85%-ному уровню связывания антител.

В работе использовали препараты атранорина и усниновой кислоты, полученные на кафедре микологии и альгологии МГУ, а также препарат (+)-усниновой кислоты, приобретенной через фирму “Sigma” (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для лишайников характерно накопление в слоевищах значительных количеств продуктов собственного метаболического обмена, объединяемых общим термином “лишайниковые вещества”, среди которых представлены депсиды замещенных фенолкарбоновых кислот, а также модифицированные дибензофураны, такие, как усниновые кислоты [21, 22].

ИФА свойственна высокая специфичность в отношении веществ, для которых он предназначен и, как правило, у тест-систем для избирательного определения практически полностью исключена возможность распознавания даже их ближайших структурных аналогов. Располагая препаратами депсида атранорина и (+)-усниновой кислоты, мы провели проверку сохранения нормального функционирования тест-систем для определения метаболитов микромицетов в присутствии избыточных количеств этих веществ. По данным УФ-спектров растворов в ацетонитриле были рассчитаны молярные коэффициенты поглощения для трех основных максимумов: (+)-усниновая кислота – 193 (ε 27620), 233 (ε 34744), 281 нм (ε 25350); атранорин – 210 (ε 34900), 250 (ε 35100), 320 нм (ε 7480). Далее в экспериментах использовали исходные растворы этих веществ в ацетонитриле с концентрациями

100 мкг/мл, рассчитанными по величинам оптической плотности на длинноволновых максимумах поглощения. Для проверки специфичности тест-систем исходные растворы разбавляли в 10 раз ФСБ-т и затем в 100 и 1000 раз ФСБ-т, содержащим 10% ацетонитрила.

В условиях конкурентного анализа иммуноферментные тест-системы не обнаруживали атранорин и (+)-усниновую кислоту в концентрации 10 мкг/мл, превышающей на 3–4 порядка концентрации специфически определяемых метаболитов. Таким образом, перекрестная реактивность антител в отношении этих лишайниковых веществ была ниже 0.01%. Все это свидетельствовало о сохранении специфичности анализа и принципиальной возможности использования тест-систем для избирательного определения свойственных им свободных антигенов.

Сумма извлеченных веществ, полученная при экстракции, не создавала помех для конкурентного анализа. Для каждого вида объектов в одной или нескольких тест-системах находили “нулевые” образцы, у экстрактов которых аналитические показатели (% связывания антител) были равны или превышали 85%.

Судя по результатам анализа, у лишайника *C. stellaris* по всех образцах присутствовал СТЕ, очень часто, за редкими исключениями – ЭМО, МФК, ДАС и несколько реже – АОЛ и ЦИТ (табл. 1). Эти данные вполне соответствовали ранее описанным для образцов ягеля из Мурманской области и Карелии [4]. Такой же набор из 6 регулярно обнаруживаемых компонентов имели и другие представители семейства Cladoniaceae рода *Cladonia* секции *Cladina* (*C. rangiferina* и *C. arbuscula*), а также все другие исследованные виды, принадлежащие семейству Parmeliaceae (табл. 1).

Самые высокие уровни накопления были установлены для ЭМО – 10000–33000 нг/г или 0.001–0.003% и встречались у представителей видов *C. stellaris*, *Cetraria islandica* и *Evernia mesomorpha*. Наибольшие количества АОЛ у всех видов *Cladonia* и у *C. islandica* были на порядок ниже (1244 до 3550 нг/г, в среднем 2214 нг/г). По-видимому, накопление этих веществ в относительно высоких количествах может объяснить ранее описанные факты обнаружения ЭМО в составе вторичных продуктов метаболического обмена у *Xanthoria parietina* [23], *X. aureola*, *X. ulophyllodes* [24], *Asahinea chrysantha* [25] и *C. cucullata* [26], а также АОЛ – у *Graphis cognate* [27]. Определение этих метаболитов в слоевищах лишайников, выполненное методами хроматографии на силикагеле и сефадексе LH-20 с последующей УФ- и масс-спектрометрией, можно рассматривать, как под-

Таблица 1. Уровни накопления регулярно обнаруживаемых в лишайниках метаболитов микроскопических грибов

Вид лишайника (число исследованных проб)	Число положительных проб, количество вещества, нг/г (мин.-макс.), среднее					
	СТЕ (≥8)*	ЭМО (≥40)	МФК(≥40)	ЦИТ (≥40)	АОЛ (≥40)	ДАС (≥100)
<i>Cladonia stellaris</i> (71)	71 (11–1585) 234	62 (65–11220) 1722	64 (35–316) 75	39 (40–257) 70	49 (37–1549) 254	60 (100–400) 197
<i>C. rangiferina</i> (28)	25 (9–1260) 257	27 (40–3310) 646	23 (40–184) 68	14 (40–347) 89	20 (40–3550) 449	9 (124–355) 217
<i>C. arbuscula</i> (11)	11 (37–562) 134	11 (417–8815) 2347	11 (56–211) 106	6 (40–79) 60	11 (62–2512) 667	6 (100–214) 130
<i>Cetraria islandica</i> (31)	27 (8–631) 129	29 (50–32818) 1576	13 (40–245) 88	13 (40–407) 65	23 (50–1244) 358	11 (100–305) 178
<i>Evernia mesomorpha</i> (8)	8 (19–95) 48	8 (1351–10585) 3714	8 (195–1259) 363	8 (133–2399) 647	8 (100–733) 283	5 (105–380) 274
<i>Bryoria chalybeiformis</i> (16)	16 (18–115) 44	16 (195–7479) 1318	16 (46–1259) 399	14 (40–122) 82	16 (76–977) 368	3 (124, 178, 240) 181
<i>Usnea filipendula</i> (4)	4 (62–106) 80	4 (750–1262) 1055	4 (251–479) 340	4 (66–188) 115	4 (61–224) 102	4 (123–214) 163
<i>U. subfloridana</i> (3)	3 (60, 64, 64) 63	3 (794, 1350, 1622) 1255	3 (107, 158, 298) 188	3 (64, 66, 116) 82	2 (40, 50) 45	2 (100, 224) 162

* В табл. 1 и 2 – нижний предел измерения вещества, нг/г.

тверждение результатов, полученных иммунохимическим анализом.

Для остальных регулярно обнаруживаемых микотоксинов интенсивность накопления была ниже. Уровень содержания ЦИТ, равный 2399 нг/г, наблюдался только у *E. mesomorpha*. Наибольшие количества СТЕ у *C. stellaris* (1585 нг/г) и *C. rangiferina* (1260 нг/г) соответствовали уровню содержания 0.0001%. Близкий порог накопления МФК, равный 1259 нг/г, достигался у представи-

телей родов *Evernia* и *Bryoria*. Для ДАС не отмечено случаев превышения концентрации 400 нг/г. Обнаружение в лишайниках ЦИТ, СТЕ, МФК, ЦИТ и ДАС, о котором в этой работе сообщается впервые, оказалось возможным благодаря высокой чувствительности и избирательности метода ИФА. Самый верхний порог накопления этих метаболитов находится гораздо ниже сообщенного для лишайниковых веществ, по меньшей мере, на 2–3 порядка. Судя по доступным нам сведениям, количество атранорина в слоевищах *C. rangiferina*

Таблица 2. Уровни накопления нерегулярно обнаруживаемых в лишайниках метаболитов микроскопических грибов

Вид лишайника (число исследованных проб)	Число положительных проб, количество вещества, нг/г (мин.-макс.), среднее						
	ЦПК(≥100)	ЭА (≥10)	ОА (≥8)	PR(≥100)	ДОН(≥40)	ЗЕН(≥40)	ФУМ(≥100)
<i>Cladonia stellaris</i> (71)	7 (100–316) 181	4 (18–100) 50	–	1 158	–	1 40	–
<i>C. rangiferina</i> (28)	12 (100–355) 222	7 (11–63) 34	–	4 (105–155) 131	1 100	3 (54, 81, 100) 78	–
<i>C. arbuscula</i> (11)	6 (100–200) 142	2 (24, 41) 33	2 (10, 32) 21	–	1 100	–	–
<i>Cetraria islandica</i> (31)	18 (100–569) 289	3 (13, 20, 22) 18	–	3 (141, 155, 188) 161	3 (158, 158, 200) 172	–	1 200
<i>Evernia mesomorpha</i> (8)	3 (245, 245, 251) 247	2 (20, 32) 26	3 (12, 20, 32) 21	2 (100, 143) 122	–	6 (41–95) 71	–
<i>Bryoria chalybeiformis</i> (16)	9 (114–316) 172	–	1 8	7 (100–279) 144	4 (100–132) 119	–	5 (61–151) 104
<i>Usnea filipendula</i> (4)	2 (129, 184) 157	1 60	–	1 162	1 105	–	–
<i>U. subfloridana</i> (3)	2 (119, 200) 160	–	–	–	–	–	–

составляет 0.25% от веса сухого материала, а усниновой кислоты у *C. stellaris* в зависимости от места и времени сбора – от 0.37 до 2.17% [28].

Провести сравнение показателей встречаемости этих метаболитов у конкретных видов лишайников в рамках этой работы не представляется возможным, так как нижние пределы их обнаружения были неодинаковыми – 8 нг/г для СТЕ, 40 нг/г для ЭМО, МФК, АОЛ, ЦИТ и 100 нг/г для ДАС. Случаи совпадения минимально-обнаруживаемых количеств с нижними пределами определения метода отмечены для всех этих веществ, хотя чаще всего для ЦИТ и ДАС, реже для АОЛ и МФК и в единичных случаях для СТЕ и ЭМО.

Тем не менее, сама по себе возможность аналитической работы в этих диапазонах измерения позволила установить регулярный характер встречаемости этих веществ в организмах, принадлежащих разным таксономическим группам. Этот новый научный факт вполне согласуется с современной концепцией заселения лишайников устойчивым сообществом ассоциированных микроорганизмов [29].

Варьирование уровней содержания СТЕ, ЭМО и АОЛ оказалось весьма значительным и соответствовало диапазону в 2–3 порядка (табл. 1). По нашему мнению, это свидетельствует в пользу предположения о том, что образование этих ве-

ществ осуществляется ассоциированными микроскопическими грибами. Вполне возможно, что вклад в накопление микотоксинов в слоевищах вносят не только ассоциированные грибы, но и грибы, развивающиеся на поверхности лишайников, в частности альтернариин. Сравнимые уровни загрязненности АОЛ от десятков до тысяч мкг/кг известны для зерновых, травяных культур и других видов природных субстратов [30]. Если допустить участие в биосинтезе этих метаболитов лишайнизированного гриба (микобионта), то следует признать крайнюю неустойчивость его биохимического статуса.

Различия в количествах регулярно встречающихся грибных метаболитов могут быть связаны с особенностями заселения лишайников микромицетами, продуцирующими эти вещества, или же их биосинтетическими возможностями, на которые, в свою очередь, могут оказывать влияние факторы, определяющие их видовую принадлежность и субстратную специфичность. Так, эпигейные лишайники (*Cladonia*, *Cetraria*) существенно отличаются от эпифитных по уровням накопления СТЕ (129–257 нг/г и 44–80 нг/г) и МФК (68–106 нг/г и 188–769 нг/г) соответственно. У представителей вида *E. mesomorpha* количество ЦИТ (в среднем 647 нг/г) оказалось большим, чем у всех остальных (60–115 нг/г). У *S. rangiferina* накопление ЭМО (646 нг/г) было выражено гораздо слабее, чем у других исследованных видов (1055–3714 нг/г).

Во всех видах лишайников рода *Cladonia* и *C. islandica*, кроме уже рассмотренных метаболитов с регулярной встречаемостью, были найдены два азотсодержащих микотоксина – ЦПК и ЭА (табл. 2). Ранее в ягеле, собранном на севере, они не были обнаружены [4]. Возможно, расширение спектра идентифицированных компонентов связано с большим охватом экологически неоднородных территорий и появлением дополнительных факторов, влияющих на метаболическую активность грибов. Нижние пределы содержаний ЦПК везде совпадали с нижней границей измерения метода, поэтому можно предположить, что этот метаболит, как и ранее перечисленные, может быть отнесен к регулярно встречающимся. Случаи обнаружения ЦПК были отмечены и для остальных исследованных видов и также в количествах, близких к пределу измерения (114–251 нг/г).

Положительные результаты анализа были получены и в отношении других исследованных микотоксинов, за исключением Т-2, АВ₁ и РОА. В отдельных образцах или в единичных случаях выявляли PR, ОА, ЗЕН, ДОН и ФУМ и, как правило, в количествах, близких к предельным возможно-

Таблица 3. Продуценты микотоксинов, встречающиеся в агропродукции

Вид гриба	Микотоксин	Ссылка
<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) Wint. <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi <i>A. sydowii</i> (Bain. and Sart.) Thom and Church	СТЕ	[31]
<i>Penicillium</i> spp. <i>P. brunneum</i> Udagawa <i>Cladosporium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.	ЭМО	[19, 31]
<i>Penicillium cyclopium</i> Westl. <i>Aspergillus</i> spp.	ЦПК	[14, 31, 32]
<i>Penicillium stoloniferum</i> Thom <i>P. brevicompactum</i> Dierckx <i>P. roqueforti</i> Thom <i>Byssosclamyces nivea</i> Westl.	МФК	[15, 31]
<i>Alternaria</i> spp.	АОЛ	[30]
<i>Fusarium</i> spp.	ДАС	[33]

стям метода. Наибольшие уровни накопления этих метаболитов не превышали 0.0005%. Можно предположить, что их биосинтез грибами индуцируется или активируется лишь при сочетании определенных условий или же попадание продуцентов в число ассоциированных организмов затруднено.

Способность к активному продуцированию этих метаболитов известна для многих представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, паразитирующих на самых разнообразных природных субстратах. Сведения относительно видов потенциальных грибов-продуцентов, выделенных из кормовой агропродукции, суммированы в табл. 3. По аналогии с тем, что микобионты при изолированном культивировании часто образуют метаболиты, не идентичные найденным в лишайниках [34], можно предположить, что и несовершенные грибы в ассоциированном состоянии приобретают иные биосинтетические возможности, чем в условиях свободного обитания. Так, при

фузариозном поражении растений ДАС редко обнаруживается в них и, как правило, вместе с Т-2, а известные случаи загрязненности природных объектов СТЕ, ЦИТ, ЦПК, МФК и PR не часты. Применение ИФА открывает широкие перспективы для дальнейшего изучения биосинтетических возможностей грибов, включенных в жизненный цикл лишайников.

Лишайники традиционно рассматриваются, как перспективные источники физиологически активных веществ, применение которых в медицине, диетологии, парфюмерии, косметологии и других областях получает все большее развитие [35]. Выявленный нами новый факт присутствия в этих организмах метаболического фона из веществ, среди многообразия свойств которых известны и негативные формы воздействия на биосистемы, несомненно, следует учитывать при расширении сферы их практического использования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журбенко М.Л. // Новости систематики низших растений. 1998. Т. 32. С. 28–40.
2. Petrini O., Hake U., Dreyfuss M.M. // Mycologia. 1990. V. 82. № 4. P. 444–451.
3. Girlanda M., Isocrono D., Bianco C., Luppi-Mosca A.M. // Mycologia. 1997. V. 89. № 4. P. 531–536.
4. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Докл. Россельхоз-академии. 2011. № 2. С. 54–56.
5. Burkin A.A., Zorjan V.G., Soboleva N.A., Kononenko G.P. // Baltic J. Laboratory Animal Sci. 2000. V. 10. № 1. С. 26–32.
6. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Токарев С.В. // Докл. Россельхозакадемии. 2007. № 6. С. 28–30.
7. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. № 2. С. 16.
8. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 3. С. 305–311.
9. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 1. С. 187.
10. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А., Зотова Е.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 1. С. 93–97.
11. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Соболева Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 1. С. 116–121.
12. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. // Докл. Россельхозакадемии. 2005. № 2. С. 47–49.
13. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 7. С. 769–774.
14. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42. № 2. С. 178–184.
15. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Прикл.биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 5. С. 592–598.
16. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Конкина Г.А., Озерская С.М. // Прикл.биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 505–510.
17. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Современная микология в России. М.: Национальная академия микологии, 2008. С. 245.
18. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. № 2. С. 7–8.
19. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Успехи медицинской микологии. Т. 9. М.: Национальная академия микологии, 2007. С. 88–89.
20. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Зорян В.Т., Соболева Н.А., Зотова Е.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 4. С. 428–432.
21. Равинская А.П. // Новости систематики низших растений. 1984. Т. 21. С. 160–179.
22. Дембицкий В.М., Толстиков Г.А. Органические метаболиты лишайников. Новосибирск: СО РАН филиал “Гео”, 2005. 135 с.
23. Кривошекова О.Е., Максимов О.Б., Мищенко Н.П., Степаненко Л.С. // Химия природных соединений. 1981. № 1. С. 96–97.
24. Plattelli M., Nicola M.G. // Phytochemistry. 1968. V. 7. № 7. P. 1183–1187.
25. Мищенко Н.П., Степаненко Л.С., Кривошекова О.Е., Максимов О.Б. // Химия природных соединений. 1980. № 2. С. 160–165.
26. Krivoshechkova O.E., Maximov O.B., Stepanenko L.S., Mishchenko N.P. // Phytochemistry. 1982. V. 21. № 1. P. 193–196.
27. Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N., Hamada N. // Phytochemistry. 2003. V. 62. № 1. P. 71–75.
28. Равинская А.П., Вайнштейн Е.А. // Новости систематики низших растений. 1975. Т. 12. С. 266–273.
29. Lawrey J.D., Diederich P. // Bryologist. 2003. V. 106. P. 81–120.
30. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 1. С. 79–83.
31. Moreau C. Moulds, Toxins and Food. Chichester-New York-Brisbane-Toronto: John Wiley & Sons, 1979. 477 p.
32. Буркин А.А., Пирязева Е.А., Кононенко Г.П., Малиновская Л.С. // Успехи медицинской микологии. Т. 7. М.: Национальная академия микологии, 2006. С. 94–95.
33. Буркин А.А., Пирязева Е.А., Малиновская Л.С., Кононенко Г.П. // Успехи медицинской микологии. Т. 7. М.: Национальная академия микологии, 2006. С. 95–96.
34. Miyagawa K., Yamashita M., Ueno Y., Hamada N. // Phytochemistry. 1997. V. 46. № 7. P. 1289–1291.
35. Muggia L., Schmitt L., Grube M. // SIM News. 2009. V. 59. № 3. P. 85–97.

Enzyme Immunoassay of the Secondary Metabolites of Micromycetes as Components of Lichen Substances

G. P. Kononenko^a, A. A. Burkin^a, and T. Yu. Tolpysheva^b

^a All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitary, Hygiene, and Ecology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Zvenigorodskoe sh. 5, Moscow, 123022 Russia

e-mail: kononenkogp@mail.ru

^b Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

Received February 22, 2011

Abstract—The composition of low-molecular biologically active metabolites typical of microscopic fungi has been studied in blastemas of fruticose lichens of the genera *Cladonia*, *Cetraria*, *Evernia*, *Bryoria*, and *Usnes*. The enzyme immunoassay method showed the presence of sterigmatocystin, emodin, mycophenolic acid, citrinin, alternariol, and diacetoxyscirpenol, which occurred regularly and, in most cases, at a frequency of 55 to 100%. The highest levels of accumulation were 0.001–0.003% for emodin, 0.0002% for alternariol and citrinin, 0.0001% for sterigmatocystin and mycophenolic acid, and 0.00005% of the weight of air-dry material for diacetoxyscirpenol. Other metabolites (cyclopiazonic acid, ergot alkaloids, ochratoxin A, PR toxin, deoxynivalenol, zearalenone, and fumonisins) were detected in these lichens less frequently (sometimes only upon the expansion of the territory of sampling), and their content was no more than 0.00005%. The peculiarities of the component composition and the levels of accumulation of fungal metabolites in lichens of different taxonomic affiliation were discussed.

УДК 577.151.04

ЛИПОКСИГЕНАЗА ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ, ВЫРАЩЕННОЙ В УСЛОВИЯХ РАЗНОГО ВОДООБЕСПЕЧЕНИЯ

© 2012 г. М. Д. Пермякова*, А. В. Пермяков*, С. В. Осипова*, Т. А. Пшеничникова**

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033
e-mail: gluten@sifibr.irk.ru

**Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090
e-mail: wheatpsh@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 25.01.2011 г.

Исследована липоксигеназа (ЛОГ) в белковых фракциях, выделенных из листьев замещенных линий пшеницы. Были обнаружены 3 молекулярные формы фермента. Водный дефицит вызывал индукцию мембраносвязанной формы (мЛОГ) и приводил к уменьшению активности «растворимых» ферментов (р1ЛОГ) и (р2ЛОГ) у большинства генотипов. Корреляционный анализ показал зависимость между уровнем ферментативной активности и индексами устойчивости к засухе. Генетический контроль активности р1ЛОГ и р2ЛОГ при оптимальном водообеспечении был связан с хромосомами 1A, 1D, 3A, 5A, 5B и 5D, а в условиях смоделированной почвенной засухи – с хромосомами 1B и 1D.

Липоксигеназа (линолеат: кислород оксидоредуктаза, ЛОГ, Lpx, LOX, КФ 1.13.11.12) катализирует окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и образует у растений 2 класса продуктов, 9(S)- и 13(S)- гидроперекиси, которые являются предшественниками большого количества оксигенированных производных, играющих важную роль в процессах онтогенеза растений и адаптации к стрессам [1].

Существует несколько направлений метаболического пути ПНЖК, инициированных действием различных высокоспециализированных форм липоксигеназы, с участием ферментов октадеканойдного пути [2]. В ответ на водный дефицит возможно существование, по меньшей мере, трех реакционных каскадов ЛОГ.

1. Алленоксидсинтазный (АОС) путь, в котором происходит дегидратация гидроперекисей с образованием нестабильных окисей аллена, гидролизующихся с образованием кетолов. В присутствии алленоксидциклазы (АОС) окись аллена, соответствующая 13-гидропероксилиноленату может претерпевать циклизацию, образуя циклопентеновые соединения – жасмоновую кислоту (ЖАК) и другие жасмонаты, широко известные как фитогормоны и сигнальные молекулы.

2. Пероксигеназный путь протекает с образованием гидрокси- и эпоксипроизводных жирных кислот. Некоторые из них являются мономерными субстратами для гетерополимера кутина – одного из компонентов защитного покрова растений – кутикулы. Кутикулярная транспирация, как известно, при недостатке влаги, когда устьица

закрыты, приобретает большое значение в водном режиме растений.

3. Гидропероксидлиазный путь, в котором 9-гидропероксиды превращаются в С9 альдегиды и С9 альдокислоты, а 13-гидропероксиды – в С6 альдегиды и С12 альдокислоты. Продукты этого пути, хорошо известные своей защитной ролью при биотических стрессах, являются также сильнейшими регуляторами факторов роста [3]. Регуляция темпов развития в условиях водного дефицита чрезвычайно важна для растений, так как они вынуждены либо замедлять свое развитие, либо ускорять его, стремясь закончить жизненный цикл до наступления засухи.

У некоторых видов растений, например у сои, изоферментный состав липоксигеназы, ее физиологическая роль и генетический контроль хорошо изучены. Однако у пшеницы – основной хлебной культуры большинства стран мира – этот фермент исследован недостаточно.

Цель работы – выявление молекулярных форм фермента в белковых фракциях, выделенных из листьев пшеницы, выращенной в условиях разного водообеспечения; изучение хромосомного контроля их ферментативной активности; определение влияния активности ЛОГ на сохранение зерновой продуктивности пшеницы в условиях засухи.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Объектами исследования служили сорта гексаплоидной пшеницы Тулунская 12, Иркутская, Чайниз Спринг (ЧС), а

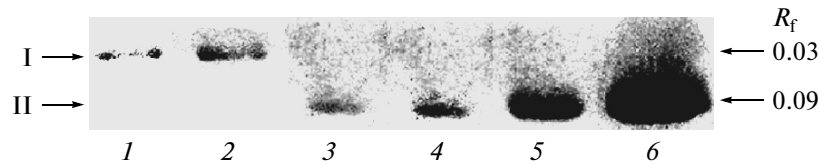


Рис. 1. Электрофореграмма ЛОГ в 7%-ном ПААГ растворимой белковой фракции I, выделенной из листьев пшеницы, выращенной в условиях разного водообеспечения. 1 – Иркутская, 3 нед. после прорастания; 2 – Тулунская 12, 3 нед. после прорастания; 3 – Иркутская, кушение, контроль; 4 – Иркутская, кушение, засуха; 5 – Тулунская 12, кушение, контроль; 6 – Тулунская 12, кушение, засуха. I – р2ЛОГ; II – р1ЛОГ.

также искусственно синтезированный аллогексаплоид Синтетик бх (**Синбх**) и набор замещенных линий (ЗЛ) пшеницы Чайниз Спринг/Синтетик бх (**ЧС/Синбх**), в которых пара хромосом сорта-реципиента ЧС замещена на гомологичную пару от донора Синбх [4]. Семенной материал ЗЛ и их родителей любезно предоставил А. Бёрнер (Институт генетики сельскохозяйственных культур (IPK) г. Гатерслебен, Германия).

Условия выращивания растений. Пшеницу выращивали в контролируемых условиях вегетационной камеры фитотрона СИФИБР СО РАН на субстрате, состоящем из равного количества перегнойной почвы, песка и торфа при 16-часовом световом периоде и мощности дополнительного освещения 260 Вт/м². Температура воздуха составляла 22.5 ± 1.8°C днем и 12.5 ± 1.8°C ночью. Температура почвы была 19 ± 1°C. В контрольной группе растения получали оптимальный полив (60% от полной влагоемкости почвы), а в опытной группе – 50% от оптимального количества воды.

Ферментные экстракты приготавливали растиранием в ступке замороженных в жидком азоте листьев с тройным количеством 0.1 М трис-НСI-буферного раствора, содержащего 1 мМ ЭДТА (рН 7.5). Субклеточные фракции ЛОГ были получены последовательным центрифугированием фильтрата листьев при 9500 g в течение 20 мин, при 105000 g в течение 80 мин. Для исследования брали ресуспендированный в том же буферном растворе осадок после центрифугирования при 105000 g (микросомальная фракция), супернатант после ультрацентрифугирования (**растворимая фракция I**) и ресуспендированный осадок после центрифугирования при 9500 g (**растворимая фракция II**). ПААГ-электрофорез выполняли по Девису, а гистохимическое окрашивание в геле – по методу Хейдека [5]. Активность ЛОГ анализировали спектрофотометрически по поглощению образующихся пероксидов [6]. Концентрацию белка определяли по Бредфорд [7]. Удельную активность выражали отношением числа единиц активности (**E**) фермента к концентрации белка мг/мл

экстракта. Для выявления эффектов замещения хромосом на генетическом фоне сорта-реципиента все сравнения проводили с ЧС.

Стандартными методами [8] в фазе цветения растений измеряли параметры накопления биомассы – массу побега и флагового листа. В фазе полной спелости изучали показатели продуктивности – массу колоса, количество зерен в колосе и массу зерна в колосе. Засухоустойчивость родителей и ЗЛ оценивали по степени сохранения параметров в условиях недостаточного водообеспечения. Определяли индексы устойчивости к засухе (**ИУ**, %) по каждому из изучаемых параметров, как отношение средних значений параметра при засухе к контролю в процентах [9]. Для интегральной оценки засухоустойчивости генотипов определяли суммы ИУ по двум параметрам накопления биомассы, трем показателям продуктивности и по всем изученным параметрам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В растворимой фракции I, выделенной из листьев пшеницы сибирских сортов Тулунская 12 и Иркутская, были обнаружены 2 молекулярные формы ЛОГ (р1ЛОГ, р2ЛОГ), различающиеся относительной электрофоретической подвижностью R_f (рис. 1). Молекулярная форма р1ЛОГ имела R_f 0.09 и обнаружена на стадии кушения растений. Молекулярная форма р2ЛОГ с R_f 0.03 найдена только на самой ранней стадии развития растений, а на стадии кушения отсутствовала. Однако в этой же белковой фракции, выделенной из листьев ЗЛ пшеницы ЧС/Синбх и их родителей, обе молекулярные формы присутствовали на стадии цветения растений (рис. 2). Фермент р2ЛОГ был найден также в растворимой фракции II, содержащей растворимые белки митохондрий и хлоропластов. Молекулярные формы р1ЛОГ и р2ЛОГ присутствовали у всех изучаемых сортов и ЗЛ как при оптимальном, так и при недостаточном водообеспечении.

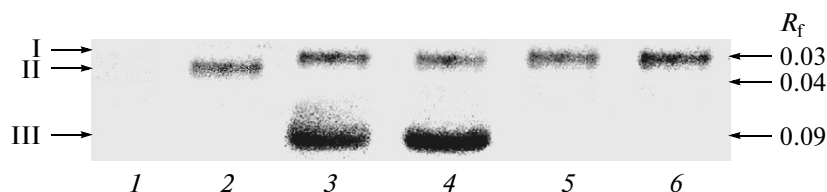


Рис. 2. Электрофореграмма ЛОГ в 7%-ном ПААГ белковых фракций, выделенных из листьев пшеницы Синтетик 6х, выращенной в условиях разного водообеспечения (фаза цветения растений). 1, 2 – микросомальная фракция; 3, 4 – растворимая фракция I; 5, 6 – растворимая фракция II. 1, 3, 5 – контроль; 2, 4, 6 – засуха. I – р2ЛОГ; II – мЛОГ; III – р1ЛОГ.

Молекулярная форма фермента с R_f 0.04, обнаруженная в микросомальной фракции белков листьев пшеницы ЧС, Син6х и ЗЛ ЧС/Син6х, обозначенная нами как мЛОГ, была найдена только в образцах растений, подвергавшихся засухе (рис. 2). Отсутствие мЛОГ и ее ферментативной активности в контрольных образцах свидетельствовало о том, что индукция этой мембраносвязанной ЛОГ была вызвана почвенной засухой.

Уровни ферментативной активности в изученных белковых фракциях представлены на рис. 3. Активность индуцированной засухой мЛОГ у сорта-реципиента ЧС была очень низкой, а у донора Син6х – значительно выше (рис. 3а). Все изученные ЗЛ значительно превышали сорт-реципиент по этому признаку, за исключением линий с замещением хромосом 5D и 6D. Интересен тот факт, что именно эти ЗЛ отличались наибольшей засухоустойчивостью, а одна из самых чувствительных к засухе линий, ЗЛ по хромосоме 3A, имела самую высокую активность мЛОГ (данные по засухоустойчивости генотипов не показаны). Это свидетельствует об участии молекулярной формы мЛОГ в защитном механизме при водном дефиците.

Несомненно, что этот механизм связан с жасмонатзависимой (ЖАК) защитной сигнализацией. Жасмонатный сигнальный путь известен у многих растений и широко изучается [10, 11]. В листьях пшеницы были обнаружены как 9(S)-, так и 13(S)-гидроперекиси жирных кислот, а также алленоксидсинтаза – один из ферментов жасмонатного направления катаболизма ПНЖК [12], что подтверждает наличие этого метаболического пути и ЖАК-сигнализации у пшеницы.

В последние годы расшифрованы основные участники жасмонатной сигнальной системы: первичный ЖАК-сигнал; предполагаемый рецептор для жасмонатов – COI1 (от coronatine insensitive 1, устойчивость к коронатину); убиквитинлигазный комплекс, разрушающий негативные репрессоры ЖАК-сигнализации, который включает COI1 и комплекс Skp1/Cullin/F-box, где

Skp1 – белок, ассоциированный с киназой S-фазы, Cullin – Ring-box белок, F-box – F-box белок; ЖАК-ZIM-домен-репрессорные белки, которые служат мишенью для убиквитинлигазного комплекса, где ZIM – “цинковые пальцы”, белок, экспрессированный в цветочной меристеме (от Zink-finger protein expressed in inflorescence meristem); факторы транскрипции, регулирующие экспрессию генов, индуцированных жасмонатами [13]. Среди жасмонат-индуцированных белков имеются ингибиторы протеиназ, ингибитор трипсина, тионин, вегетативные запасные белки, фенилаланинаммонийлиаза, халконсинтаза, ЛОГ, полифенолоксидаза и др. [14].

Не исключено также, что мЛОГ способна к прямому окислению липидов биологических мембран, приводящему к изменению их текучести и проницаемости для ионов, а также к перестройке цитоскелета. Имеются данные, что отдельные изоферменты ЛОГ сои участвовали в окислительной модификации мембранных липидов, вызванной водным дефицитом [15].

Достоверный коэффициент корреляции с параметром “Количество зерен в колосе” ($r = 0.505^*$) подтверждал положительное влияние активности мЛОГ на зерновую продуктивность в условиях засухи.

Является ли индукция мЛОГ специфическим ответом на водный дефицит или связана также и с другими стрессорами, предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Ферментативная активность в растворимой белковой фракции I у родителей популяции ЧС/Син6х значительно различалась как в контроле, так и “на засухе”. При оптимальном водном режиме активность ЛОГ у донора хромосом была высокой, а у реципиента – низкой. В условиях недостатка влаги реципиент значительно снижал уровень активности, как и большинство ЗЛ. Однако у линий с замещением хромосом 1A и 3A уровень активности достоверно не отличался от контроля, а у донора и ЗЛ по хромосомам 1D и

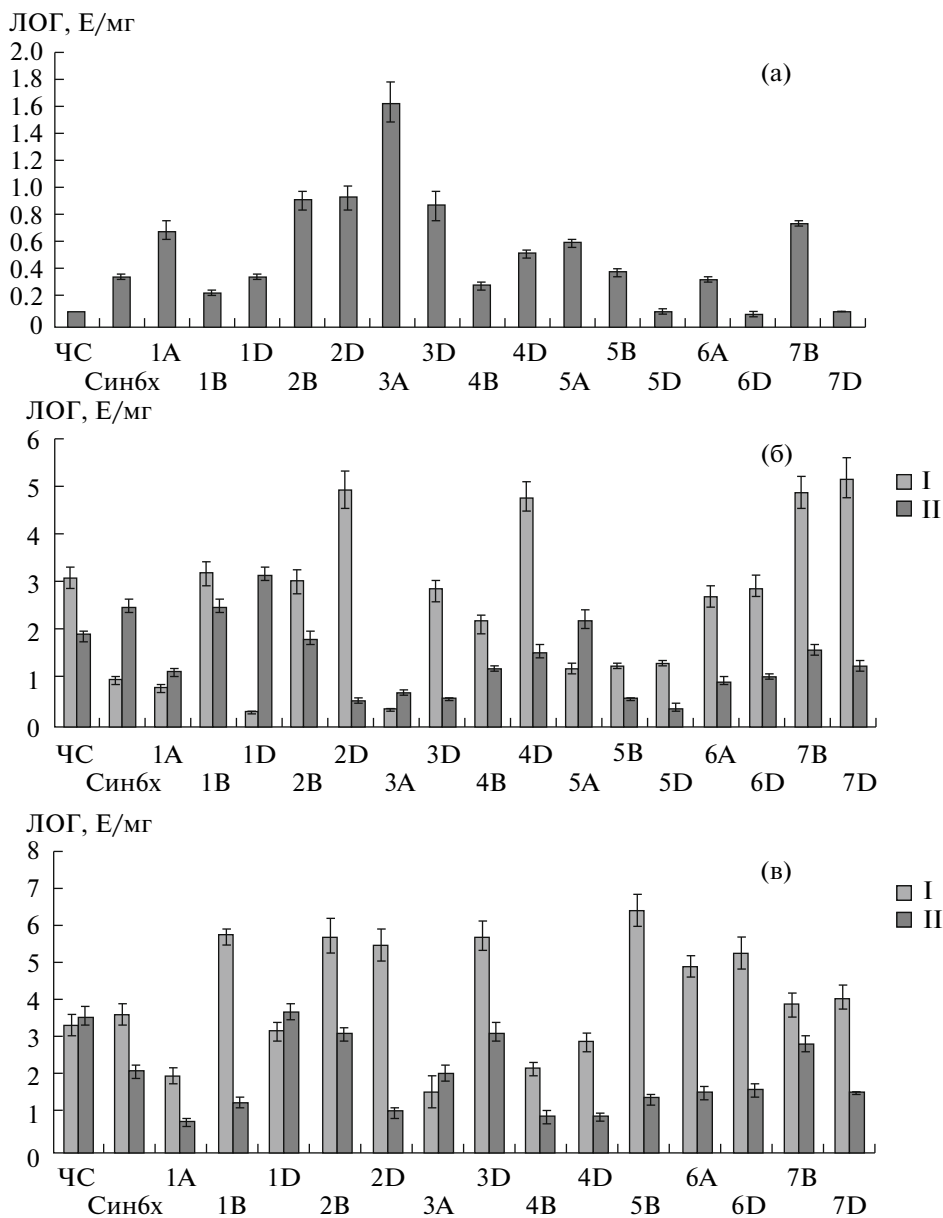


Рис. 3. Удельная активность (Е/мг) ЛОГ в белковых фракциях, выделенных из листьев пшеницы 3Л ЧС/Синбх и их родителей (фаза цветения растений): мЛОГ в микросомальной фракции (а), р1ЛОГ и р2ЛОГ (суммарная) в растворимой фракции I (б) и р2ЛОГ в растворимой фракции II (в). I – контроль, II – засуха.

5А значительно повышался. Вероятно, в суммарной растворимой фракции, содержащей р1ЛОГ и р2ЛОГ, увеличение уровня активности у этих генотипов при действии засухи происходит за счет увеличения активности р1ЛОГ, так как в растворимой фракции II, содержащей только р2ЛОГ, во всех образцах уровень активности снижился или достоверно не изменялся (рис. 3в).

Это подтверждают также результаты селективного окрашивания ЛОГ в пластинках ПААГ в

данной белковой фракции, выделенной из листьев пшеницы в фазе кущения растений, где у отдельных генотипов мы наблюдали значительное увеличение интенсивности окраски зоны р1ЛОГ в условиях водного дефицита по сравнению с контролем (рис. 1). Вероятно, эти изменения могут выражать адаптивную реакцию на водный стресс и повышение устойчивости к засухе.

Необходимо отметить, что в нашей работе большинство 3Л, которые имели низкий кон-

Корреляционные связи между активностью р2ЛОГ в растворимой фракции П и индексами устойчивости (ИУ) у пшеницы 3Л СС/Синбх и их родителей

Параметр	Удельная активность р2ЛОГ	
	контроль	засуха
Масса колоса	0.603 **	0.346
Количество зерен в колосе	0.536*	0.019
Масса зерна в колосе	0.613**	0.233
Масса побега	0.456*	0.408
Масса флагового листа	0.195	0.492*
Σ по параметрам продуктивности	0.612**	0.215
Σ по параметрам биомассы	0.392	0.485*
Σ по всем параметрам	0.613**	0.442*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

трольный ферментативный уровень в растворимых фракциях и (или) значительно снижали его в условиях водного дефицита, показали высокую активность мЛОГ. Линия с замещением хромосомы 3А, с самой низкой активностью цитозольных ЛОГ, имела наиболее высокий уровень активности мЛОГ. Это говорит о взаимосвязи и взаимодействии между метаболическими путями деградации липидов, катализируемых разными изоферментами ЛОГ и некоторой “компенсации” одного пути другим для обеспечения наибольшей устойчивости генотипов к стрессу.

Об изоферментном составе липоксигеназ пшеницы имеется немного сведений. Известно о трех молекулярных формах ЛОГ в зрелом зерне, влияющих на качество клейковины [16, 17]. В листьях пшеницы была обнаружена дифференциальная индукция трех изоферментов ЛОГ под воздействием различных элиситоров [18]. Изофермент с молекулярной массой 100 кДа, названный авторами LOX100, был преобладающим в контрольных образцах, а при обработке растений метилжасмонатом, хитин-олигосахаридами и хитозаном его индукция увеличивалась. Однако обработка элиситором Pgt (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *Tritici* Erikss. & Henn) уменьшала индукцию этого белка и вызывала появление двух новых

изоформ. Вероятно, один из растворимых белков, обнаруженных нами, – это LOX100, который находится в листьях пшеницы, участвуя в процессах ее роста и развития.

Для цитозольной ЛОГ также может подходить роль вегетативного запасного белка (ВЗБ). Имеются данные, что один из ВЗБ сои относится к семейству липоксигеназ, присутствуя в листьях в течение вегетативного роста растений, а после цветения деградирует, увеличивая пул доступных аминокислот. Однако стрессовые факторы, такие, как удаление репродуктивных органов и водный дефицит, могут значительно увеличивать экспрессию его генов и сохранять мРНК на высоком уровне более длительное время [19].

Молекулярная форма р2ЛОГ может выполнять роль ВЗБ. В этом случае уменьшение активности при водном дефиците у большинства исследуемых 3Л объясняется усиленным расходом фермента для роста и развития растений в условиях стресса и логична корреляционная зависимость засухоустойчивости генотипов от их конститутивного (контроль) уровня ферментативной активности (таблица). В популяции 3Л СС/Синбх контрольный уровень активности р2ЛОГ положительно коррелировал с ИУ по продуктивности, по массе побега и суммой ИУ по всем изученным параметрам. У растений, выращенных в условиях водного дефицита, была обнаружена корреляция с ИУ по параметрам биомассы, а также с суммой ИУ по всем изученным параметрам.

Продуктивность пшеницы – интегральный признак, отражающий все процессы вегетативного и репродуктивного роста и развития и их взаимодействия с окружающей средой. Стабильность этого признака в условиях недостатка влаги является наиболее важной целью в селекции пшеницы на засухоустойчивость. Однако за последнее столетие не произошло значительного прогресса в этой области, что обусловлено сложным полигенным наследованием засухоустойчивости, когда его проявление складывается из небольших эффектов многих генов [20]. В связи с этим изучение генетического контроля активности ЛОГ, как одного из факторов, влияющих на зерновую продуктивность в условиях засухи, актуально.

Ранее нами были картированы локусы, ассоциированные с активностью двух изоферментов ЛОГ зерновки пшеницы [21]. Кроме того, мы показали, что гены ЛОГ наследуются в тесном сцеплении с различными генами защитного ответа, создавая большие функциональные единицы для адаптации растений к стрессам [22].

Использование в данной работе линий пшеницы с замещением отдельных пар хромосом и об-

наруженный полиморфизм по удельной активности ЛОГ позволили нам показать, что ферментативная активность всех трех молекулярных форм имеет полигенный контроль с участием многих генов, расположенных на хромосомах разных гомеологических групп (рис. 3).

Четкие эффекты замещения хромосом на генетическом фоне сорта-реципиента по суммарной ферментативной активности р1ЛОГ и р2ЛОГ в растворимой фракции I способствовали выявлению “критических” хромосом, связанных с их генетическим контролем. При достаточном водобеспечении – это хромосомы 1A, 1D, 3A, 5A, 5B и 5D, а “на засухе” – хромосомы 1B и 1D (рис. 3 б). Хромосомы 5 гомеологической группы, вероятно, несут гены биосинтеза этих ферментов, так как ранее с использованием нуллисомно-тетрасомных линий сорта ЧС, было показано, что структурные гены нескольких изоферментов ЛОГ находятся на хромосомах 4 и 5 гомеологических групп [23]. Хромосома 3A и все хромосомы 1 гомеологической группы, вероятно, связаны с генетической регуляцией их активности.

Значительная площадь мировых посевов пшеницы находится в зоне недостаточного или неустойчивого увлажнения. Засуха – один из наиболее суровых, непредсказуемых и важных с экономической точки зрения абиотических стрессоров, ограничивающих зерновую продуктивность пшеницы. Результаты данной работы показывают, что одним из факторов, связанных с сохранением продуктивности в условиях недостатка влаги, может быть активность изоферментов ЛОГ, в частности конститутивный уровень активности р2ЛОГ и ферментативная активность мЛОГ.

Выявленные нами молекулярные формы фермента принимали дифференцированное участие в адаптации растений пшеницы к засухе. Дальнейшее их изучение представляет интерес для познания биохимических механизмов устойчивости растений к водному дефициту, а генетической регуляции их активности – для создания новых засухоустойчивых генотипов методами хромосомной и генетической инженерии и селекцией с помощью маркеров (MAS, Marker-Assisted Selection).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Siedow J.N.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. V. 42. № 1. P. 145–188.
2. *Feussner I., Wasternack C.* // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. V. 53. № 1. P. 275–297.
3. *Гречкин А.Н., Тарчевский И.А.* // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 1. С. 132–142.
4. *Nicholson P., Rezannor H.N., Worland A.J.* // Plant Breeding. 1993. V. 110. № 3. P. 177–184.
5. *Heydeck D., Schewe T.* // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 44. № 7–8. P. 1261–1263.
6. *Пермякова М.Д., Труфанов В.А., Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 96–102.
7. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V.72. № 1. P. 248–254.
8. *Пустовой И.В., Филин В.И., Корольков А.В.* Практикум по агрохимии. М: Колос, 1995. 319 с.
9. *Kuol B.G.* Breeding for Drought Tolerance in Sesame (*Sesamum indicum* L.) in Sudan. Göttingen: Cuvillier Verlag, 2004. 224 p.
10. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. М: Наука, 2002. 294 с.
11. *Kasan K., Manners J.M.* // Plant Physiol. 2008. V. 146. № 4. P. 1459–1468.
12. *Grechkin A. N.* // Prog. Lipid Res. 1998. V. 37. № 5. P. 317–352.
13. *Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л.* // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 5. С. 643–653.
14. *Sembdner G., Parthier B.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1993. V. 44. № 1. P. 569–589.
15. *Maccarrone M., Veldink G.A., Finazzi Aghro A., Vliegenhart F.G.* // FEBS Lett. 1995. V. 371. № 3. P. 223–226.
16. *Shiiba K., Negishi Y., Okada K., Nagao S.* // Cereal Chem. 1991. V. 68. № 2. P. 115–122.
17. *Труфанов В.А., Пермякова М.Д., Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф., Давыдов В.А., Пермяков А.В., Березовская Е.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 1. С. 102–108.
18. *Bohland C., Balkenhold T., Loers G., Feussner I., Grambow H.J.* // Plant Physiol. 1997. V. 114. № 2. P. 679–685.
19. *Tranbarger T.J., Franceschi V.R., Hildebrand D.F., Grimes H.D.* // Plant Cell. 1991. V. 3. № 9. P. 973–987.
20. *Cattivelli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Francia E., Mare C., Tondelli A., Stanca A.M.* // Field Crops Res. 2008. V.105. № 1–2. P. 1–14.
21. *Пшеничникова Т.А., Осипова С.В., Пермякова М.Д., Митрофанова Т.Н., Лохвассер У., Рёдер М., Бёрнер А.* // Генетика. 2008. Т. 44. № 5. С. 654–662.
22. *Permyakova M.D., Trufanov V.A., Pshenichnikova T.A., Börner A.* // EWAC Newsletter. Proc. 14th Int. EWAC Conf. / Eds: A. Börner, J.W. Snape. Istanbul, Turkey. Gatersleben: IPK. 2008. P. 142–145.
23. *Li W.L., Faris J.D., Chittoor J.M., Leach J.E., Hulbert S.H., Liu D.J., Chen P.D., Gill B.S.* // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 98. № 1–2. P. 226–233.

Lipoxygenase from the Leaves of Wheat Grown under Different Water Supply Conditions

M. D. Permyakova^a, A. V. Permyakov^a, S. V. Osipova^a, and T. A. Pshenichnikova^b

^a *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

e-mail: gluten@sifibr.irk.ru

^b *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

e-mail: wheatpsh@bionet.nsc.ru

Received January 25, 2011

Abstract—Lipoxygenase (LOG) in protein fractions isolated from the leaves of substituted wheat lines was investigated. Three molecular forms of the enzyme were detected. A water deficiency caused the induction of a membrane-bound form (mLOG) and resulted in a decrease in the activity of “soluble” enzymes (s1LOG) and (s2LOG) in most genotypes. A correlation analysis demonstrated the dependence between the level of enzymatic activity and indices of resistance to drought. A genetic control of the s1LOG and s2LOG activity at an optimal water supply level was associated with chromosomes 1A, 1D, 3A, 5A, 5B, and 5D, while under the conditions of the modeled soil drought, it was associated with chromosomes 1B and 1D.

УДК 581.138.1

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА ГЕНЕРАЦИЮ ОКСИДА АЗОТА (NO) В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2012 г. А. К. Глянько, Н. Б. Митанова, А. В. Степанов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033

e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 12.01.2011 г.

Изучен уровень оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с помощью флуоресцентного зонда ДАФ-2ДА и флуоресцентной микроскопии. Анализированы поперечные срезы корня толщиной 100–150 мкм (участок корня 10–15 мм от апекса). Показано, что уровень NO в корнях через 24 ч увеличивался более чем в 2 раза в вариантах с NaNO₂ и нитропруссидом натрия. При подкормке проростков KNO₃ пик в накоплении NO в корнях (увеличение в 2 раза) наблюдался через 30 мин. Подкормка проростков L-аргинином (2 мМ) увеличивала интенсивность флуоресценции срезов корней более чем в 2 раза. Инокуляция проростков клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) способствовала снижению содержания NO на фоне контроля (H₂O), нитропруссидом натрия и азотных соединений. Ловушки (скавенджеры) NO (2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксид 3-оксид - ФТИО, гемоглобин) и ингибиторы нитратредуктазы и животной NO-синтазы (вольфрамат натрия, аминоксидин гидрохлорид) снижали уровень NO в корнях. Результаты обсуждаются в связи с ролью NO в растениях при действии биотических и абиотических факторов.

Оксид азота (NO) — газообразная молекула, свободный радикал, обладает широким спектром биологического действия. Физиологические эффекты NO сложны и многообразны. Эта молекула легко проходит через плазматические мембраны и действует как межклеточный переносчик сигналов и как вторичный посредник внутриклеточных сигнальных систем [1]. У млекопитающих NO вовлекается в регуляцию сосудистого гомеостаза, в нейрональную сигнализацию, в иммунный ответ организма на инфекцию, воспаление и другие физиологические процессы [1, 2]. В практической медицине широко используются NO-препараты для лечения сердечно-сосудистых и других заболеваний человека (нитроглицерин, изосорбит моно- и динитрат, нитропруссид и др.).

В растениях участие NO охватывает большой диапазон физиологических функций, связанных с защитой растения от неблагоприятных абиотических и биотических факторов, ростом, окислительным стрессом, программированной клеточной смертью, сигнальной трансдукцией и транскрипционными факторами [3–6].

Интерес к оксиду азота со стороны фитобиологов усилился после установления феномена выделения NO из растительных тканей [7, 8]. Было установлено, что эмиссия NO из тканей увеличивается при экстремальных условиях среды [9–11]. В больших концентрациях молекула NO токсична для бактерий, грибов, опухолевых клеток, вирусов, растений, животных [12]. Так, оксид азота в миллимолярных концентрациях индуцировал

активность каспаз, вызывал распад нуклеиновых кислот и уменьшал синтез АТФ, но микромолярная концентрация этого соединения в условиях окислительного стресса подавляла перекисное окисление липидов и фрагментацию ДНК в клетках табака [13].

Токсичность молекулы NO связана с ее высокой способностью реагировать с белками, содержащими металлы с переменной валентностью, и кислородом, а также образовывать продукты с аминами и тиолами [14]. В связи с этим в научную литературу введен термин “нитрозативный стресс” (nitrosative stress) аналогично “окислительному стрессу” (oxidative stress) [15, 16]. В то же время высокая химическая активность и полифункциональный характер действия NO затрудняет разработку модели о ее роли в сигнальных путях клетки [1, 17]. Тем не менее в настоящее время принято, что оксид азота образует одну из 8 сигнальных систем организмов — NO-синтазную сигнальную систему [18].

Биологическая роль NO в растениях изучена недостаточно по сравнению с животными организмами [19]. Одной из причин этого может быть вопрос о путях синтеза NO в растениях. Если для животных организмов этот вопрос решен, то для растений обсуждаются, по крайней мере, два пути синтеза NO: образование при ферментативном восстановлении нитратов, нитритов и L-аргининзависимый синтез, катализируемый ферментом, подобным животной NO-синтазе [19]. Возможны и другие пути генерации NO в растениях:

с участием полиаминов [20] и при неэнзиматическом восстановлении нитратов [21]. В связи с этим логично предположить, что неодинаковые по природе внешние факторы будут вызывать в растительных клетках активацию различных путей синтеза NO.

С этой точки зрения представляет интерес изучение влияния ризобиальной инфекции и азотных солей на генерацию корнями бобового растения оксида азота. Тем более, что роль NO в бобово-ризобиальном симбиозе изучена недостаточно, особенно на начальных стадиях инфицирования и формирования симбиотических структур [22]. По данным литературы, экзогенный NO в виде донора оксида азота – нитропруссид натрия, отрицательно влиял на размножение клубеньковых бактерий *in vitro* и на рост бобового растения. При этом степень токсического действия NO (нитропруссид натрия) на организмы была дозозависимой [23].

Цель работы – изучение содержания эндогенного оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха в зависимости от действия на растения биотического (инокуляция корней *Rhizobium*) и абиотического (высокие дозы азотных солей) факторов, оценка влияния нитропруссид натрия, L-аргинина, ловушек NO (2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид – ФТИО, гемоглобин) и ингибиторов нитратредуктазы (вольфрамат натрия) и животной NO-синтазы (аминогуанидин гидрохлорид) на уровень оксида азота в корнях проростков гороха.

МЕТОДИКА

Объект исследований – этиолированные проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.), сорт Ямальский (селекция ЗАО “НПФ Сибирская аграрная компания”, Россия). Семена, промытые теплой водой с мылом и поверхностно стерилизованные в течение 15 мин 3%-ным раствором пероксида водорода, проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге при 22°C в течение 2 сут, считая с момента замачивания. Для исследований отбирали однородный материал. Критерием однородности служила длина корней (включая эпикотиль) 25–30 мм.

Для дальнейшего роста проростки помещали в кюветы на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой или растворами испытываемых соединений. Для ризобиальной инокуляции использовали штамм клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* – CIAM 1026, полученный из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (г. Пушкин, Россия). Инокуляцию отрезков корней (участок 10–15 мм от апекса) проводили суспензией кле-

ток ризобий в концентрации 2×10^4 кл./мкл на 200 мкл среды.

Для окрашивания срезов использовали флуоресцентный зонд 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат (ДАФ-2ДА). Это соединение проникает через клеточную мембрану и деацетилюет с помощью внутриклеточных эстераз в 4,5-диаминофлуоресцеин (ДАФ-2), который образует с NO флуоресцирующее соединение – диаминотриазолфлуоресцеин триазол (ДАФ-2Т) [24, 25]. Для получения окрашенного соединения (ДАФ-2Т) отрезки корней инкубировали с 10 мкМ ДАФ-2ДА в 10 мМ Трис-НСI (рН 7.4) в течение 30 мин при 26°C.

Из этих отрезков корней получали поперечные срезы толщиной 100–150 мкм и анализировали их на флуоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (“Karl Zeiss”, Германия) с цифровой монохромной камерой Axio Cam MRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений Axio Vision Rel.4.6 (“Karl Zeiss”, Германия) с использованием блока фильтров № 10 с длиной волны возбуждения 450–490 нм, эмиссией 515–565 нм.

Применяли реактивы: гемоглобин из эритроцитов лошади (“MP Biomedicals”, США); ДАФ-2ДА (DAF-2DA, “Calbiochem”, Германия); нитропруссид натрия (“MP Biomedicals”, США), фтио (РТИО, 2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил 3-оксид) (“Sigma”, США), аминогуанидин гидрохлорид (“Sigma”, США), L-аргинин, KNO₃ и NaNO₂ (“Реахим”, Россия).

Результаты исследований представлены в виде микрофотографий и графиков, отображающих зеленое свечение и его интенсивность в клетках, как средние арифметические из 3 независимых экспериментов, проведенных в трехкратной биологической повторности. Количество анализируемых срезов не менее 20 в каждой повторности. Достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента. Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние абиотических факторов на уровень NO в корнях проростков гороха. Влияние нитропруссид натрия (НП-Na), KNO₃ (нитрат), NaNO₂ (нитрит) и L-аргинина на уровень NO в клетках корней оценивали по интенсивности флуоресценции в тканях. Результаты опытов представлены на рис. 1–5. Следует отметить, что свечение в наших опытах наблюдалось в поверхностных – эпидермальных клетках корня (рис. 1). Это свидетельствует о локализации синтеза NO в этих клетках. У животных организмов синтез NO обнаружен в эпителиальных клетках аорты [24]. Эпидермальные клетки листьев табака содержали NO в цитозоле, плазма-

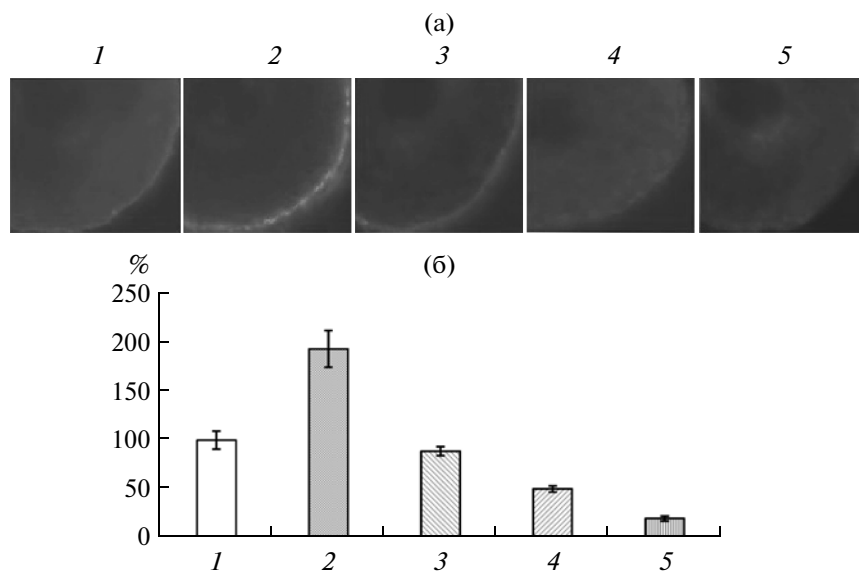


Рис. 1. Влияние НП-Na (4 мМ), гемоглобина (ГГ, 4мкМ), ризобияльной инокуляции (РИ) и ФТИО (100 мкМ) на флуоресценцию в клетках корней гороха.

а – микрофотографии, б – интенсивность, % от контроля.

1 – контроль (вода); 2 – НП-Na (24 ч); 3 – НП-Na (24 ч) + ГГ (30 мин);

4 – НП-Na (24 ч) + РИ (30 мин); 5 – НП-Na (24 ч) + ФТИО (30 мин).

тической мембране, хлоропластах, пероксисомах, ядре [26].

При экспозиции двухсуточных неинокулированных ризобиями проростках гороха на указанных веществах в течение 24 ч выявлено следующее. НП-Na (экзогенный донор NO) в концентрации 4 мМ увеличивал флуоресценцию в клетках корня почти в 2.0 раза по сравнению с контролем (вода). Увеличение уровня NO под влиянием НП-Na ингибировалось гемоглобином

(4 мкМ), ризобияльной инокуляцией и флуоресценция в этом варианте почти полностью подавлялась 100 мкМ ФТИО (рис. 1).

В варианте с KNO_3 (20 мМ) уровень NO в корне не изменялся через 24 ч по сравнению с контролем (рис. 2). Действие NaNO_2 (2 мМ) через 24 ч способствовало увеличению уровня NO в корне в 2.3 раза, т.е. было аналогично действию НП-Na (рис. 3).

В краткосрочных опытах (30 и 60 мин) влияние нитратной и нитритной солей на уровень NO но-

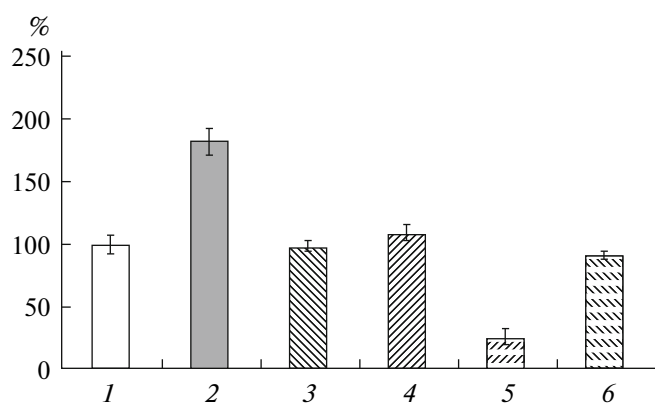


Рис. 2. Влияние нитрата калия (20 мМ), ризобияльной инокуляции (РИ), ингибитора нитратредуктазы вольфрамата натрия (150 мкМ) на интенсивность флуоресценции в клетках корней гороха (% от контроля).

1 – контроль (вода); 2 – нитрат (30 мин); 3 – нитрат (60 мин); 4 – нитрат (24 ч); 5 – нитрат + РИ (30 мин); 6 – нитрат (30 мин) + вольфраматы натрия (30 мин).

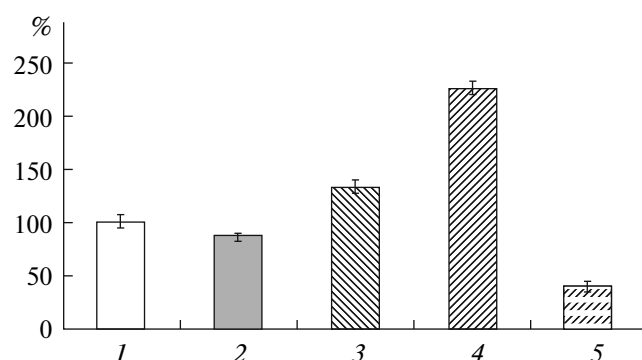


Рис. 3. Влияние нитрита натрия (2 мМ) и гемоглобина (ГГ, 4 мкМ) на интенсивность флуоресценции в клетках корней гороха (% от контроля).

1 – контроль (вода); 2 – нитрит (30 мин); 3 – нитрит (60 мин); 4 – нитрит (24 ч); 5 – нитрит (24 ч) + ГГ (30 мин).

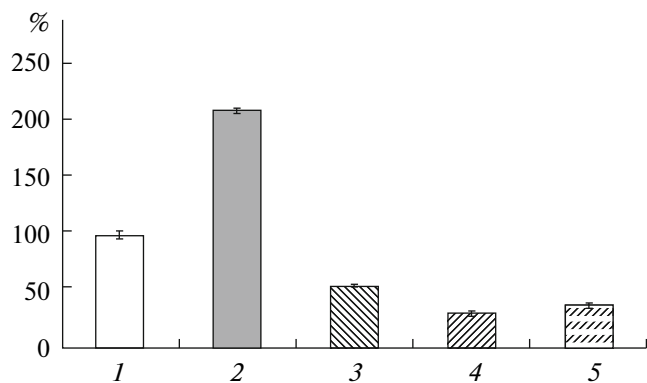


Рис. 4. Влияние аргинина (2 мМ), аминокуанидина (АГ, 1 мМ); ФТИО (100 мкМ) на интенсивность флуоресценции в клетках корней гороха (% от контроля). 1 – контроль (вода); 2 – аргинин (30 мин); 3 – аргинин (30 мин) + АГ (30 мин); 4 – аргинин (30 мин) + ФТИО (30 мин); 5 – ФТИО (30 мин).

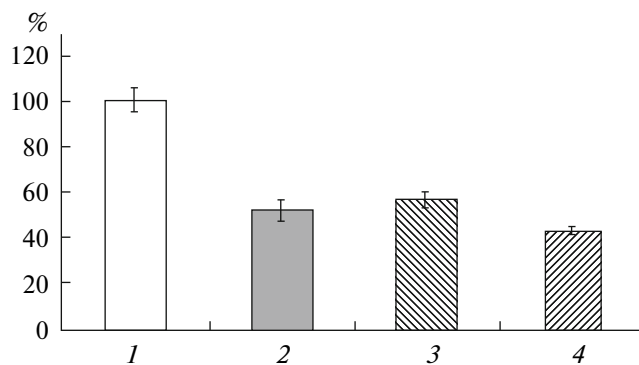


Рис. 5. Влияние гемоглобина (ГГ, 4 мкМ), ризобияльной инокуляции (РИ) и ФТИО (100 мкМ) на интенсивность флуоресценции в клетках корней гороха (% от контроля). 1 – контроль (вода); 2 – ГГ (30 мин); 3 – РИ (30 мин); 4 – ФТИО (30 мин).

сило другой характер по сравнению с экспозицией 24 ч. Так, при экспозиции 30 мин в варианте с KNO_3 (20 мМ) наблюдалось увеличение уровня NO в корне в 1.8 раза, а через 60 мин – снижение до уровня контроля (рис. 2). Противоположная картина отмечалась в варианте с NaNO_2 : через 30 мин происходило небольшое снижение уровня NO в корне по сравнению с контролем, через 60 мин – достоверное повышение (на 30%), а через 24 ч более чем двукратное увеличение NO (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о преходящем, временном характере регуляции уровня NO в корнях проростков гороха под влиянием азотных соединений. Причем эндогенный уровень NO , оцениваемый по интенсивности флуоресценции, зависел от вида экзогенного фактора. Так, если содержание эндогенного NO в корнях при воздействии на растения экзогенного НП-На определялось, очевидно, скоростью освобождения оксида азота из этого соединения в клетках, то в вариантах с нитратом и нитритом эндогенный уровень NO зависел, по-видимому, от скорости восстановления NO_3^- и NO_2^- или от их влияния на сигнальные пути, инициирующие синтез оксида азота с помощью других механизмов, например путем активации фермента, подобного NO -синтазе животных клеток.

В опытах с азотными солями (KNO_3 , NaNO_2) мы исходили из того, что минеральный азот в высоких дозах нарушает формирование и функционирование бобово-ризобияльного симбиоза. Одной из возможных причин этого может быть образование в клетках растения-хозяина NO за счет восстановления нитратов и нитритов с помощью нитрат- и нитритредуктаз [27]. Необходимо заметить, что нитратредуктаза, по-видимому, вовлекается в генерацию NO в корнях растений [28]. Об

этом свидетельствуют и наши данные о существенном уменьшении уровня NO (более чем в 2 раза) в корнях гороха под влиянием ингибитора нитратредуктазы – вольфрамата натрия (150 мкМ) (рис. 2). Но в то же время экспозиция двухсуточных проростков на 2 мМ растворе L-аргинина, являющегося субстратом животной NO -синтазы, увеличивала интенсивность флуоресценции в клетках более чем в 2 раза (рис. 4). Ингибитор животной NO -синтазы – аминокуанидин (1 мМ) снижал интенсивность свечения в этом варианте почти в 4 раза (рис. 4). Положительное действие аргинина на уровень NO не проявлялось на фоне ФТИО (рис. 4). Эти данные, очевидно, свидетельствуют о том, что этиолированные проростки гороха используют для генерации NO нитраты, нитриты и L-аргинин как субстраты ферментативных или других реакций.

Влияние ризобияльной инокуляции на уровень NO в корнях. Проростки гороха в варианте с водой (контроль), также имели свечение в клетках корня. Это говорит о том, что этиолированные проростки гороха синтезируют NO в эпидермальных клетках корня, создавая постоянное “ NO -поле”, и оксид азота является нормальным продуктом метаболизма у растений, концентрация которого, как известно, может существенно увеличиваться при стрессовых воздействиях. Синтез NO в эпидермальных клетках табака наблюдали Фойсснер с соавт. [26] и уровень NO в их опытах увеличивался при действии на растения грибного элиситора. Однако возникает вопрос о механизме генерации NO в этом случае. По нашим данным, содержание свободного аргинина в корнях двухсуточных этиолированных проростков гороха высокое: 109.2 ± 16.1 мкг/г сырого вещества ($n = 5$). Поэтому можно предположить, что синтез оксида азота в этом случае происходит за счет использо-

вания L-аргинина как субстрата в NO-синтазной реакции. Это подтверждается результатами наших опытов с применением ингибитора животной NO-синтазы – аминогуанидина, который ингибировал реакцию образования NO (рис. 5). Подобные результаты были получены и другими авторами [29].

Инокуляция отрезков корней двухсуточных проростков суспензией клубеньковых бактерий снижала интенсивность свечения в контрольном варианте (H₂O) в 1.9 раза (рис. 5). Такое же действие ризобиальной инокуляции проявилось и в вариантах с НП-Na и KNO₃, где интенсивность свечения под влиянием инокуляции уменьшилась приблизительно в 4 раза (рис. 1, 2).

Следует отметить, что ингибирование синтеза активных форм кислорода (АФК), уменьшение содержания салициловой кислоты и снижение активности НАДФН-оксидазы растения-хозяина с помощью ризобиальной инокуляции или очищенного ризобиального Nod-фактора было установлено и в других работах [30–32]. Таким образом, инокуляция проростков ризобиями частично блокирует синтез NO, а также, вероятно, и других активных метаболитов в клетках корня, что может создать благоприятные физиологические условия для формирования бобово-ризобиального симбиоза, в том числе и за счет подавления защитных систем растения-хозяина. Однако механизмы, с помощью которых ризобии модулируют обмен веществ растения-хозяина, неизвестны. Предполагается, что ризобиальный Nod-фактор (липохитоолигосахарид) взаимодействует с растительным рецептором (возможно с рецептороподобными киназами) на плазматической мембране клетки, что ведет к начальным этапам бобово-ризобиального симбиоза [33], хотя не исключается участие и других механизмов взаимодействия молекул растения и ризобий, в частности связывание растительных лектинов с бактериальными полисахаридами [34].

Взаимодействие бактериальных и растительных молекул приводит к “запуску” сигнальных систем, инициирующих экспрессию соответствующих генов растения-хозяина, осуществляющих реализацию генетически запрограммированного механизма формирования бобово-ризобиального симбиоза. Подтверждением этому служат данные опытов [35], в которых липополисахарид, выделенный из симбиотической бактерии *Mesorhizobium loti*, индуцировал генерацию NO и экспрессию гена несимбиотического гемоглобина у *Lotus japonicus*. По данным Лохар с соавт. [36], уменьшение потока АФК в корнях люцерны через 1 ч после обработки проростков Nod-фактором сопровождалось снижением накопления транскриптов гомологов НАДФН-оксидазы корней люцерны. Этот факт авторы объясняют влиянием

Nod-фактора на активность АФК-генерирующей системы, что, по-видимому, способствует на ранних стадиях бобово-ризобиального симбиоза успешному взаимодействию симбионтов.

Что касается снижения под влиянием ризобиальной инокуляции уровня NO, обладающего в зависимости от концентрации сигнальными или токсическими свойствами, то можно предположить, что это происходит благодаря уменьшению функциональной активности ферментных систем, осуществляющих синтез NO, либо путем удаления свободного NO с помощью “ловушек” (скавенджеров) свободных радикалов или других реакций.

Влияние ФТИО и гемоглобина на уровень оксида азота в клетках корня проростков гороха. ФТИО (2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид) не является биологическим соединением и его химическое действие в клетках основано на окислении NO до NO₂⁻ [37]. Применение ФТИО в исследованиях *in vitro* и *in vivo* обусловлено необходимостью доказать присутствие NO в клетках организмов и устранения биологической активности этого соединения. Как следует из наших данных, ФТИО в концентрации 100 мкМ в существенной степени уменьшает флуоресценцию эпидермальных клеток корней этиолированных проростков гороха (рис. 1, 4, 5).

Другим эффективным скавенджером NO является гемоглобин [38]. Как следует из рис. 1, гемоглобин (4 мкМ) снижал интенсивность свечения в варианте с НП-Na более чем в 2 раза. В варианте с NaNO₂ (рис. 3) уровень NO (вариант 24 ч) под влиянием гемоглобина снизился в 6 раз. Таким образом, гемоглобин вызывает эффекты, сходные с действием ризобиальной инфекции и ФТИО.

Механизм связывания NO гемоглобином состоит в его взаимодействии с гемом гемоглобина с образованием нитрозилгемоглобина [39]. Вопрос в том, какой механизм его действия в клетках растений. По данным Нагата с соавт. [35], ризобии (*Mesorhizobium loti*) индуцировали синтез NO в корнях бобового растения *Lotus japonicus* на начальных стадиях ризобиальной инфекции. Однако усиление синтеза NO носило преходящий характер и было связано с экспрессией гена несимбиотического гемоглобина (*LjHb1*) у *Lotus japonicus*. Авторы предполагают, что функция гена *LjHb1* заключается в регуляции уровня NO в клетках растения-хозяина в процессе симбиоза. Наши данные о том, что инокуляция на начальных этапах инфицирования снижала уровень NO в клетках корня, свидетельствует о возможном участии в этом процессе несимбиотического гемоглобина. Однако это предположение требует экспериментальных доказательств.

Что касается влияния экзогенного гемоглобина на уровень NO в клетках корней проростков гороха на фоне действия различных абиотических факторов, то механизм, по-видимому, тот же, что и при действии ризобияльной инокуляции. По данным литературы, трансгенные растения табака и люцерны с повышенным синтезом несимбиотического гемоглобина класса I обладали меньшей чувствительностью к нитрозативному стрессу, вызываемому в клетках действием экзогенных доноров оксида азота, по сравнению с нормальными (дикими) формами растений [38, 40]. Предполагается, что в растениях несимбиотические формы гемоглобина могут выполнять защитную роль против нитрозативного стресса и модулировать сигнальную функцию NO [41].

В наших опытах инокуляция растений ризобиями снимала активирующее влияние высокой дозы минерального азота на активность НАДФН-оксидазы — основного фермента АФК-генерирующей системы растений и животных [32]. Ингибирующее влияние ризобий на генерацию NO и АФК свидетельствует о связи механизмов синтеза этих соединений, опосредованных влиянием метаболических систем, регулирующих формирование бобово-ризобияльного симбиоза.

По данным литературы, синтез АФК в ответ на многие экзогенные “раздражители” сопровождается также синтезом NO [39, 42], и их сигнальное действие может оказывать влияние на многие процессы, например при реализации организмом “программированной клеточной смерти” [43]. Взаимодействие H_2O_2 и NO может идти по пути активации протеинкиназ, изменения концентрации внутриклеточного кальция, активности ионных каналов и др. [5, 44]. Однако полной картины взаимодействия АФК и активных форм азота (АФА), в частности H_2O_2 и NO, в клетках растений нет.

Изучение взаимодействия АФК и АФА при бобово-ризобияльном симбиозе представляет особый интерес, так как, в отличие от патогенеза, усилия растения-хозяина направлены на облегчение проникновения клубеньковых бактерий в клетки и формирования симбиоза. Однако в зависимости от вида биотических и абиотических неблагоприятных стрессовых факторов, взаимодействие сигнальных путей при формировании бобово-ризобияльного симбиоза может быть различным, что, по-видимому, и определяет успех или неуспех в формировании симбиоза. В этом ряду находится такой экзогенный фактор, как высокие дозы минерального азота, оказывающие отрицательное влияние на формирование и функционирование бобово-ризобияльного симбиоза [27]. В этой связи представляет интерес возможная активация под влиянием ризобияльной инфекции анионных каналов плазматической мембраны и, как следствие этого, усиление пото-

ка внутриклеточных нитратов, могущих влиять на активность НАДФН-оксидазы, генерацию NO и другие процессы, связанные с регуляцией физиологических функций у растений [44].

Активация под воздействием грибного элиситора (cryptogin) анионных каналов в плазматической мембране суспензионных клеток табака усиливает поток нитратов через анионные каналы в цитоплазму, что оказывает влияние на экспрессию генов защиты, генерацию АФК, модуляцию активности протеинкиназ, на сверхчувствительную реакцию клеток и их гибель при патогенезе [45]. Эти процессы блокируются ингибиторами ионных каналов. В этой связи активация под действием ризобияльной инокуляции поглощения нитратов этиолированными проростками гороха [46] свидетельствует о сходстве действия патогена и симбионта и о возможном влиянии нитратов на сигнальные пути, задействованные в бобово-ризобияльном симбиозе.

О влиянии минерального азота на взаимодействие патогенного гриба и растения свидетельствуют также результаты других исследователей [47]. По их данным, аммоний (NH_4^+), секретируемый патогенным грибом *Colletotrichum coccodes*, активирует растительную НАДФН-оксидазу, что вызывает накопление АФК и гибель клеток плодов томата. В связи с этим интересна гипотеза о возможном влиянии NO на потоки экстра- и внутриклеточного Ca^{2+} , который оказывает влияние на активность НАДФН-оксидазы. Суть этой гипотезы в том, что NO может повышать или ингибировать индуцированный действием стрессовых факторов поток Ca^{2+} в цитоплазму путем изменения проницаемости кальциевых каналов с участием сигнальных белков, подвергшихся посттрансляционной модификации оксидом азота [19]. Этот механизм регуляции потоков Ca^{2+} на плазматической мембране с участием NO может быть применен для объяснения механизмов функциональной активности НАДФН-оксидазы, в частности при симбиотических взаимодействиях организмов, когда чрезмерное накопление АФК может препятствовать установлению симбиоза между бобовым растением и клубеньковыми бактериями [30].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 4. С. 485–503.
2. Проскураков С.Я., Конопляников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. // Успехи соврем. биологии. 1999. Т. 119. № 4. С. 380–395.
3. Parani M.P., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D.W., Goldman S.I. // Plant Biotechnol. J. 2004. V. 2. № 4. P. 359–366.

4. Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В. // Журнал стресс-физиологии и биохимии. 2009. Т. 5. № 3. С. 34–52.
5. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. // Вестник Харьковск. нац. аграрн. ун-та. Серия Биология. 2009. Вып. 3 (18). С. 6–19.
6. Красиленко Ю.А., Емец А.И., Блюм Я.Б. // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 4. С. 483–494.
7. Anderson L., Mansfield T.A. // Environ. Pollution. 1979. V. 20. № 2. P. 113–121.
8. Klepper L.A. // Atmospheric Environ. 1979. V. 13. № 4. P. 537.
9. Wildt J., Kley D., Rockel A., Rockel P., Segschneider H.J. // J. Geophys. Res. 1997. V. 102. № D5. P. 5919–5927.
10. Rockel P., Strube F., Rockel A., Wild J., Kaizer W.M. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. № 366. P. 103–110.
11. Mur L.A.J., Carver T.L.W., Prats E. // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 3. P. 489–505.
12. Zumft W.G. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. № 4. P. 533–616.
13. Дубовская Л.В., Колеснева Е.В., Князев Д.М., Вологовский И.Д. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 847–855.
14. Van der Vliet A., Eiserich J.P., Kaur H., Cross C.E., Halliwell B. // Methods in Enzymology. 1996. V. 269. P. 175–184.
15. Klatt P., Lamas S. // Eur. J. Biochem., 2000. V. 267. № 16. P. 4928–4944.
16. Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Luque L., Gomez-Rodriguez M.V., Colmenero-Varea P., del Rio L.A., Barroso J.B. // FEBS Lett. 2007. V. 581. № 3. P. 453–461.
17. Grun S., Lindermayr S., Durner J. // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 3. P. 507–516.
18. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений / Ред. А.Н. Гречкин. М.: Наука, 2002. 295 с.
19. Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 21–39.
20. Flores T., Todd C.D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P.K., Corra-Aragunde N., Hoyos M.E., Brownfield D.M., Mullen R.T., Lamattina L., Polacco J.C. // Plant Physiol. 2008. V. 147. № 4. P. 1936–1948.
21. Bethke P.C., Badger M.P., Jones R.L. // Plant Cell. 2004. V. 16. № 2. P. 332–341.
22. Глянько А.К., Васильева Г.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 21–28.
23. Глянько А.К., Митанова Н.Б., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г. // Сельскохозяйств. биология. 2009. № 1. С. 83–88.
24. Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshib H., Hiratab Y., Maeda D., Imaia Y., Irimura T., Nagano T. // FEBS Lett. 1998. V. 427. № 2. P. 263–266.
25. Gould K.S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. // Plant Cell Environ. 2003. V. 26. № 11. P. 1851–1862.
26. Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C., Durner J. // Plant J. 2000. V. 23. № 6. P. 817–824.
27. Глянько А.К., Васильева Г.Г., Митанова Н.Б., Ищенко А.А. // Изв. РАН. Сер. биол. 2009. Т. 36. № 3. С. 302–312.
28. Yamasaki H., Sakihama Y. // FEBS Lett. 2000. V. 468. № 1. P. 89–92.
29. Xu J., Yin H., Li Y., Liu X. // Plant Physiol. 2010. V. 154. № 3. P. 1319–1334.
30. Shaw S.L., Long S.R. // Plant Physiol. 2003. V. 132. № 4. P. 2196–2204.
31. Глянько А.К., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г., Миронова Н.В. // Изв. РАН. Сер. биол. 2005. Т. 32. № 3. С. 300–305.
32. Глянько А.К., Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Миронова Н.В., Алексеенко А.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 4. С. 479–485.
33. Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T., Geurts R. // Science. 2003. V. 302. № 5645. P. 630–633.
34. Downie J.A. // FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. № 2. P. 150–170.
35. Nagata M., Hashimoto M., Murakami E., Shimoda Y., Shimoda-Sasakura F., Kucho K., Suzuki A., Abe M., Higashi S., Uchiumi T. // Plant Signal. Behavior. 2009. V. 4. № 3. P. 202–204.
36. Lohar D.P., Haridas S., Gantt J.S., Vandenbosch K.A. // New Phytol. 2007. V. 173. № 1. P. 39–49.
37. Maeda H., Akaike T., Yoshida M., Suga M. // J. Leukocyte Biol. 1994. V. 56. № 5. P. 588–592.
38. Dordas C., Rivoal J., Hill R.D. // Ann. Bot. 2003. V. 91. № 2. P. 173–178.
39. Neill S.J., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Wilson I. // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. № 1. P. 25–35.
40. Seregelyes C., Igamberdiev A.U., Maassen A., Maassen A., Hennig J., Dudits D., Hill R.D. // FEBS Lett. 2004. V. 571. № 1. P. 61–66.
41. Perazzolli M., Romero-Puertas M.C., Delledonne M. // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 3. P. 479–488.
42. Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. № 372. P. 1237–1242.
43. Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 23. P. 13454–13459.
44. Elmayan T., Simon-Plas F. // Plant Signal. Behavior. 2007. V. 2. № 6. P. 505–507.
45. Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J.M., Barbier-Brygoo H., Pugin A. // Plant Cell. 2002. V. 14. № 8. P. 1937–1951.
46. Митанова Н.Б., Миронова Н.В., Глянько А.К. // Агробиохимия. 2006. № 1. С. 32–33.
47. Alkan N., Davydov O., Sagi M., Fluhr R., Prusky D. // Mol. Plant-Microbe Interact. 2009. V. 22. № 12. P. 1484–1491.

Influence of Environmental Factors on the Generation of Nitric Oxide in the Roots of Etiolated Pea Seedlings

A. K. Glyan'ko, N. B. Mitanova, and A. V. Stepanov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 644033 Russia

e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Received January 12, 2011

Abstract—The article studies the nitric oxide (NO) levels in the roots of etiolated seedlings of garden peas (*Pisum sativum* L.) using the DAF-2DA fluorescent probe and fluorescent microscopy. Cross sections of roots of 100–150 μm (the site of a root which is 10–15 mm from the apex) are analyzed. It is shown that the level of NO in the roots after 24 h increased by more than a factor of 2 in the versions with NaNO_2 and sodium nitroprusside. At feeding the seedlings with KNO_3 , a peak in the accumulation of NO in the roots (twofold increase) was observed after 30 min. Fertilizing seedlings with L-arginine (2 mM) increased the intensity of the fluorescence of the root sections by more than a factor of 2. The inoculation of seedlings of rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) contributed to the reduction of NO on the background of the control (H_2O) and sodium nitroprusside and nitrogen compounds. Scavengers of NO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (PTIO), hemoglobin) and inhibitors of nitrate reductase and animal NO synthase (sodium tungstate and aminoguanidine hydrochloride) reduced the level of NO in the roots. The results are discussed in relation to the role of NO in plants under the influence of biotic and abiotic factors.

УДК 581.1

УЧАСТИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ОКСИДА АЗОТА В ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЯХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

© 2012 г. И. Р. Гильванова, А. Р. Еникеев, С. Ю. Степанов, З. Ф. Рахманкулова

Башкирский государственный университет, биологический факультет, Уфа, 450074

Тел.: (3472)272-67-12

e-mail: Zulfirar@mail.ru

Поступила в редакцию 11.01.2011 г.

Изучено влияние салициловой кислоты (СК) и оксида азота (NO) на растения пшеницы *Triticum aestivum* L., подвергнутых воздействию повышенной концентрации соединений меди и цинка. Показано, что тяжелые металлы (ТМ) вызывали снижение ростовых параметров в надземных и подземных частях растений, способствовали резкому ухудшению энергетического баланса и возникновению состояния окислительного стресса. СК и NO оказывали защитный эффект, который выражался в повышении способности к накоплению массы побега и корня растений, стабилизации энергетического баланса и уменьшении перекисного окисления липидов. Выявлено сходство в защитных реакциях растений пшеницы при действии СК и NO, которое проявилось в аналогичном изменении энергетического ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$) и альтернативное дыхание) и антиоксидантного (МДА) баланса исследуемых растений. Это сходство, возможно, свидетельствует об общем сигнальном пути для СК и NO при действии токсических концентраций ТМ.

В последнее время активно изучается действие салициловой кислоты (СК) и оксида азота (NO) на физиологические процессы в растениях. Установлено, что СК и NO – сигнальные молекулы широко распространены в растениях и принимают участие в процессах дыхания, движении устьиц, прорастании семян, росте корня и листьев, созревании плодов, старении. Кроме того, они являются посредниками в сигнальной трансдукции при ответе на биотический и абиотический стресс [1–4]. В случае защитной реакции от патогенов показано их кооперативное действие [2]. Также NO и СК совместно участвуют в регуляции образования этилена при реакции сверхчувствительности [5], движении устьиц [3]. Однако механизмы их взаимодействия в настоящее время не совсем ясны. Известно, что СК активирует синтез NO [6], является посредником между оксидом азота и геномом в NO-синтазной системе растений [7]. В свою очередь, NO вызывает многократное накопление салицилата [8].

Однако есть данные о том, что СК может быть антагонистом NO-сигнального пути [2], ингибитором активности и транскрипции NO-синтазы [9]. В растениях СК, подавляя дыхание и, таким образом, вызывая оксидативный стресс, может активировать NO-нечувствительную альтернативную оксидазу [10].

В клетках растений источником NO являются митохондрии, где одним из процессов его образования является восстановление нитрита цитохромоксидазой (ЦО) и альтернативной оксидазой (АО) [11].

В настоящее время приобретает все большую актуальность изучение последствий загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ). В условиях избытка солей ТМ в растениях возникает состояние окислительного стресса, сопровождающееся образованием активных форм кислорода (АФК) и перекисным окислением липидов (ПОЛ). Установлено, что NO может функционировать как антиоксидант, связывающий АФК, такой, как супероксид-анион радикал, тем самым снижая повреждение клеток [11, 12].

При стрессах разной природы возникает серьезный дисбаланс между процессами образования и ликвидации АФК [13]. Одним из способов «защиты» растений в состоянии окислительного стресса является активация альтернативной оксидазы. В качестве одной из универсальных физиологических функций АО может рассматриваться защита от повреждающего действия АФК

Сокращения: СК – салициловая кислота; ТМ – тяжелые металлы; NO – оксид азота; $\Phi_{\text{ист}}$ – истинный фотосинтез; $D_{\text{сум}}$ – суммарное темновое дыхание; ЦО – цитохромоксидаза; АО – альтернативная оксидаза; АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; H_2O_2 – пероксид водорода; СПУ – системная приобретенная устойчивость; МДА – малоновый диальдегид; НП-Na – нитропруссид натрия; СКГ – салицилгидроксамовая кислота; $\Delta W_{\text{сух}}$ – показатель изменения сухой массы растений пшеницы; $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ – доля дыхательных затрат от истинного фотосинтеза.

(H_2O_2 и $\cdot\text{O}_2$). Так, трансгенные растения табака с низкой экспрессией АО при действии стрессоров накапливали в клетках пероксид водорода и погибали. И, наоборот, гиперэкспрессия альтернативной оксидазы приводила к повышению устойчивости к действию стрессовых факторов и снижению уровня пероксида [14].

В ряде работ приводятся свидетельства протекторной роли салицилата при действии на растения некоторых форм абиотического стресса, в том числе тяжелых металлов [15]. В зависимости от концентрации H_2O_2 в среде СК может вызывать активацию антиоксидантных ферментов, таких, как каталаза [16] и пероксидаза [17], что позволяет говорить о наличии у СК свойства антиоксиданта, которое она, очевидно, реализует при избыточном возрастании уровня АФК. Также следует заметить, что салициловая кислота активирует фермент цианидрезистентного пути – альтернативную оксидазу (АО), которая препятствует накоплению АФК [18].

Таким образом, СК рассматривается в качестве индуктора системной приобретенной устойчивости (СПУ), стимулятора роста растений и модулятора про- и антиоксидантной системы.

В связи с этим изучение участия СК и NO в защитных реакциях растений при воздействии стрессовых факторов, в частности избытка ТМ, представляет большой интерес.

Цель работы – исследование и сравнительный анализ влияния салициловой кислоты и оксида азота на растения пшеницы, подвергнутые воздействию повышенной концентрации соединений тяжелых металлов (медь и цинк).

МЕТОДИКА

Объектом исследования были растения пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Казахстанская 10). Для изучения влияния 0.05 мМ раствора салициловой кислоты применяли предпосевную обработку семян в течение 3 ч. На 4 сут (с момента замачивания семян) в сосудах с растениями, предобработанными салициловой кислотой (опыт) и не подвергавшимися обработке препаратом (контроль), воду заменяли раствором Хогланда–Арнона (0.5 н.) [19]. Для изучения влияния NO в кюветы с растениями (часть растений из контрольного варианта), добавляли 0.5 мМ нитропруссид натрия (НП-Na), который служил источником оксида азота. Растения выращивали при освещении люминесцентными лампами ЛД-20 и лампами накаливания (“УЛЗ”, Россия), освещенность 120 Вт/м², светопериод 16 ч, средняя температура воздуха 24 ± 2°С.

Часть растений, обработанных (СК и NO) и необработанных, подвергалась воздействию повышенной концентрации солей меди и цинка.

Для создания условий высокого содержания меди использовали раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05 мМ), а для создания высокого содержания цинка – раствор $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 мМ).

В ходе опытов регистрировали изменение сырой и сухой массы (ΔW). Интенсивность суммарного дыхания ($D_{\text{сум}}$) определяли манометрическим методом на аппарате Варбурга и выражали в мкл $\text{O}_2/\text{сут}$ на растение [20]. Истинный фотосинтез ($\Phi_{\text{нет}}$) рассчитывали, как сумму: $\Delta W_{\text{сух.}} + D_{\text{сум}}$ [19].

Ингибиторный анализ проводили на 8–14-суточных растениях. Для подавления работы цитохромоксидазного пути дыхания использовали NaN_3 (2 мМ, pH 4.5). Ингибирование АО проводили с помощью салицилгидроксамовой кислоты (СГК, 15 мМ, pH 4.5). Растворы ингибиторов готовили в фосфатном буфере [21].

Содержание продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [22].

Измерения проводили в 4-кратной биологической и 3-6-кратной аналитической повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Присутствие избыточных концентраций ТМ в окружающей среде приводит к различным нарушениям метаболизма растений и, в конечном итоге, отражается на их ростовых характеристиках [23].

В наших экспериментах мы обнаружили, что использованные растворы $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05 мМ) и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 мМ) приводят к угнетению роста растений. Так, сухая масса побегов и корней растений, выращенных в присутствии избыточного содержания ионов меди и цинка, снижалась, причем на меди это снижение было более существенным (рис. 1а, 1б).

Предпосевная обработка семян СК благотворно сказалась на накоплении сухой массы корней и побегов растений, выращенных при высоких концентрациях ТМ. Сухая масса корней и побегов возросла на 20.6 и 22.4% соответственно относительно растений, не подвергавшихся обработке СК, но выращенных на избытке ионов меди. Аналогичный эффект СК наблюдали и в случае обработки растений избыточным содержанием ионов цинка. Отмечено увеличение сухой массы корней и побегов на 11 и 9% соответственно относительно растений, не подвергавшихся обработке СК, но выращенных на избытке цинка (рис. 1а, 1б).

Таким образом, СК оказывает протекторное действие на растения пшеницы. Об этом свидетельствует наблюдаемая тенденция к повышению значений морфометрических показателей у растений, выращенных при избытке ТМ и предобработанных СК, по сравнению с растениями, кото-

рые были подвергнуты воздействию ТМ, но не были обработаны салициловой кислотой, что согласуется с данными литературы [15].

На рис. 1в, 1г представлены данные о влиянии оксида азота (источником NO служил нитропруссид натрия (НП-На) (0.5 мМ)) на изменение сухой массы растений пшеницы, выращенных в условиях негативного действия ТМ. Совместное воздействие меди и НП-На приводило к увеличению сухой массы исследуемых растений (побегов – на 36, корней – на 18%). Защитный эффект NO проявлялся также и при воздействии ионов Zn. Совместное действие цинка и НП-На приводило к увеличению сухой массы исследуемых растений (побегов – на 8.5, корней – на 24%) (рис. 1). Полученные нами результаты свидетельствуют о защитной роли NO при ответе растений на воздействие ТМ, что согласуется с данными других авторов, изучавших воздействие различных абиотических стрессоров [1].

Стимулирование ростовых процессов непосредственно связано с изменениями интенсивности фотосинтеза и дыхания. В ходе проведенных экспериментов мы исследовали влияние ТМ на энергетический баланс растения. Для этого были измерены интенсивность фотосинтеза и суммарного темнового дыхания. Полученные данные были использованы для расчета доли дыхательных затрат от истинного фотосинтеза ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$). Данный параметр является показателем физиологического состояния, сбалансированности основных физиологических процессов – фотосинтеза, дыхания, транспорта ассимилятов, роста и т.д. в растениях [24]. Показано, что при выращивании растения в оптимальных условиях данное соотношение достаточно консервативно и видонеспецифично [25]. Известно, что даже небольшое отклонение от стационарных условий выращивания влечет за собой изменение $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$, как правило, в сторону увеличения соотношения, в результате возникновения дополнительных дыхательных затрат на адаптацию растений, возрастания диссипационных процессов или снижения истинного фотосинтеза [24, 25]. В наших экспериментах под влиянием токсических концентраций ТМ мы наблюдали резкое ухудшение энергетического баланса исследуемых растений, которое выражалось в возрастании доли дыхательных затрат от истинного фотосинтеза ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$), на меди в среднем в 2.1 раза и на цинке – в 1.92 раза. Обработка СК и NO приводила к сходной ($r = 0.95$ при $p \leq 0.05$) стабилизации энергетического баланса за счет уменьшения соотношения $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ в среднем в 1.2 раза (рис. 2, таблица).

С чем связаны дополнительные энергетические затраты при воздействии ТМ? Чтобы ответить на этот вопрос мы исследовали с помощью

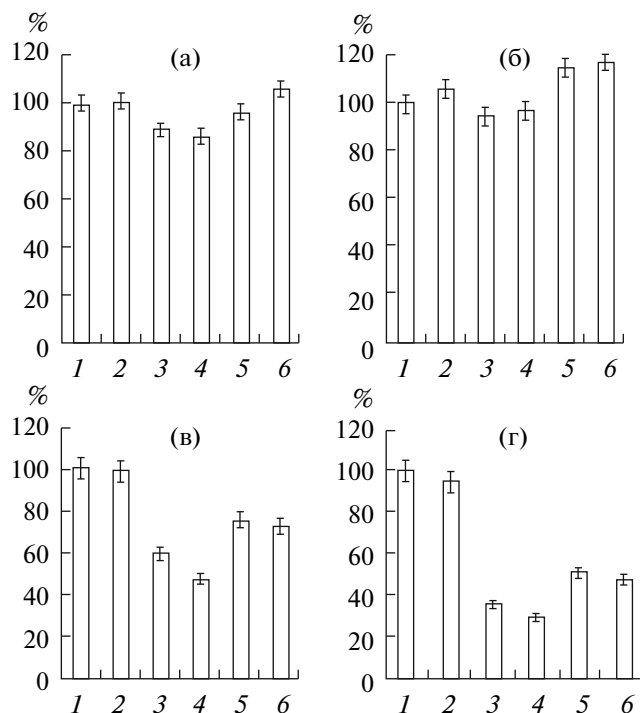


Рис. 1. Влияние СК (а, б) и оксида азота (NO) (в, г) на сухую массу (% от контроля) побегов (а, в) и корней (б, г) растений пшеницы при действии Cu и Zn. 1 – контроль; 2 – СК (а, б), НП-На (в, г); 3 – Zn; 4 – Cu; 5 – Zn + СК (а, б), Zn + НП-На (в, г); 6 – Cu + СК (а, б), Cu + НП-На (в, г).

ингибиторного анализа изменения в соотношении отдельных путей темнового дыхания: цитохромного, цианидрезистентного и остаточного, что, в свою очередь, позволяет косвенно судить об энергетической эффективности дыхания у обработанных и необработанных растений. Установили, что под воздействием высоких концентраций ТМ существенно возрастали (особенно в корнях) менее эффективные дыхательные затраты, связанные с альтернативным цианидрезистентным путем дыхания. Обработка СК и NO приводила к сходному эффекту – значительному снижению альтернативного дыхания в побегах и корнях растений пшеницы, в среднем на 33.1 и 33.7% соответственно. Исключение составляют побеги растений, выращенные на избытке цинка. В данном случае воздействие указанных соединений приводило к сходному (обработка СК и NO) повышению альтернативного дыхания в 2.1 раза (рис. 3, таблица). Таким образом, если в гетеротрофных тканях (корни) защитный эффект СК и NO проявлялся однотипно и на меди, и на цинке, то в автотрофных тканях (побеги) имели место принципиальные отличия – на меди происходило снижение, на цинке – возрастание альтерна-

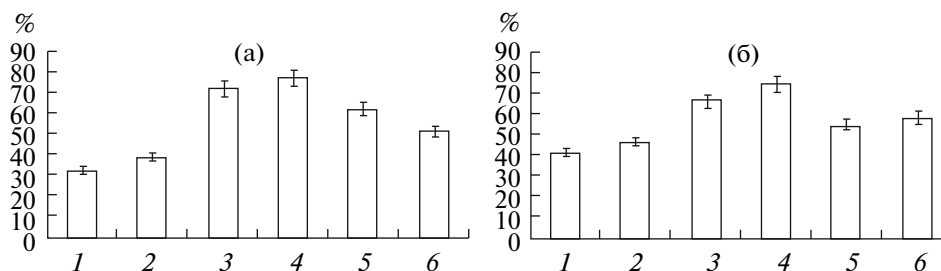


Рис. 2. Влияние СК (а) и оксида азота (NO) (б) на соотношения суммарного дыхания и истинного фотосинтеза у растений пшеницы при действии Cu и Zn.

1 – контроль; 2 – СК (а), НП-Na (б); 3 – Zn; 4 – Cu; 5 – Zn + СК (а), Zn + НП-Na (б); 6 – Cu + СК (а), Cu + НП-Na (б).

тивного дыхания. Можно предположить, что в данном случае мы имеем дело с разной стратегией в защитных механизмах. В варианте с медью главной целью снижения альтернативного пути в побегах было поддержание энергетического баланса, что приводило к существенному уменьшению соотношения $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ (таблица). В свою очередь, возрастание альтернативных путей дыхания в побегах растений, выращенных на соли цинка, сопровождалось заметным снижением уровня МДА (рис. 4), т.е. функционирование АО способствовало рассеиванию не востребованной энергии и проявляло антиоксидантную функцию [18].

Известно, что ТМ являются мощным индуктором окислительного стресса [26] и образования относительно стабильного продукта перекисного окисления липидов в клетке – малонового диальдегида. Во всех вариантах наших экспериментов в присутствии токсичных концентраций меди и цинка уровень МДА повышался, что связано с возникновением состояния окислительного стресса (рис. 4). СК и NO снижали уровень МДА, способствуя, тем самым, улучшению антиоксидантного баланса в клетках исследуемых растений и уменьшению в них процессов перекисного окисления липидов (таблица).

Сравнительная характеристика защитных реакций салициловой кислоты (СК) и оксида азота (NO) при воздействии избытка меди (Cu) и цинка (Zn)

Параметр	Вариант опыта						
		Cu/СК	Cu/NO	Наблюдаемый физиологический эффект	Zn/СК	Zn/NO	Наблюдаемый физиологический эффект
$D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$		↓ на 31.8%	↓ на 20.6%	Нормализация энергетического баланса	↓ на 12.4%	↓ на 17%	Нормализация энергетического баланса
$\Phi_{\text{ист}}$		не изменяется	↑ на 32.5%	Повышение интенсивности фотосинтеза	↑ на 21%	↑ на 13%	Повышение интенсивности фотосинтеза
АО	побеги	↓ на 33.3%	↓ на 33%	Понижение доли менее энергетически выгодного альтернативного пути дыхания	↑ в 2.75 раза	↑ в 2 раза	Повышение доли менее энергетически выгодного альтернативного пути дыхания
	корни	↓ на 26.3%	↓ на 45.5%		↓ на 30%	↓ на 33%	
МДА	побеги	↓ на 20.2%	↓ на 12%	Улучшение антиоксидантного баланса растений	↓ в 2.1 раза	↓ на 20.5%	Улучшение антиоксидантного баланса растений
	корни	↓ на 37.5%	↓ на 29%		↓ на 4.3%	↓ на 23.7%	

Примечание: ↓ – понижение; ↑ – повышение.

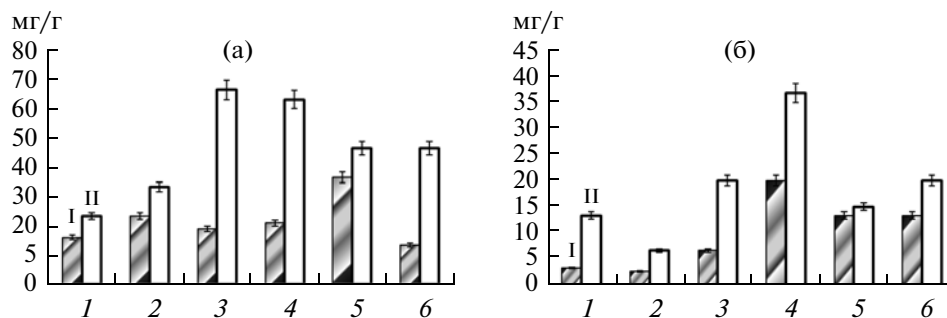


Рис. 3. Влияние СК (а) и оксида азота (NO) (б) на альтернативное цианидрезистентное дыхание (O_2 мг/г сырой массы) побегов (I) и корней (II) растений пшеницы при действии Cu и Zn.

1 – контроль; 2 – СК (а), НП-Na (б); 3 – Zn; 4 – Cu; 5 – Zn + СК (а), Zn + НП-Na (б); 6 – Cu + СК (а), Cu + НП-Na (б).

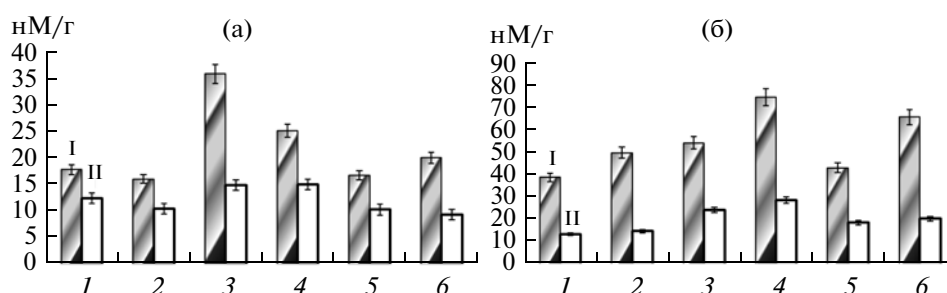


Рис. 4. Влияние СК (а) и оксида азота (NO) (б) на содержание малонового диальдегида (МДА, нМ/г сырой массы) в побегах (I) и корнях (II) растений пшеницы при действии Cu и Zn.

1 – контроль; 2 – СК (а), НП-Na (б); 3 – Zn; 4 – Cu; 5 – Zn + СК (а), Zn + НП-Na (б); 6 – Cu + СК (а), Cu + НП-Na (б).

Установлено, что характер изменения МДА в побегах и корнях растений при воздействии ТМ и в результате защитного действия как СК, так и NO, подобен изменениям $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ ($r = 0.73$ при $p \leq 0.05$). Вероятно, это связано, с одной стороны, с тем, что $D_{\text{сум}}$ и $\Phi_{\text{ист}}$ являются основными продуцентами АФК [11], а при стрессовом нарушении энергетического баланса процесс образования активных свободных радикалов усиливается, и, с другой – возрастание $D_{\text{сум}}$ в целом растении при воздействии ТМ связано с рассеиванием невосстановленной энергии, сопровождающейся образованием АФК. Отсюда следует, что соотношение $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ (энергетический баланс) косвенно характеризует состояние про- и антиоксидантного баланса.

Итак, выявлено сходство в защитных реакциях растений пшеницы при действии СК и NO, которое проявилось в аналогичном изменении энергетического баланса ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$) ($r = 0.95$ при $p \leq 0.05$), альтернативного дыхания, особенно в корнях ($r = 0.7$ при $p \leq 0.05$) и антиоксидантного баланса (снижение уровня МДА) ($r = 0.6$ при $p \leq 0.05$) исследуемых растений. Это сходство, возможно, свидетельствует об общем сигнальном

пути для СК и NO при действии токсических концентраций данных ТМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Magalhaes J.R., Pedrosa M.C., Durzan D.J. // *Physiol. Plant Mol. Biol.* V. 5. 1999. P. 115–125.
2. Klessing D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J.M., Shan J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 97. № 16. P. 8849–8855.
3. Liu X., Zhang S., Lou C. // *Chinese Sci. Bull.* 2003. V. 48. № 5. P. 449–452.
4. Janda T., Horvath E., Szalai G., Paldi E. // *Salicylic Acid – a Plant Hormone* / Eds. S. Hayat, A. Ahmad. Dordrecht: Springer, 2007. P. 91–150.
5. Mur L.A.J., Laarhoven L.J.J., Harren F.J.M., Hall M.A., Smith A.R. // *Plant Physiology Preview.* 2008. V. 148. № 3. P. 1537–1546.
6. Zottini M., Costa A., Michele R., Ruzzene M., Carimi F., Schiavo F. // *J. Exp. Botany.* 2007. V. 58. № 6. P. 1397–1405.
7. Kumar D., Klessing D.F. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2000. V. 13. № 3. P. 347–351.
8. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.

9. *Farivar R.S., Brecher P.* // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 49. P. 31585–31592.
10. *Millar A.H., Day D.A.* // Trends Plant Sci. 1997. V. 2. № 8. P. 289–290.
11. *Полесская О.Г.* Растительная клетка и активные формы кислорода: учебное пособие. М.: КДУ, 2007. 140 с.
12. *Delledone M., Zeier J., Marocco A., Lamb C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 23. P. 13454–13459.
13. *Foyer C.H., Noctor G.* // Plant Cell. 2005. V. 17. № 7. P. 1866–1875.
14. *Robson C.A., Vanlerberghe G.C.* // Plant Physiol. 2002. V. 129. № 4. P. 1908–1920.
15. *Mishra A., Choudhuri M.A.* // Biol. Plant. 1999. V. 42. № 3. P. 409–415.
16. *Chen Z., Silva H., Klessig D.F.* // Science. 1993. V. 262. № 12. P. 1883–1886.
17. *Janda T., Szalai G., Tari I.* // Planta. 1999. V. 208. № 2. P. 175–180.
18. *Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 14. P. 8271–8276.
19. *Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М.* Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наукова думка, 1973. 595 с.
20. *Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М.* // Большой практикум по физиологии растений / Ред. Б.А. Рубин. М.: Высшая школа, 1975. С. 251.
21. *Головки Т.К.* // Ботан. журн. 1983. Т. 68. № 6. С. 779–788.
22. *Health R.L., Packer L.* // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. № 1. P. 189–198.
23. *Демидчик В.В., Соколик А.И., Юрин В.М.* // Усп. соврем. биол. 2001. Т. 121. № 5. С. 511–525.
24. *Рахманкулова З.Ф.* // Ж. общ. биол. 2002. Т. 63. № 3. С. 239–248.
25. *Hurry V., Igamberdiev A.U., Keerberg J., Parnik T., Atkin O., Zaragoza-Castells J., Gardstrom P.* // Plant Respiration / Eds. H. Lambers, M. Ribas-Carbo. Berlin: Springer-Verlag, 2005. P. 43–61.
26. *Foyer C.H., Noctor G.* // Antioxidants and Redox Signaling / Eds. B. Buchanan, K.-J. Dietz, T. Pfannschmidt. 2009. V. 11. № 4. P. 851–890.

Involvement of Salicylic Acid and Nitric Oxide in Protective Reactions of Wheat under the Influence of Heavy Metals

I. R. Gil'vanova, A. R. Enikeev, S. Yu. Stepanov, and Z. F. Rakhmankulova

Department of Biology, Bashkir State University, Ufa, 450074 Russia

Tel: (3472) 272-67-12

e-mail: Zulfirar@mail.ru

Received January 11, 2011

Abstract—This article studies the effect of salicylic acid (SA) and nitric oxide (NO) on *Triticum aestivum* L. wheat plants exposed to the influence of high concentrations of copper and zinc compounds. It is shown that heavy metals (HMs) caused a decrease in the growth parameters in the overground and underground plant parts and contributed to a sharp deterioration in the energy balance and the situation regarding oxidative stress. SA and NO exerted a protective effect, which was expressed in the increased ability to accumulate shoot and root mass, stabilize the energy balance, and reduced lipid peroxidation.

УДК. 632.651+632.938+581.2:577.115.3

ЭЛИСИТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА И АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ: СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЕ

© 2012 г. Н. И. Васюкова, Н. Г. Герасимова, Г. И. Чаленко, О. Л. Озерецковская

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

e-mail: vasyukova@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 19.04.2011 г.

Элиситоры, хитозан и арахидоновая кислота, индуцировали однотипные защитные ответы у клубней картофеля, стимулируя процессы раневой репарации, а также вызывая образование фитоалексинов, ингибиторов протеиназ и активных форм кислорода. Однако хитозан индуцировал защитный потенциал растительных тканей в концентрациях на порядок больших, чем арахидоновая кислота. Защитное действие хитозана определялось двумя параметрами: способностью индуцировать иммунные ответы в тканях растений и оказывать токсическое действие на развитие патогенов, вызывающих фитофтороз и фузариоз, тогда как элиситорный эффект арахидоновой кислоты зависел только от ее способности вызывать защитный потенциал в растительных тканях.

Метаболиты фитопатогенов, вызывающие устойчивость растений к болезням, ранее назывались индукторами [1], однако широкое использование этого термина привело к необходимости заменить название индукторы термином элиситоры (от английского слова “to elicit” – вызывать, выявлять) [2].

В настоящее время под термином “элиситоры” имеются в виду метаболиты фитопатогенов, индуцирующие у растений комплекс защитных ответов. К числу элиситоров принадлежат многие соединения (белки, гликопротеиды, олигосахариды, жирные кислоты), в том числе хитозан и арахидоновая кислота (АК), которые и являются предметом исследования настоящей работы.

Хитозан присутствует в клеточных стенках многих грибов, в том числе патогенных. По строению этот элиситор является β -1,4-связанным полимером глюкозамина. В последнее время его называют веществом XXI века, поскольку сейчас трудно определить какую-либо сферу человеческой деятельности, где бы ни применялся хитозан либо его производные [3]. Особое значение принадлежит хитозану в сельскохозяйственном производстве, где он является альтернативой токсическим пестицидам, нарушающим экологическое равновесие в биосфере. Важную роль выполняет хитозан в оздоровлении сельскохозяйственных земель, поскольку этот глюкозаминовый полимер стимулирует развитие почвенных грибов и актиномицетов, являющихся антагонистами фитопатогенных грибов. Под воздействием хитозана повышается урожай, улучшается его качество, повышается устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам. Этот полимер

природного происхождения не накапливается в почве, тканях растений, животных и человека, легко деградирует в природной среде. Ранее проведенные исследования позволили установить, что наибольшей элиситорной активностью обладал хитозан с мол. массой 5 кДа и степенью дезацетилирования 85% [4].

Другой элиситор, АК – полиеновая жирная кислота С-20 ряда, широко распространен в животном мире, тогда как в растениях его наличие ограничено. Так, АК отсутствует в тканях высших наземных растений, но обнаруживается в составе липидов мхов, папоротников и водорослей, а также некоторых грибов [5]. Среди последних особый интерес представляют оомицеты, к которым относятся фитопатогены родов *Phytophthora* и *Pythium*, содержащие более 15% АК и эйкозапентаеновой кислоты от суммы липидов мицелия. Эти полиеновые кислоты обнаружены как в составе всех кислотных липидов, так и в неомыляемых липидах возбудителя фитофтороза [6, 7]. Показано, что до 90% экзогенно добавленной к клубням картофеля С¹⁴-меченой АК уже в течение 2 ч обнаруживается в составе фосфолипидов картофеля [8], вытесняя свойственные растениям линоленовую, линолевую и олеиновую кислоты. Поскольку АК для растений является чужеродным соединением, то возможно, что ее включение в состав фосфолипидов может вызывать в картофеле активирование новых сигнальных систем, результатом чего является репрограммирование защитных ответов.

Возникает вопрос, однотипны ли защитные ответы, вызываемые в растениях столь различными по строению и происхождению элиситорами, как хитозан и АК? В связи с этим цель работы –

исследовать насколько сходны защитные реакции, индуцируемые обоими элиситорами, а также в определении, не является ли защитный эффект хитозана и АК результатом полного или частичного ингибирования ими роста и развития фитопатогена.

Из множества защитных ответов, которые могут быть индуцированы элиситорами, предметом настоящего исследования явились способность хитозана и АК:

- репарировать механически пораненные ткани растений;
- вызывать образование индуцированных антибиотиков – фитоалексинов;
- индуцировать накопление ингибиторов протеиназ;
- стимулировать генерацию активных форм кислорода.

МЕТОДИКА

В работе использовали клубни картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта “Юбилей Жукова” и расу 1.3 оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Vuq, совместимую с данным сортом.

В качестве элиситоров применяли арахидоновую кислоту (АК) (“Sigma” США), а также водорастворимый хитозан с мол. массой 5 кДа и степенью дезацетилирования 85%, любезно предоставленный нам профессором В.П. Варламовым (Центр “Биоинженерия” РАН). Суспензию АК готовили в стерильной воде путем интенсивного встряхивания на приборе “Миксер ВП” (Россия).

Испытание способности АК и хитозана индуцировать фитоптороустойчивость (элиситорная активность) и стимулировать интенсивность процесса раневой репарации (репарационная активность) исследовали на дисках, вырезанных из клубней картофеля. Верхнюю поверхность дисков обрабатывали АК или хитозаном, взятыми в различных концентрациях.

Элиситорная активность. Поверхность дисков через 2 ч после обработки элиситорами инфицировали суспензией зооспор расы 1.3 *P. infestans* плотностью 10^4 зооспор/мл. Диски помещали в кристаллизаторы, внутренние стенки которых выстилали фильтровальной бумагой, смоченной водой. Влажность контролировали на протяжении проведения опыта. Степень инфицирования дисков картофеля возбудителем фитоптороза оценивали микроскопически через 72 ч, подсчитывая число слоев клеток, в которые проникли гифы патогена.

Репарационная активность. Залечивание механических поранений определяли на поверхности

дисков, обработанных АК и хитозаном, взятых в различных концентрациях (без инфицирования патогеном) и помещенных в условия, способствующие образованию раневой перидермы. О скорости процесса репарации судили по образованию вторичной меристемы (пробкового камбия) – феллогена на 3 сут после поранения, тогда как интенсивность образования раневой перидермы в тот же срок оценивали по числу ее клеточных рядов.

Ингибиторы протеиназ (ИП). На поверхности срезов клубней картофеля вырезали лунки, в которые помещали растворы испытуемых элиситоров. Через 48 ч диффузаты собирали и анализировали на содержание ИП, которое определяли по степени подавления протеолитической активности химотрипсина, используя в качестве субстрата 1%-ный раствор казеина. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, в условиях эксперимента, приводящее к увеличению величины D_{280} на 1 единицу в течение 1 мин. За единицу ингибиторной активности принимали содержание ИП, которое подавляло 1 ед. ферментативной активности.

Ришитин. Фитоалексин (ФА) картофеля, ришитин, определяли в диффузатах клубней. Для этого на поверхности ломтика клубня вырезали лунки, которые промывали проточной водой, подсушивали, а затем в них вносили растворы элиситоров. Через 48 ч диффузаты из лунок собирали, центрифугировали при 1000 g в течение 20 мин и далее пятикратно экстрагировали равным объемом н-гексана. Гексановый слой отделяли и лиофильно высушивали. К сухому остатку добавляли концентрированную серную кислоту (1 : 3) и определяли интенсивность развивающейся окраски на спектрофотометре при 530 нм. Результаты пересчитывали по калибровочной кривой, построенной по чистому ришитину, и выражали в мкг на 1 мл диффузата [9].

Активность каталазы. На торцевую поверхность дисков клубней картофеля наносили по 50 мкл раствора элиситора или воды (в контрольных вариантах). Диски инкубировали во влажных камерах в течение 2, 15 и 24 ч. Верхний слой ткани диска толщиной 1 мм отбрасывали. Из следующего слоя (1–2 мм) готовили ацетоновые препараты, которые экстрагировали 70 мМ К-Na-фосфатным буфером (рН 7.0) или 20 мМ ТЭА-буфером (рН 7.4), содержащим 1 мМ ЭДТА и 5 мМ аскорбат натрия, а затем центрифугировали при 17000 g в течение 10 мин. В супернатанте определяли активность каталазы по падению оптической плотности пероксида водорода на спектрофотометре при 240 нм в течение 5 мин после начала реакции при 37°C [10]. Удельную активность каталазы выражали в мкмоль H_2O_2 мг⁻¹ белка мин⁻¹

Таблица 1. Элиситорная активность хитозана в дисках клубней картофеля, инфицированных *P. infestans*

Вариант	Концентрация хитозана, г/мл	Глубина проникновения гиф <i>P. infestans</i> , слои, $M \pm \Delta$	% от контроля
Контроль (вода)	—	26.7 ± 1.1	100
Хитозан	2×10^{-4}	24.3 ± 1.3	91
	1.5×10^{-4}	21.4 ± 0.8	80
	10^{-4}	20.5 ± 0.9	77
	10^{-5}	22.4 ± 0.7	84
	10^{-6}	24.0 ± 1.7	90
	10^{-7}	25.9 ± 0.7	97

Таблица 2. Элиситорная активность АК в дисках клубней картофеля, инфицированных *P. infestans*

Вариант	Концентрация АК, г/мл	Глубина проникновения гиф <i>P. infestans</i> , слои, $M \pm \Delta$	% от контроля
Контроль (вода)	—	26.9 ± 3.9	100
АК	10^{-4}	33.6 ± 2.7	125
	10^{-6}	33.3 ± 4.2	124
	10^{-7}	24.2 ± 3.5	90
	10^{-8}	17.8 ± 1.5	60
	10^{-9}	22.6 ± 3.4	84
	10^{-10}	26.5 ± 2.7	99
	10^{-11}	27.0 ± 3.3	100
	10^{-12}	26.9 ± 3.1	100
	10^{-14}	27.0 ± 3.0	100

Содержание белка. В диффузатах белок определяли по методу Bradford, используя в качестве стандарта БСА [11].

Токсическое действие элиситоров. Препараты АК и хитозана использовали для оценки их токсического действия на грибах *P. infestans* и *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.). Водный раствор испытуемого элиситора смешивали с суспензией зооспор или макроконидий патогенов (v/v), 0.5 мкл смеси наносили на предметное стекло и помещали в условия, необходимые для их прорастания. Через 24 ч прорастание зооспор фитогоры и макроконидий фузариума оценивали микроскопически, измеряя с помощью окулярной линейки длину проросших гиф.

Статистическая обработка. Результаты статистически обрабатывали по Стьюденту с вероятностью безошибочного прогноза 0.95. В таблицах приведены значения средней арифметической M и абсолютной максимальной погрешности Δ .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Элиситорную активность хитозана и АК оценивали по их способности задерживать развитие фитогороза в клубнях картофеля. Оптимальная элиситорная активность, вызываемая хитозаном, проявлялась при концентрации 10^{-4} г/мл (табл. 1). Защитный эффект хитозана в этой дозе составлял 23%. Падение или наоборот возрастание концентрации хитозана от точки его наивысшей элиситорной активности приводило к ее уменьшению.

Максимальную элиситорную активность АК наблюдали при ее чрезвычайно низкой концентрации, равной 10^{-8} г/мл (табл. 2). В этой дозе защитный эффект АК составлял 40% от контрольного варианта. По мере понижения концентрации элиситорная активность АК исчезала. Повышение концентрации до 10^{-4} г/мл вызывало некротизацию тканей дисков и большую площадь распространения гриба. Следует подчеркнуть, что элиситорная активность АК зависит от физиологического состояния клубней картофеля и изме-

Таблица 3. Влияние хитозана на процесс раневой репарации в тканях клубней картофеля

Вариант	Концентрация хитозана, г/мл	Феллоген, % от контроля	Число рядов перидермы, $M \pm \Delta$	% от контроля
Контроль (вода)	—	100	1.28 ± 0.03	100
Хитозан	2×10^{-4}	121	1.36 ± 0.04	106
	1.5×10^{-4}	138	1.33 ± 0.02	104
	10^{-4}	150	1.45 ± 0.01	113
	10^{-5}	115	1.23 ± 0.03	96
	10^{-6}	102	1.31 ± 0.05	102
	10^{-7}	101	1.24 ± 0.01	97

Таблица 4. Влияние АК на процесс раневой репарации в клубнях картофеля

Вариант	Концентрация АК, г/мл	Феллоген, % от контроля	Число рядов перидермы, $M \pm \Delta$	% от контроля
Контроль (вода)	—	100	1.13 ± 0.05	100
АК	10^{-4}	0	0.76 ± 0.02	67
	10^{-6}	22	0.75 ± 0.02	66
	10^{-7}	211	1.20 ± 0.01	106
	10^{-8}	233	1.47 ± 0.03	130
	10^{-9}	201	1.42 ± 0.05	126
	10^{-10}	111	1.12 ± 0.02	99
	10^{-11}	99	1.10 ± 0.01	97
	10^{-12}	100	1.15 ± 0.02	102
	10^{-14}	100	1.14 ± 0.03	101

няется от 10^{-6} г/мл в сентябре до 10^{-10} – 10^{-9} г/мл в мае–июне [12]. Настоящая работа проводилась в марте месяце.

Одним из защитных эффектов, индуцируемых элиситорами, является репарация механических поранений растительных тканей. Способность к раневой репарации широко распространена в мире растений. Покровы растительных тканей, как естественные, так и раневые, защищают растения от проникновения патогенов, излишнего испарения и неблагоприятных условий среды.

Механические поранения неизбежны при уборке, транспортировке и загрузке клубней картофеля в хранилище, поэтому скорость и интенсивность процессов заживления поранений являются важными условиями сохранения урожая картофеля. Быстрый и интенсивный процесс репарации во многом определяет защищенность всего растения или его органа, поскольку позволяет закрыть пораненные участки тканей от возможного проникновения инфекции.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что под воздействием хитозана и АК ускоряется образование и укрепляются защитные свой-

ства раневых покровов клубней картофеля (табл. 3 и 4). Оптимальной концентрацией хитозана, интенсивно залечивающей места механических поранений, является доза 10^{-4} г/мл (табл. 3). При этой дозировке большинство содержащих крахмал клеток паренхимы клубней картофеля, прилегающих к зоне поранения, превращались в меристематические, образуя вторичный камбий — феллоген, продуцирующий ряды раневой перидермы. АК по сравнению с хитозаном обладала более выраженными репарационными свойствами: в концентрации 10^{-8} г/мл элиситор более чем вдвое стимулировал формирование феллогена, образующего перидерму (табл. 4). Уменьшение концентрации элиситора постепенно сводило на нет репарационную активность, тогда как возрастание его дозировки приводило к некротизации клеток клубней.

Способность хитозана и АК стимулировать процессы раневого заживления клубней картофеля связана со свойством этих элиситоров индуцировать образование ингибиторов протеиназы (ИП), что является одним из критериев сигнальной системы репарации. Установлено, что хитозан

и особенно АК индуцировали выделение ИП в диффузаты клубней картофеля (рис. 1). При этом индуцирующая активность АК заметно превосходила соответствующую способность хитозана. Возможно, что большая активность АК связана со свойствами образующихся из нее простагландинов (в картофеле обнаружена циклооксигеназа) [13], участвующих в сигнальных системах животных, которые по биологической активности близки к сигнальным октадеcanoидам в тканях растений.

К числу защитных ответов растений, индуцированных элиситорами, принадлежит их способность вызывать образование низкомолекулярных антибиотиков — фитоалексинов (ФА) [14]. Под воздействием элиситоров и несовместимых патогенов происходит некротизация растительных тканей. Предполагается, что ФА синтезируются в здоровых клетках, прилегающих к области некроза, откуда перемещаются в некротизированные, где накапливаются до количеств, токсичных для патогена. Известно, что основными ФА картофеля являются его сесквитерпеноидные производные — ришитин и любимин [15, 16]. Согласно нашим результатам, особенно высокой способностью индуцировать ришитин обладала АК, которая в концентрации 200 мкг/мл индуцировала этот ФА в количестве 40 мкг/мл диффузата:

АК (мкг/мл)	Ришитин (мкг/мл диффузата)
1	0
5	0
10	2
25	4
50	20
100	20
200	40
400	45
600	47
1000	65

Хитозан вызывал образование того же количества ришитина в диффузатах, но в концентрациях, в 10 раз больше, чем АК (табл. 5).

В настоящее время считается, что одним из начальных механизмов фитоиммунитета является образование активных форм кислорода — супероксидных и гидроксильных свободных радикалов, пероксид водорода, а также синглетного кислорода. Эти продукты не только выступают в качестве прямых токсикантов для патогенов, но и являются участниками сигнальных систем растений [17]. Показано [18], что в клубнях под действием АК образовывался супероксидный радикал кислорода, который ингибировался супероксиддисмутазой

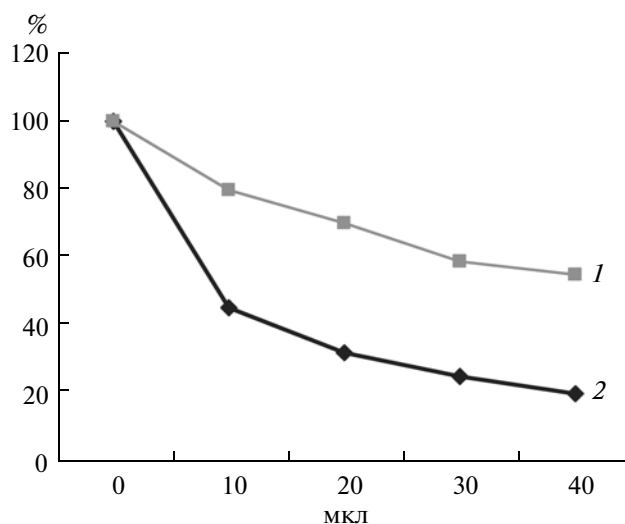


Рис. 1. Индукция ИП хитозаном (1) и АК (2) в диффузатах клубней картофеля. По оси абсцисс — объем (мкл) диффузатов клубней, подавляющих активность 1 мкг химотрипсина. По оси ординат — остаточная протеолитическая активность фермента, % от исходной.

(СОД). Диффузаты из обработанных АК (10^{-8} М) клубней картофеля ингибировали рост гиф возбудителя фитофтороза. Добавление СОД к диффузатам ослабляло фунгитоксическое действие, что свидетельствовало о наличии супероксида. Предполагается, что в диффузат выделяются предшественники супероксида, которые служат источником его образования.

Одним из ферментов, препятствующих образованию активных форм кислорода (АФК), служит каталаза, которая разлагает пероксид водорода

Таблица 5. Индукция ришитина хитозаном в диффузатах клубня картофеля

Хитозан, кДа	Концентрация хитозана, мкг/мл	Ришитин, мкг/мл диффузата
5	100	0
	1000	8
	3000	40
24	100	0
	1000	2
	3000	13
200	100	0
	1000	0
	3000	0

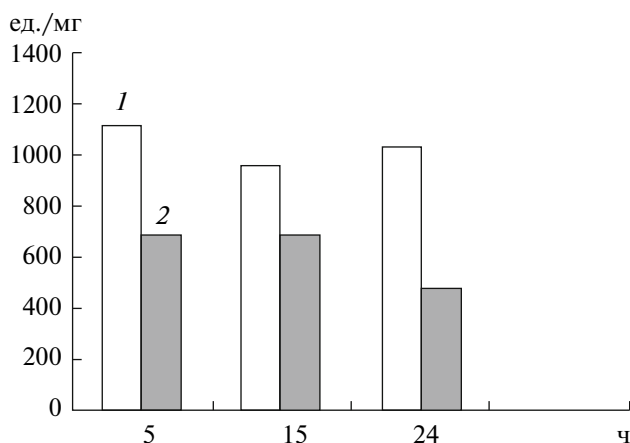


Рис. 2. Активность каталазы в дисках клубней картофеля после их обработки водой (контроль) и хитозаном (10^{-4} г/мл). По оси абсцисс – сроки инкубации дисков, ч. По оси ординат – удельная активность каталазы, ед./мг белка. 1 – Контроль (вода), 2 – хитозан.

да – наиболее стабильную форму АФК. Поэтому предполагают, что пероксид водорода способен играть роль вторичного мессенджера в тканях растений [19]. Накопление этого соединения вызывает окислительный взрыв, инициирующий процесс формирования иммунного ответа растений. Отсюда следует, что подавление активности каталазы может влиять на иммунный статус растительных клеток. Наши данные показали, что под воздействием хитозана в клетках клубня картофеля инактивируется каталаза, что может приводить к экспрессии защитных генов под влиянием накапливающегося пероксида водорода и повышению устойчивости растений. Установлено, что уже через 15 ч после предобработки дисков клубней хитозаном активность этого фермента значительно снижалась по сравнению с контролем, а при экспозиции в течение 24 ч происходило максимальное инактивирование каталазы (рис. 2).

Полученные результаты продемонстрировали, что оба исследованных элиситора индуцируют одни и те же защитные ответы у клубней картофеля. И хитозан, и АК стимулировали у клубней процессы репарации, образование ФА, ИП, а также способствовали возникновению окислительного взрыва. Можно предположить, что различие в индуцирующей активности обоих элиситоров носит количественный характер, так как хитозан индуцирует защитный потенциал растительных тканей в концентрациях на порядок больших, чем АК.

Однако о качественной однотипности защитных ответов трудно судить, не определяя непосредственное воздействие обоих элиситоров на патоген в условиях *in vitro*. С этой целью изучили влияние

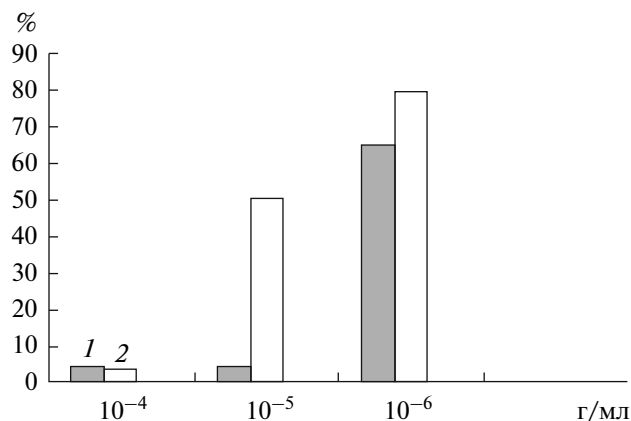


Рис. 3. Влияние хитозана (г/мл) на длину ростковой трубки зооспор *P. infestans* (1) и макроконидий *F. culmorum* (2).

элиситоров в различных концентрациях на длину ростковых трубок, образующихся после прорастания зооспор возбудителя фитофтороза или макроконидий возбудителя фузариоза (рис. 3 и 4).

Возбудитель фитофтороза был использован в работе, поскольку именно этот патоген применялся в экспериментах для определения элиситорной активности. Кроме того, один из исследованных элиситоров, а именно АК, не является чужеродным для возбудителя фитофтороза, поскольку известно, что патогены класса оомицетов, к числу которых принадлежит *P. infestans*, отличаются высоким содержанием полиеновых жирных кислот, в частности АК. Наоборот, хитозан чужероден для возбудителя фитофтороза, поскольку клеточные

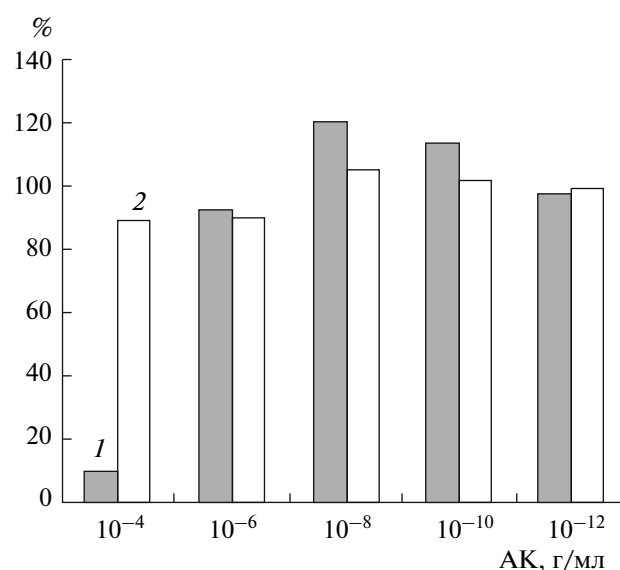


Рис. 4. Влияние АК на длину ростковой трубки зооспор *P. infestans* (1) и макроконидий *F. culmorum* (2).

стенки оомицетов или совсем не имеют его в своем составе, или содержат хитозан только в виде следов. Структурным элементом клеточных стенок и цитоплазматического содержимого фитотрофы служат β -глюканы [20]. *F. culmorum* в этом отношении прямо противоположен фитотрофу, поскольку его мицелий и макроконидии содержат хитозан, но не содержат АК. Именно поэтому данные грибы интересны для определения их чувствительности к использованным в работе элиситорам.

Показано, что хитозан полностью ингибировал прорастание зооспор *P. infestans* в концентрации 10^{-4} и 10^{-5} г/мл, однако по мере снижения дозы элиситора ингибирующий эффект ослабевал (рис. 3). Уже при использовании 10^{-6} г/мл хитозана часть зооспор возбудителя фитотрофа прорастала, образуя гифы длиной, составляющей примерно 65% от контрольного варианта. Вместе с тем установлено, что хитозан подавляет прорастание макроконидий возбудителя фузариоза, в несколько меньшей степени, чем ингибировал прорастание зооспор оомицета (рис. 3). Так, в дозировке 10^{-5} г/мл хитозан полностью угнетал прорастание зооспор фитотрофа, тогда как 50% макроконидий возбудителя фузариоза при этой же концентрации способны прорасти. В целом можно заключить, что хитозан ингибировал прорастание спор и рост гиф обоих патогенов, независимо от того, содержат ли они β -глюканы или хитозан.

Иная картина была получена при изучении воздействия АК на процесс прорастания фитопатогенов (рис.4). Данное соединение практически не подавляет прорастание зооспор фитотрофы и макроконидий фузариума и только при самой высокой концентрации, 10^{-4} г/мл, вызывающей некроз тканей картофеля, прорастание фитотрофы почти полностью ингибируется, тогда как макроконидии *F. culmorum* продолжают прорасти, причем длина образовавшихся ростковых трубок составляла 85% от контрольного варианта.

Подытоживая сказанное, нельзя не отметить, что элиситорная активность хитозана отличается от действия АК. Согласно полученным данным, защитное действие АК зависит только от ее способности индуцировать в растительной ткани защитные ответы и не связано с ее свойством подавлять жизнедеятельность фитопатогенов (возбудителей фитотрофа и фузариоза). Напротив, защитный эффект хитозана определялся двумя параметрами: способностью индуцировать иммунные ответы в тканях растений, с одной стороны, и оказывать токсическое действие на развитие патогена, с другой. Последнее дает основание полагать, что в случае защиты картофеля от фитотрофа и фузариоза хитозан действует скорее как биопестицид, в отличие от элиситора типа арахидоновой кислоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cruickshank I.A.M., Perrin D.R. // Life Science. 1968. V. 7. P. 449–458.
2. Keen N.T. // Phytopathology. 1972. V. 62. P. 1365–1366.
3. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Зиновьева С.В. // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М.: Наука. 2002. С. 280–360.
4. Васюкова Н.И., Зиновьева С.В., Ильинская Л.И., Переход Е.А., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Ильина А.В., Варламов В.П., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия микробиол. 2001. Т. 37. № 1. С. 115–122.
5. Ильинская Л.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиол. 1998. Т. 34. № 5. С. 467–479.
6. Hohl H.R., Stoessl P. // Can. J. Bot. 1976. V. 54. P. 900–912.
7. Hoppe H.H., Humme B., Heitefuss R. // Phytopathol. Z. 1980. V. 97. P. 85–88.
8. Huang Y., Hedgeson P., Sequeira L. // Mol. Plant-Microbe Interact. 1989. V. 2. № 3. P. 132–138.
9. Озерецковская О.Л., Савельева О.Н., Давыдова М.А., Васюкова Н.И., Чалова Л.И. // Методы современной биохимии. 1975. М.: Наука. С. 74–77.
10. Luck H. Methods of Enzymatic Analysis. N.Y. L.: Acad. Press. 1971. P. 183.
11. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 41. P. 248–254.
12. Чаленко Г.И., Ильинская Л.И., Озерецковская Л.И. // Прикл. биохимия и микробиол. 2001. Т. 34. № 3. С. 355–358.
13. Авдюшко С.А., Чалова Л.И., Озерецковская О.Л., Чаленко Г.И., Имбс А.Б., Латышев Н.А., Безуглов С.Г., Безуглов В.В., Бергельсон Л.Д. // Доклады АН СССР. 1987. Т. 296. № 4. С. 1012–1014.
14. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. // Фитоалексины. М.: Наука. 1973. 175 с.
15. Чалова Л.И., Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л., Метлицкий Л.В. // Прикл. биохимия и микробиол. 1971. Т. 7. № 1. С. 55–58.
16. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л., Чалова Л.И., Васюкова Н.И., Давыдова М.А. // Микология и фитопатология. 1971. Т. 5. С. 263–371.
17. Аверьянов А.А. // Успехи совр. биологии. 1991. Т. 111. С. 722–737.
18. Ильинская Л.И., Переход Е.А., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Романенко Е.Н., Зиновьева С.В., Озерецковская О.Л. // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 4. С. 516–523.
19. Гамалей И.А., Клубин И.В. // Цитология. 1996. Т. 38. С. 1233–1247.
20. Bartnicki-Garcia S. // Ann. Rev. Microbiol. 1968. V. 22. № 2. P. 87–108.

Elicitor Activity of Chitosan and Arachidonic Acid: Their Similarity and Distinction

N. I. Vasyukova, N. G. Gerasimova, G. I. Chalenko, and O. L. Ozeretskovskaya

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia

e-mail: vasyukova@inbi.ras.ru

Received April 19, 2011

Abstract—Two elicitors—chitosan and arachidonic acid—induced the same defense responses in potatoes, stimulating the processes of wound reparation and inducing the formation of phytoalexins, inhibitors of proteinase, and active forms of oxygen. However, chitosan induced the defense potential of plant tissues at concentrations higher than those of arachidonic acid. The protective action of chitosan was defined by two parameters, i.e., the ability to induce the immune responses in plant tissues and to exhibit a toxic effect on the pathogen development, causing late blight and seedling blight, whereas the elicitor effect of arachidonic acid depended on its ability to induce the defense potential of plant tissues only.

УДК 543.544:547.913

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СМЕСЕЙ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА ИХ АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

© 2012 г. Т. А. Мишарина, Е. С. Алинкина, Л. Д. Фаткуллина, А. К. Воробьева, И. Б. Медведева, Е. Б. Бурлакова

Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, Москва 119334

e-mail: tmish@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.04.2011 г.

Изучены и сопоставлены антирадикальные и антиоксидантные свойства смесей эфирных масел различного состава в модельных системах автоокисления гексаналя, термического окисления метиллинолеата и β -каротина, а также в реакции со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразилом. Установлено, что все изученные композиции эфирных масел обладали антирадикальной активностью. Самая высокая антирадикальная активность обнаружена для смеси эфирных масел, основными компонентами которой были монотерпеновые углеводороды, содержание фенолов было незначительным. Антиоксидантная активность всех смесей эфирных масел варьировала от 60 до 98% и зависела от состава модельной системы и метода определения. В системе автоокисления гексаналя самую высокую активность имела смесь с максимальным содержанием фенолов. В модельной системе с β -каротином наиболее эффективными антиоксидантами были смеси масел с высоким содержанием фенолов и α - и γ -терпиненов. Проведенные исследования подтвердили возможность варьирования антиоксидантных и антирадикальных свойств эфирных масел путем составления их композиций определенного состава.

Эфирные масла многих растений обладают интенсивным и приятным ароматом, а также различными видами биологической активности [1–3]. Эти природные продукты активно используются в качестве натуральных эффективных ароматизаторов при производстве пищевых, фармацевтических и парфюмерных изделий [3, 4]. Как правило, эфирные масла являются сложной смесью органических веществ с различными функциональными группами. Состав эфирных масел определяет их органолептические свойства и биологическую активность, в том числе антиоксидантную [5–8]. Изучение индивидуальных компонентов различных эфирных масел показало, что антирадикальной (АРА) и антиоксидантной (АОА) активностью обладают многие терпены, при этом активность циклических монотерпеновых углеводородов с двумя двойными связями сопоставима с АОА фенолов и α -токоферола [9–11]. Как правило, антиоксидантная активность эфирных масел выше, чем индивидуальных компонентов, содержащихся в маслах, что указывает на наличие синергетических эффектов за счет сложного многокомпонентного состава масел [10, 12–14]. Это позволяет варьировать антиоксидантную активность путем составления композиций эфирных масел различного состава [15]. Важно отметить, что по сравнению с синтетическими антиоксидантами, продуктами окисления которых чаще всего неизвестны и могут быть токсичными, активные компоненты эфирных масел, окисляясь,

образуют нетоксичные соединения, которые в небольших количествах изначально присутствуют в исходных образцах эфирных масел [16].

Для оценки антиоксидантных свойств веществ или их смесей используют различные методы. Было показано, что величина АОА в значительной степени зависит от метода ее оценки, поэтому имеющиеся в литературе данные, полученные разными методами, практически невозможно сопоставить. Кроме того, антиоксидантные свойства эфирных масел зависят от качественного и количественного состава тестируемых систем [6, 10–14].

Цель работы – изучение и сравнение антиоксидантных свойств смесей эфирных масел различного состава в модельных системах автоокисления гексаналя, термического окисления метиллинолеата и β -каротина, а также в реакции со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразилом.

МЕТОДИКА

Исследовали образцы 4 смесей эфирных масел: кожура лимона (*Citrus limon* В.), листья орегано (*Origanum vulgare* L.), семена кориандра (*Coriandrum sativum* L.), кардамон (*Elettaria cardamomum* L.) и почки гвоздики (*Caryophyllus aromaticus* L.) (компания “Plant Lipids Ltd.”, Индия).

Газохроматографический анализ (ГЖХ). Анализ образцов эфирных масел и их смесей осуществля-

Состав основных компонентов 4 смесей эфирных масел

ИУ*	Соединение	СЭМ 1	СЭМ 2	СЭМ 3	СЭМ 4
925	α -туйен	0.48	–	0.12	0.15
933	α -пинен	1.67	1.96	2.76	5.11
946	Камфен	0.62	0.30	0.49	0.80
968	Сабинен	0.56	0.58	0.45	1.08
973	β -пинен	1.43	2.84	2.06	0.44
982	β -мирцен	0.12	0.88	0.95	1.10
1014	<i>n</i> -цимен	14.52	0.90	5.07	2.15
1023	Лимонен + 1,8-цинеол	0.23	54.69	37.96	12.21
1051	γ -терпинен	9.22	8.60	7.80	2.53
1081	α -терпинолен	–	0.53	0.46	0.37
1085	Линалоол	2.53	13.53	21.52	43.00
1126	Камфора	–	0.94	1.45	2.91
1165	Терпинен-4-ол	–	0.09	0.14	0.58
1175	α -терпинеол	0.14	0.76	0.72	0.92
1211	Цитронеллаль	–	0.21	0.31	–
1217	Нераль	–	2.56	2.03	1.26
1235	Гераниаль	0.04	3.26	3.40	0.63
1265	Тимол	4.51	–	0,2	–
1278	Карвакрол	62.48	–	6.50	–
1330	Эвгенол	–	–	–	8.96
1334	Терпинилацетат	–	–	–	11.70
1339	Нерилацетат	–	1.35	1.13	–
1361	Геранилацетат	–	0.76	1.23	2.39
1420	β -кариофиллен	1.52	0.70	0.70	0.70
1439	γ -селинен	–	1.26	0.91	–
1503	β -бисаболен	–	1.64	1.27	–
Моно- и сесквитерпеновые углеводороды		21.15	67.41	52.79	24.75
Фенолы		67.00	–	7.02	8.96
Цитраль		–	5.82	5.43	1.89
Терпинены		9.22	9.13	8.26	2.90
О-терпеноиды		2.67	17.64	26.50	61.50

* ИУ – величины индексов удерживания на колонке SPB-1.

ли на хроматографе Кристалл 2000 М (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой SPB-1 (50 м × 0.32 мм, слой фазы 0.25 мкм). Температуру колонки программировали от 60 до 250°C со скоростью 8°C/мин, температура инжектора и детектора – 250°C. Идентификацию компонентов осуществляли на основе величин индексов удерживания (ИУ, см. таблицу) путем их сопоставления с литературными или экспериментальными данными, полученными нами. Содержание компонентов в смесях эфирных масел определяли отношением площади пика компонента к сумме площадей всех компонентов (%)

или по отношению к площади добавленного внутреннего стандарта, количество которого было известно. Состав смесей эфирных масел приведен в таблице.

Антирадикальная активность смесей эфирных масел. В 0.002%-ный метанольный раствор дифенилпикрилгидразида добавляли растворы смесей эфирных масел до достижения фактической концентрации 250 мкг/мл. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО “ОКБ Спектр”, Россия) при 515 нм сразу же после смешивания (A_0) и после выдержки при комнатной температуре на свету в течение 60 мин

(A_{60}). Антирадикальную активность образца рассчитывали по формуле:

$$I = ((A_0 - A_{60})/A_0) \times 100, \% \quad (1)$$

где A_0 – исходная оптическая плотность образца, A_{60} – оптическая плотность образца через 60 минут.

Антиоксидантная активность. Модельная система автоокисления гексаналя. Для оценки антиоксидантных свойств эфирных масел в 100 мл н-гексана растворяли 300 мкл гексаналя (3 мкл/мл) и 200 мкл н-ундекана (2 мкл/мл), который служил внутренним стандартом. Раствор разделяли на аликвоты по 2 мл, которые помещали в стеклянные пробирки объемом 5 мл, и добавляли по 6 мкл (3 мкл/мл) или по 30 мкл (15 мкл/мл) смеси эфирных масел. В контрольный образец масло не добавляли. Каждый образец был приготовлен двукратно, контрольный образец – трехкратно. Образцы в закрытых пробках пробирках хранили на свету при комнатной температуре в течение 40 сут. Каждую неделю пробирки открывали и продували 10 мл воздуха с помощью пипетки. Количественное содержание гексаналя и компонентов эфирных масел в пробирках определяли методом капиллярной газовой хроматографии через каждые 10 сут с начала хранения. АОА эфирных масел оценивали по степени ингибирования (I) окисления гексаналя (%) через 40 сут по формуле:

$$I = C_{40}/C_0 \times 100, \% \quad (2)$$

где C_0 – исходная концентрация гексаналя, C_{40} – концентрация гексаналя через 40 сут.

Модельная система на основе реакции с β -каротином. К 100 мл воды добавляли 3 мг β -каротина, 30 мг линолевой кислоты и 0.1 мг Твин 40 в качестве эмульгатора. Эмульсию получали на роторном гомогенизаторе Diah 900 (“Heidolph Instruments”, Германия) в течение 10 мин при комнатной температуре и скорости 26000 г. Полученную эмульсию делили на аликвоты по 5 мл, два образца служили в качестве контроля, к остальным (опытные образцы) добавляли смеси эфирных масел до их содержания в образцах 0.02 и 0.1 мг/мл. Окисление проводили в течение 2 ч на водяной бане при 60°C. Показатели оптической плотности образцов определяли на СФ-2000 (ЗАО “ОКБ Спектр”, Россия) при 470 нм. Процент ингибирования (I) рассчитывали по формуле:

$$I = ((A_x - A_{Kt})/(A_{K0} - A_{Kt})) \times 100, \% \quad (3)$$

где A_{K0} – оптическая плотность контрольного образца до нагревания, A_{Kt} – то же после нагревания, A_x – оптическая плотность опытного образца.

Модельная система автоокисления метиллинолеата с образованием диеновых конъюгатов. К 2 мл гексана добавляли по 200 мг метиллинолеата и по 5.0 мкл смеси эфирных масел, контрольный образец содержал только 200 мг метиллинолеата в 2 мл

гексана. Затем все образцы помещали на водяную баню и инкубировали в течение 9 ч при 50°C. Образование диеновых конъюгатов фиксировали при 234 нм. Процент ингибирования (I) рассчитывали по формуле:

$$I = ((A_K - A_x)/A_K) \times 100, \% \quad (4)$$

где A_K – оптическая плотность контрольного образца, A_x – оптическая плотность опытного образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки антиоксидантных свойств были выбраны смеси, составленные из эфирных масел орегано, лимона, кориандра, кардамона и почек гвоздики. В качестве субстратов для окисления использовали гексаналя или метиловый эфир линолевой кислоты. В таблице приведен состав смесей эфирных масел, который был определен методом ГЖХ. Для удобства обсуждения в таблице приведено суммарное содержание отдельных классов веществ: моно- и сесквитерпеновых углеводородов, фенолов, суммарное содержание γ -терпинена и α -терпинолена, кислородсодержащих компонентов, включая спирты и сложные эфиры, а также отдельно дано содержание двух изомерных альдегидов – нералья и гераниаля, которые называют цитралем. Как видно из таблицы, смеси эфирных масел (**СЭМ**) существенно различались по составу. Основным компонентом **СЭМ 1** являлось эфирное масло орегано, поэтому эта смесь была лидером по содержанию фенолов – тимола и карвакрола (около 70%), также она содержала 21% монотерпенов при полном отсутствии цитраля. В состав **СЭМ 2** входили эфирные масла лимона и кориандра, основными компонентами смеси были монотерпеновые углеводороды и линалоол. В отличие от всех остальных композиций, она не содержала фенолов. **СЭМ 3** была смесью эфирных масел лимона, кориандра и орегано, она была второй по содержанию терпеновых углеводородов, цитраль и фенолы присутствовали в количествах 5.4 и 7.0% соответственно. В состав **СЭМ 4** входили эфирные масла гвоздики, кориандра и кардамона. В этой смеси содержалось 61.5% кислородсодержащих терпеноидов, около 25% терпеновых углеводородов. Ранее в ряде работ было показано, что многие компоненты эфирных масел обладают антиоксидантными свойствами. Так, α - и γ -терпинены, сесквитерпеновые углеводороды, в том числе карифиллен, ингибировали окисление метиллинолеата [10, 11, 17]. Сабинен, α - и γ -терпинены и α -терпинолен являлись активными донорами протонов по отношению к 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилу, который используют для оценки антирадикальной активности [10, 12, 18]. Антирадикальной активностью обладали цитронеллаль, нераль и гераниаль, входящие в состав многих

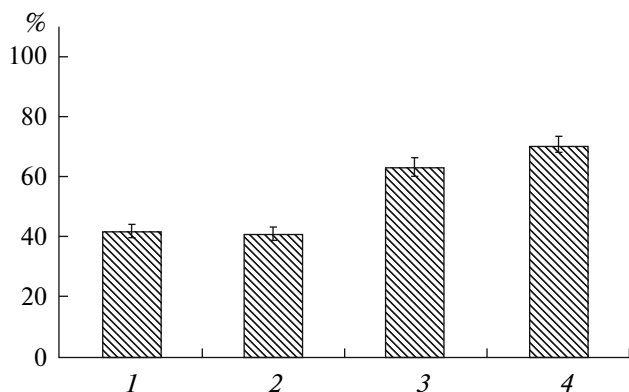


Рис. 1. Антирадикальная активность (%) смесей эфирных масел в реакции с радикалом ДФПГ. 1 – СЭМ 1, 2 – СЭМ 2, 3 – СЭМ 3, 4 – СЭМ 4.

эфирных масел [10, 18–20]. Высокую антиоксидантную активность во многих модельных системах имели фенольные соединения. Так, тимол, эвгенол и карвакрол по способности ингибировать окисление липидов были близки к α -токоферолу [21]. Мы сравнили АОА и АРА смесей эфирных масел, существенно различающихся по содержанию компонентов.

Антирадикальная активность смесей эфирных масел. Для определения антирадикальной активности чаще всего используют реакцию со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) благодаря простоте и высокой чувствительности методики. Антиоксидант отдает протоны и восстанавливает ДФПГ, при этом происходит изменение окраски от интенсивно фиолетовой до соломенно-желтой. Это фиксируется спектрофотометрическим методом при 515 нм. Реакция является стехиометрической и пропорциональна количеству атомов водорода, вступивших в реакцию с ДФПГ. Это означает, что количество восстановленного радикала пропорционально концентрации компонента (или компонентов в случае эфирных масел) с антирадикальной активностью.

Все образцы смесей эфирных масел восстанавливали ДФПГ (рис. 1), что говорит о наличии в их составе компонентов с антирадикальными свойствами. Самыми эффективными антирадикальными агентами являлись СЭМ 3 и 4, их активность составила 64 и 71%. Основными компонентами этих смесей были монотерпеновые углеводороды и кислородсодержащие соединения, фенолов было 7–9%. Суммарное содержание сабинена, α - и γ -терпиненов, α -терпинолена, цитронеллала, нерала и гераниала, которые, как известно, являются активными донорами водорода по отношению к радикалу ДФПГ [10, 12, 18–20] в СЭМ 3 составляло 14.5%, в СЭМ 4 – только 5.9%, то есть не коррелировало с АРА. Воз-

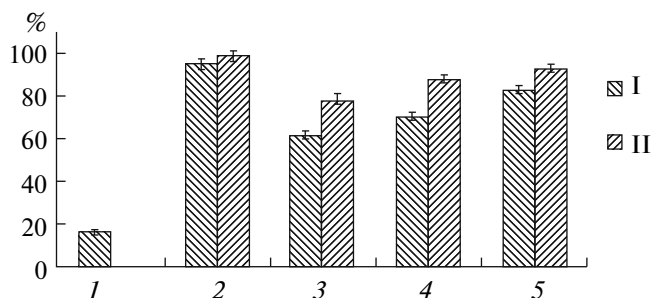


Рис. 2. Степень ингибирования автоокисления гексаналя (%) смесью эфирных масел. Содержание эфирных масел: I – 3 и II – 15 мг/мл; 1 – контроль, 2 – СЭМ 1, 3 – СЭМ 2, 4 – СЭМ 3, 5 – СЭМ 4.

можно, что, кроме известных веществ, в смесях присутствовали другие соединения, об активности которых ничего не известно, или мы наблюдали очень сильное синергетическое влияние компонентов эфирных масел в смесях на их антирадикальные свойства. Антирадикальная активность СЭМ 1 и СЭМ 2 были близки, несмотря на существенные различия в составе компонентов. Хотя все композиции обладали достаточно высокой антирадикальной активностью, но при изученной концентрации (250 мкг/мл) они могут быть отнесены к так называемым медленным антирадикальным агентам, так как время, за которое наблюдается 50%-ное восстановление радикала, превышало 30 мин [21, 22]. Наличие антирадикальной активности является важнейшим свойством эфирных масел и их композиций, так как в организме животных и людей за основные разрушения липидов, белков, ДНК и других жизненно важных соединений отвечают свободные радикалы. Возможно, систематический прием эфирных масел или пряно-ароматических растений, богатых такими маслами, будет оказывать профилактическое действие и снижать содержание свободных радикалов в организме.

Антиоксидантная активность. В основе одного из простых и информативных методов количественной оценки АОА лежит ингибирование автоокисления низшего альдегида, например гексаналя, в присутствии антиоксиданта [7, 8, 14, 15]. Этот метод был успешно использован для оценки и сравнения антиоксидантных свойств ряда эфирных масел [14, 15, 23–26]. В качестве критерия выбрано количество гексаналя, оставшегося не окисленным через 40 сут по отношению к исходному количеству (%). На рис. 2 приведены полученные величины относительной АОА 4 изученных смесей эфирных масел, содержащихся в модельных системах в двух концентрациях – 3 и 15 мкл/мл. Количество гексаналя составляло 3 мкл/мл. Как видно из рис. 2, для всех смесей, кроме СЭМ 1, существовала зависимость между

их концентрацией и активностью. Следует отметить, что увеличение активности, как правило, не было пропорционально росту концентрации эфирного масла. Увеличение содержания СЭМ 2 и СЭМ 3 в 5 раз сопровождалось увеличением АОА на 16–17%, а СЭМ 4 – только на 10% (рис. 2). АОА, определяемая по этому методу, коррелировала с содержанием фенолов в смеси эфирных масел. Так, самой высокой АОА обладала СЭМ 1, в которой содержание фенолов было максимальным. Самая низкая активность найдена для СЭМ 2, которая не содержала фенолов. Основными компонентами в этой смеси были монотерпеновые углеводороды, содержание γ -терпинена и α -терпинолена в ней было около 9% (таблица). Последние отвечали за АОА СЭМ 2, так как за 40 сут в 3–4 раза уменьшалось содержание только этих соединений и увеличивалось содержание продукта их окисления п-цимена. Увеличение содержания фенолов в СЭМ 3 и 4 сопровождалось увеличением их АОА (рис. 2). Таким образом, антиоксидантные свойства эфирных масел зависели от их состава. Масла с высоким содержанием замещенных фенолов способны существенно ингибировать процессы окисления лабильных алифатических альдегидов, эфирные масла даже с малым содержанием фенолов были более эффективными антиоксидантами, чем не содержащие таковых. Антиоксидантные свойства эфирных масел, состоящих из терпеновых углеводородов и спиртов, определяются наличием в них α - и γ -терпиненов. Для таких эфирных масел обнаружена зависимость между антиоксидантными свойствами и их концентрацией в системе.

Метод оценки АОА по изменению желтой окраски β -каротина основан на его окислении свободными радикалами, которые образуются из линолевой кислоты при ее автоокислении в эмульсии. Присутствие антиоксидантов в модельной системе ингибирует окисление линолевой кислоты и β -каротина, что приводит к большей устойчивости окраски в модельной системе, содержащей тестируемые антиоксиданты по сравнению с контрольной системой. В тесте с β -каротином мы наблюдали эффективное ингибирование окисления метиллинолеата во всех образцах (рис. 3). Смеси 1 и 3 имели самую высокую антиоксидантную активность, которая увеличивалась на 20% с увеличением концентрации эфирных масел в 5 раз и достигала 78% для СЭМ 1 и 89% для СЭМ 3. В такой же системе антиоксидантная активность бутилгидрокситолуола составляла 90%, а α -токоферола – 76% [27], то есть некоторые смеси эфирных масел не уступали по свойствам эталонным антиоксидантам. Следует отметить, что более высокую активность имела СЭМ 3, в которой содержание фенолов было меньше, чем в СЭМ 1. Антиоксидантная активность смесей 2 и 4 составляла 65–67%, но концентрационной зави-

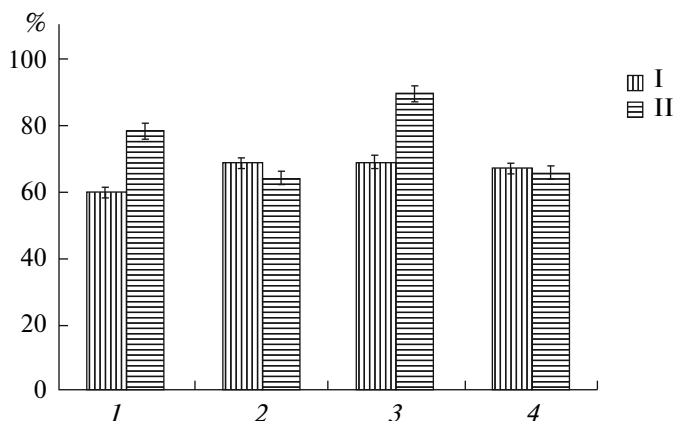


Рис. 3. Степень ингибирования окисления β -каротина (%) смесью эфирных масел. Содержание эфирных масел: I – 20 и II – 100 мкг/мл; 1 – СЭМ 1, 2 – СЭМ 2, 3 – СЭМ 3, 4 – СЭМ 4.

симости для этих смесей не наблюдалось. Ранее было найдено, что определенные по этому методу антиоксидантные свойства различных эфирных масел уменьшались в ряду: черный перец > монарда > орегано > герань > гвоздика [21], то есть так же, как и для наших смесей эфирных масел, самым активным было эфирное масло с низким содержанием фенолов (масло перца).

Определение диеновых конъюгатов имеет преимущество для оценки ПОЛ, поскольку отражает раннюю стадию окисления полиненасыщенных соединений с метилен-прерывающимися двойными связями. Обычным субстратом для определения диеновых конъюгатов являются полиненасыщенные жирные кислоты. В ходе перекисного окисления на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения при 234 нм.

В опытах по оценке влияния эфирных масел на образование диеновых конъюгатов мы получили заметные различия в свойствах композиций. СЭМ 1 и 3 ингибировали окисление линолевой кислоты, СЭМ 4 не влияла на ее окисление, а СЭМ 2 ускоряла ее окисление, то есть проявляла прооксидантный эффект (рис. 4). Однако следует иметь в виду, что эфирные масла представляют собой сложные многокомпонентные смеси и при 234 нм поглощают не столько образующиеся диеновые конъюгаты, сколько компоненты эфирных масел, имеющие сопряженные двойные связи, например цитраль, или продукты окисления терпиненов – ароматический углеводород п-цимен. Поэтому этот метод не может применяться для оценки антиоксидантных свойств эфирных масел без проведения дополнительных специальных исследований.

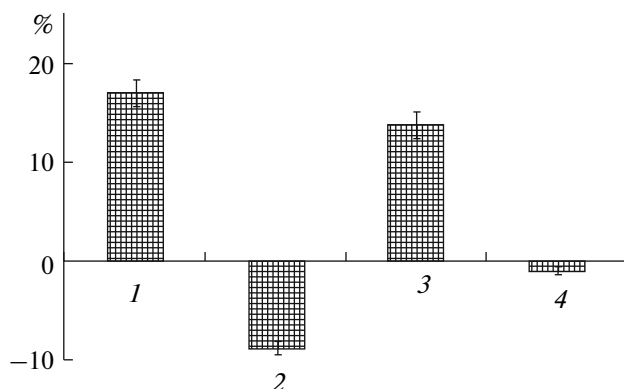


Рис. 4. Степень ингибирования (%) образования диеновых конъюгатов в процессе окисления метиллинолеата в присутствии смесей эфирных масел. 1 – СЭМ 1, 2 – СЭМ 2, 3 – СЭМ 3, 4 – СЭМ 4.

Таким образом, установлено, что все изученные композиции эфирных масел обладают антирадикальной активностью. Самая высокая антирадикальная активность обнаружена для смеси эфирных масел, основными компонентами которой были монотерпеновые углеводороды и их производные, содержание фенолов было незначительным (СЭМ 4). Это означает, что не содержащие фенолов эфирные масла способны эффективно ингибировать свободно радикальное окисление липидов.

Антиоксидантная активность смесей эфирных масел варьировала от 60 до 98% и зависела от состава модельной системы и метода определения. В системе автоокисления гексаналя самую высокую активность показала смесь 1 с максимальным содержанием фенолов. В модельной системе с β -каротином наиболее эффективными антиоксидантами были смеси масел 1 и 3, содержащие карвакрол. Смесь масел 2 с таким же содержанием терпиненов, но не содержащая фенолов, обладала самой низкой антиоксидантной и антирадикальной активностью. Очевидно, что для проявления антиоксидантных и антирадикальных свойств важно наличие в составе эфирных масел отдельных компонентов с высокой активностью и их сочетание. Проведенные исследования подтвердили возможность варьирования антиоксидантных и антирадикальных свойств эфирных масел путем составления их композиций определенного состава.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Madsen L.H., Nielsen B.R., Bertelsen G., Skibsted L.H. // Food Chem. 1996. V. 57. P. 331–337.
2. Войткевич С.А. // Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии. М.: Пищевая промышленность, 1999. 282 с.
3. Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability / Ed. R.G. Berger. New York: Springer Verlag, 2007. P. 43–116.
4. Bauer K., Garbe D., Surburg H. // Common Fragrance and Flavor Materials. Weinheim: VCH Verlag, 1990. 218 p.
5. Cervato G., Carabelli M., Gervasio S., Cittera A., Cazzola R., Cestaro B. // J. Food Biochem. 2000. V. 24. № 3. P. 453–465.
6. Dorman H.J.D., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Deans S.G. // Flavour Fragrance J. 2000. V. 15. № 1. P. 12–15.
7. Lee K.G., Shibamoto T. // Food Chem. 2001. V. 74. P. 443–448.
8. Lee K.W., Kim Y.J., Kim D.-O., Lee H.J., Lee C.Y. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 22. P. 6516–6520.
9. Huang D., Ou B., Prior R.L. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 6. P. 1841–1856.
10. Ruberto G., Baratta M. // Food Chem. 2000. V. 69. P. 167–174.
11. Foti M.C., Ingold K.U. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 9. P. 2758–2765.
12. Singh G., Marimuthu R., De Heluani C.S., Catalan C. // J. Food Sci. 2005. V. 70. № 3. P. 141–144.
13. Agnani H., Makani T., Akagah A., Menut C., Bessiere J.M. // Flavour Fragrance J. 2002. V. 20. № 1. P. 34–37.
14. Lee K.G., Shibamoto T. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 15. P. 4947–4952.
15. Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Медведева И.Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 5. С. 599–604.
16. Мишарина Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 6. С. 726–732.
17. Ruberto G., Baratta M.T., Deans S.G., Dorman H.J.D. // Planta Med. 2000. V. 66. № 3. P. 687–690.
18. Kim H.J., Chen F., Wu C.Q., Wang X., Chung H.Y., Jin Z.Y. // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. № 7. P. 2485–2488.
19. Menut C., Bessiere J.M., Samate D., Djibo A.K., Buchbauer G., Schopper B. // J. Essent. Oil Res. 2000. V. 12. № 1. P. 207–211.
20. Minica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M., Simin N. // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. № 7. P. 2485–2489.
21. Baratta M.T., Dorman H.J.D., Deans S.G., Figueiredo A.C., Barosso J.G., Ruberto G. // Flavour Fragrance J. 1998. V. 13. № 4. P. 235–244.
22. Foti M.C., Ruberto G. // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. № 1. P. 342–348.
23. Yanagimoto K., Ochi H., Lee K.G., Shibamoto T. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 25. P. 7396–7401.
24. Lee S.J., Shibamoto T., Lee K.G. // Food Chem. 2005. V. 91. P. 131–137.
25. Bozin B., Milica-Dukic N., Simin N., Anachov G. // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. № 5. P. 1822–1828.
26. Мишарина Т.А., Самусенко А.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 4. С. 482–486.
27. Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M. // Food Chem. 2004. V. 85. P. 633–640.

Influence of the Composition of Essential Oils on Their Antioxidant and Antiradical Properties

T. A. Misharina, E. S. Alinkina, L. D. Fatkullina, A. K. Vorob'eva,
I. B. Medvedeva, and E. B. Burlakova

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia
e-mail: tmish@rambler.ru

Received April 28, 2011

Abstract—The antiradical and antioxidant properties of essential oil mixtures (EOMs) with various compositions were studied and compared in model systems of hexanal autooxidation, thermal oxidation of methyl linoleate and β -carotene, and in a reaction with the stable diphenylpicrylhydrazyl radical. It was found that all EOMs under investigation exhibited antiradical activity. The highest antiradical activity was observed for an EOM containing monoterpene hydrocarbons as the main components (the phenol content was low). The antioxidant activity of all EOMs was from 60 to 98% and depended on the model system composition and the method of assay. The mixture with the highest phenol content exhibits the highest antioxidant activity level in the hexanal autooxidation system. EOMs with a high content of phenols and α - and γ -terpinenes were the most efficient antioxidants in the β -carotene model system. The study confirmed the possibility to vary the antioxidant and antiradical properties of essential oils by preparing their mixtures with a specific composition.

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СЕМИНАР “ПУТИ СНИЖЕНИЯ КОНТАМИНАЦИИ МИКОТОКСИНАМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ В РОССИИ И ЕС: СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ”

Международный семинар состоялся 9–10 июня 2011 г. в Москве, в Президиуме РАН. Организаторы семинара – Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН и проект MYCORED (“Novel integrated strategies for worldwide mycotoxin reduction in food and feed chains”). MYCORED – проект Седьмой Рамочной Программы ЕС, выполняемый с 2009 г. по 2013 г. консорциумом, объединяющим 25 научно-исследовательских, внедренческих и коммерческих организаций из 17 стран. Целью проекта является разработка новых и совершенствование существующих стратегических решений для уменьшения контаминации микотоксинами в экономически значимых цепях получения пищевых и кормовых продуктов. Материалы о деятельности в рамках проекта представлены на сайте www.mycored.eu.

Основная задача международного семинара состояла в сравнении подходов, используемых специалистами России и ЕС для борьбы с загрязнением сельскохозяйственной продукции микотоксинами и ограничения их содержания в пищевых продуктах и кормах. В семинаре приняло участие 128 специалистов, работающих в области производства, хранения и переработки сельскохозяйственной продукции, контроля безопасности пищевых продуктов и кормов и заинтересованных в решении проблем, связанных с микотоксинами. Участники семинара представляли научные и образовательные организации, государственные учреждения, производственные и коммерческие организации из России, Италии, Нидерландов, Венгрии, Турции, ЮАР, Украины, Казахстана, Беларуси, Армении. Семинар был проведен при поддержке проекта MYCORED, Министерства образования и науки РФ, Президиума РАН и Российского фонда фундаментальных исследований.

На открытии семинара с приветственными обращениями выступили Министр-советник по науке и технологиям Представительства Европейского Союза в России М. Халлен, начальник отдела живых систем Министерства образования и науки России В.М. Байрамов, Главный ученый секретарь Президиума РАН, директор НИИ питания РАН, академик РАН В.А. Тутельян,

директор Института биохимии им А.Н. Баха РАН, профессор В.О. Попов.

Семинар открылся докладами “Новые интегрированные стратегии для снижения уровня микотоксинов в мировом масштабе в кормовых и пищевых цепях: Международный проект Седьмой Рамочной Программы ЕС Mycored” (А. Моретти, А. Логриекко, Институт исследования продуктов питания, Бари, Италия) и “Организация эффективной системы контроля и нормирования микотоксинов в России в современных условиях” (В.А. Тутельян, М.М.Г. Гаппаров, НИИ питания РАН, Москва).

В качестве сопредседателей секций и почетных гостей Российскую академию сельскохозяйственных наук на семинаре представляли академики М.М. Левитин (ВНИИ защиты растений РАСХН, Санкт-Петербург), В.Д. Надыкта (ВНИИ биологической защиты растений РАСХН, Краснодар) и И.А. Егоров (ВНИТИ птицеводства РАСХН, Сергиев Посад, Московская область).

Всего в рамках семинара было заслушано 37 докладов, в которых освещались:

- факторы, обуславливающие накопление микотоксинов в сельскохозяйственной продукции;
- способы предупреждения или ограничения загрязнения микотоксинами продукции растениеводства, кормов и пищевых продуктов;
- способы обезвреживания контаминированного микотоксинами сырья;
- пути снижения ущерба от микотоксинов в животноводстве и птицеводстве;
- особенности отбора проб различных сельскохозяйственных культур и готовой продукции для анализа микотоксинов;
- совершенствование методов детекции и количественного определения микотоксинов;
- методы генетической идентификации микроскопических грибов и прогнозирования их токсигенного потенциала;
- цели, задачи и результаты проекта MYCORED;
- оценка эффективности систем контроля микотоксинов в сырье и готовой продукции.

Особенности организации контроля микотоксинов в продовольствии, кормах и сырье для разных стран были рассмотрены в выступлениях В.А. Тутельяна (НИИ питания РАМН, Москва), Х. Озера (Научно-исследовательский центр “Мармара”, Институт питания, Гебзе-Коцели, Турция), В.В. Ремеле (Казахский НИИ переработки сельскохозяйственной продукции, Астана), Е.В. Бесединой (Российский зерновой союз) и М.В. Возняка (Центр по испытаниям и сертификации пищевой продукции и кормов “ИЛ Тест-Пушино”). Докладчики охарактеризовали принципы, лежащие в основе систем контроля, эффективность их применения и возникающие при этом проблемы, приоритетные задачи совершенствования национальных систем контроля микотоксинов и нормативных требований к уровням контаминации.

Новейшие данные по изучению видового состава токсигенных грибов – возбудителей болезней полевых растений – в РФ представил М. М. Левитин (ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург). Докладчик охарактеризовал приуроченность отдельных видов грибов к основным сельскохозяйственным культурам в различных регионах и почвенно-климатических зонах РФ, представил данные о выявлении значительного количества новых видов возбудителей болезней растений. Полученные во ВНИИ защиты растений результаты свидетельствуют об изменении ареалов токсигенных грибов, в том числе о расширении ареала одного из наиболее опасных видов – *Fusarium graminearum*.

А. Моретти (Институт исследования продуктов питания, Бари) изложил данные по распространению видов *Fusarium* в различных регионах и климатических зонах Европы, охарактеризовал грибы рода *Fusarium* в соответствии с их хемотипами – способностью синтезировать те или иные микотоксины, представил карту рисков загрязнения европейской пшеницы основными фузариотоксинами.

Л.Д. Жалиева (Краснодарский НИИ сельского хозяйства РАСХН) охарактеризовала распространенность токсигенных грибов – возбудителей болезней растений – в агроценозах озимой пшеницы и кукурузы на юге России. Л.Д. Жалиева представила карту распределения возбудителей фузариоза пшеницы по агроклиматическим зонам региона, выделила зоны максимального риска эпифитотийного развития фузариоза колоса в Краснодарском крае и превышения ПДК микотоксина дезоксиниваленола в зерне пшеницы. Получены данные о накоплении охратоксина А в зерне кукурузы в поле при созревании в гигиенически значимых количествах.

А.Г. Козловским (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушино, Московская область) были изуче-

ны виды пенициллов, выделенные из различных малоизученных местообитаний: вечной мерзлоты, искусственной экосистемы орбитальной станции “Мир”, почв, подвергшихся антропогенным загрязнениям, и др. В результате работы открыты новые микотоксины различных структурных групп, в том числе соединения, обладающие антимикробным действием, цитотоксичностью (хиноцитринины, пискарины), воздействующие на центральную нервную систему, процессы гормональной регуляции (эргоалкалоиды).

Проблемам эффективности химических средств борьбы с токсигенными грибами, поражающими зерновые культуры, были посвящены доклады Ш. Легоцки-Кржака (Некоммерческое партнерство “Исследование зерновых культур”, Сегед, Венгрия) и Г.Д. Соколовой (ВНИИ фитопатологии РАСХН, Большие Вяземы, Московская область). Венгерский участник семинара представил данные о новых технологиях обработки злаковых культур фунгицидами и результаты сравнительных испытаний фунгицидов при разных способах их распыления. Г.Д. Соколовой показано неоднозначное и в ряде случаев разнонаправленное влияние различных фунгицидов на развитие фузариоза колоса пшеницы и на степень накопления микотоксина дезоксиниваленола в зерне. Подчеркнута необходимость осторожного подхода к использованию фунгицидов для сокращения накопления микотоксинов в зерне.

Вопросы оптимизации схем отбора проб, способов их усреднения и подготовки репрезентативного аналитического образца обсуждались в докладах Г.С. Шефарда (Подразделение ПРОМЕК, Медицинский научно-исследовательский совет, Тигерберг, Южная Африка) и М. Паскаля (Институт исследования продуктов питания, Бари). Оба докладчика подчеркнули важнейшее значение этих этапов для обеспечения точности анализов.

Л.С. Львова (ВНИИ зерна и продуктов его переработки РАСХН, Москва) представила результаты изучения влияния технологических процессов переработки зерна (пшеницы, ячменя, риса, кукурузы) на распределение микотоксинов в конечных продуктах и эффективности различных технологических приемов на степень обезвреживания муки, крупы и хлеба. На основании экспериментально установленных закономерностей распределения микотоксинов в продуктах переработки основных зерновых культур разработаны принципы и схема нормирования микотоксинов в конечных товарных продуктах.

В докладе Т.Н. Волковой (ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности РАСХН, Москва) представлены данные о микотоксиновых рисках в пивоварении – отрасли, обычно остающейся за рамками внимания микотоксикологов. Показано, что обработка зер-

нового сырья при получении солода приводит к увеличению степени контаминации микотоксинами. Загрязненное микотоксинами сырье является источником контаминации готового пива.

Проблемам микотоксинов в животноводстве и птицеводстве были посвящены доклады А.В. Иванова (Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань) и О.В. Труфанова (Институт птицеводства Национальной академии аграрных наук Украины, Борки). А.В. Иванов ознакомил участников семинара с последними достижениями в части диагностики и профилактики микотоксикозов. Особое внимание в его докладе было уделено способам лечения сочетанных микотоксикозов. О.В. Труфанов представил данные о влиянии фузариотоксинов на продуктивность различных видов птицы, патологические изменения органов, возникновение и развитие незаразных болезней. Значительную часть доклада составляли данные о разработанных способах детоксикации кормов и применения кормовых добавок, снижающих влияние микотоксинов на птицу.

Тема совершенствования инструментальных методов анализа микотоксинов освещалась в докладах К.И. Эллера (НИИ питания РАМН, Москва), И.С. Нестеренко (Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва), М. Паскаля (Институт исследования продуктов питания, Бари). Большой интерес вызвали представленные К.И. Эллером данные мониторинга наиболее распространенных микотоксинов в основных продовольственных культурах по регионам их возделывания в РФ.

Вопросам молекулярно-генетической детекции и идентификации токсигенных грибов рода *Fusarium* было посвящено выступление А.А. Стахеева (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Несколько докладов было посвящено вопросам разработки новых методов иммунохимического контроля содержания микотоксинов. Так, Б.Б. Дзантиев (Институт биохимии им А.Н. Баха РАН) представил результаты по системам иммунохроматографического анализа, В. Хааснут (Институт пищевой безопасности, Университет Вагенингена, Нидерланды) — по мультипараметрическим аналитическим системам с использованием планарных и суспензионных платформ, С.А. Еремин (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова) — по методам поляризационного флуоресцентного имму-

ноанализа, И.Ю. Горячева (Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского) — по микроколочным тест-методам, Н.Ф. Стародуб (Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев) — по сочетанию иммунохимических подходов с различными типами иммуносенсорных систем. Результаты исследований, проводящихся разными научными группами, свидетельствуют об общей тенденции к сокращению длительности и трудоемкости методов иммуноанализа, переходе к портативным системам, позволяющим проводить оперативное тестирование без транспортировки проб в специализированные лаборатории.

Перспективным представляется также использование аптамеров в качестве альтернативных рецепторных молекул для специфического определения микотоксинов, охарактеризованное в докладе А. Де Джироламо (Институт исследования продуктов питания, Бари).

Наряду с экспериментальными исследованиями, проект MYCORED предусматривает анализ мнений специалистов по вопросам, связанным с микотоксинами рисками. В выступлении К.В. Поповой (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН) были рассмотрены данные сравнительного анализа мнений российских и западноевропейских экспертов по приоритетным причинам контаминации на разных этапах производства и наиболее перспективным способам ее предотвращения.

В рамках семинара были проведены презентации продукции отечественных и зарубежных компаний, поставляющих на российский рынок современное аналитическое оборудование и тест-системы.

Итоги семинара были подведены в выступлениях Б.Б. Дзантиева (Институт биохимии им А.Н. Баха РАН) и А. Моретти (Институт исследования продуктов питания, Италия). Отмечены значительные успехи в понимании основных факторов, влияющих на контаминацию сельскохозяйственной продукции микотоксинами, и появление новых эффективных решений по снижению микотоксинами рисков. Подчеркнута плодотворность работы семинара, а также необходимость дальнейшего наращивания совместных усилий по разработке методов и технологий снижения уровней загрязнения микотоксинами пищи и кормов.

Видеоматериалы семинара размещены на сайте www.youtube.com/user/BioNCPrussian.

М.Д. Омельченко, А.В. Жердев