

Исследования морфологии, физиологии и биохимии. Грибы в условиях стресса

Studies in fungal morphology, physiology and biochemistry. Fungi and stress

РАЗВИТИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ МУЧНИСТОЙ РОСЫ ПШЕНИЦЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ОБРАБОТКОЙ ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА И 3-АМИНО-1, 2, 4-ТРИАЗОЛОМ

Аветисян Г. А.

Главный ботанический сад имени Н. В. Цицина РАН, Москва

Исследовали влияние перекиси водорода и 3-амино-1, 2, 4-триазола (3-АТА), ингибитора пероксидазы и каталазы, на развитие возбудителя мучнистой росы пшеницы *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* March. Обработка отделенных листьев пшеницы как 3-АТА, так и перекисью водорода ингибировала развитие колоний патогена. При увеличении концентрации данных веществ ингибирующая активность также возрастала, а высокие концентрации (10 мМ и более для 3-АТА и 5 мМ и более для перекиси водорода) полностью предотвращали развитие колоний патогена. Динамику развития и дифференциации инфекционных структур возбудителя мучнистой росы исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа LEO-1430 VP (Carl Zeiss, Германия) без химической фиксации в условиях низкого вакуума (VP режим) при комнатной температуре или в условиях высокого вакуума при -30°C с применением замораживающей приставки Deben UK (Великобритания). Конидии *E. graminis* прорастали на поверхности листьев пшеницы, образуя первичную ростковую трубку и аппрессорий в течение 24–48 ч после инокуляции. К концу данного периода внутри клетки эпидермиса растения-хозяина, как правило, образуется гаустория, служащая для поглощения питательных веществ. Через 48 ч в контроле у нормально развивающихся конидий можно наблюдать одну или несколько ростковых трубок, которые затем удлиняются, развиваясь в гифы эктофитного мицелия и формируя микроколонию. Через 72 часа после инфицирования были заметны развитые колонии с гифами длиной до 400–450 мкм. Обработка 3-АТА увеличивала количество конидий, не способных к прорастанию или образующих аномальные инфекционные структуры. К моменту образования в контроле развитых колоний с многочисленными конидиеносцами в вариантах с сильным ингибированием развития мучнистой росы в единичных случаях наблюдали только микроколонию. При этом они имели, как правило, многочисленные утолщенные и, вероятно, не функционирующие ростковые трубки. При высоких концентрациях наблюдали образование множества зачатков гиф, не развивающихся в дальнейшем. Под действием перекиси водорода при концентрациях 0.5–5 мМ наблюдали образование конидий с большим количеством ростковых трубок или удлиненной аппрессориальной ростковой трубкой. При использовании 10 мМ перекиси водорода развитие патогена останавливалось на стадии формирования аппрессория и дальнейшего образования колоний не происходило.

При краткосрочной инкубации в течение 24 ч наиболее сильное действие наблюдали на ранних этапах инфицирования (1 сут), что соответствует стадиям прорастания конидии, образования аппрессория и первичной гаустории. Ингибирование под действием перекиси водорода и 3-АТА сопровождалось увеличением аномалий в дифференциации инфекционных структур. 3-АТА способствовал появлению многочисленных утолщенных ростковых трубок и зачатков гиф, не развивающихся в дальнейшем. Под действием перекиси водорода происходило образование конидий с большим количеством ростковых трубок или одной удлиненной аппрессориальной ростковой трубкой.

Полученные данные позволяют предположить, что причиной аномального развития патогена на устойчивых растениях может быть воздействие активных форм кислорода, возникающих в устойчивом растении при прохождении защитных реакций.

ИЗМЕНЕНИЯ В УГЛЕВОДНОМ СОСТАВЕ МУКОРОВЫХ И АСКОМИЦЕТНЫХ ГРИБОВ В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА

Андриянова Д. А., Усов А. И., Галанина Л. А., Мейчик Н. Р., Феофилова Е. П.

¹ Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского РАН, Москва

² Институт органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН, Москва

³ Московский Государственный Университет имени М. В. Ломоносова

Грибы представляют собой гетерогенную группу организмов, отличающуюся по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам. Считается, что общим для царства Fungi или Mucota характерны следующие критерии: гетеротрофность, наличие клеточной стенки, поляризованный рост, способность образовывать покоящиеся клетки, наличие в составе биополимеров хитина, а также по ряду генетических, ферментных и метаболических критериев (Гарибова, Лекомцева, 2005). Однако данные последних лет показывают, что большинство указанных критериев характерны и для организмов, представителей других царств. Например, клеточная стенка – характерна для растений, хитин – для представителей ракообразных, образование покоящихся клеток – для прокариотных организмов, поляризованный рост – для корневых волосков растений. Вероятно, дополнительную информацию, характеризующую царство Fungi, можно получить, исследуя химический состав их клеток или отдельных структур, в частности клеточную стенку. В этом плане мало исследован углеводный состав клеток грибов, учитывая значительную роль углеводов в ряде ключевых метаболических процессах – узнавании, передаче информации, стабилизации клеточных биополимеров, сохранении жизнеспособности клеток и др. Поэтому целью настоящего сообщения стало изучение углеводного состава представителей высших и низших мицелиальных грибов.

Работу проводили с мицелиальными грибами, представителями низших и высших грибов: 1) гетероталличными штаммами *Cunninghamella echinulata* (синоним – *japonica*), 470 (-), 471(+), 776(-), 775 (+), 626 (-), 1204(-), *C. homotalica* 930 (семейство *Cunninghamellaceae*), относящимися к классу *Zygomycetes*, порядок *Mucorales*. Основными являются штаммы *Cunninghamella echinulata* = синоним *C. japonica* 1204 (-) и *Absidia coerulea*. 2) *Penicillium roqueforti* ВКМФ- 3057, относящегося к отделу *Ascomycota*, класс *Eurotiomycetes*, порядок *Eurotiales*, семейство *Trichomaceae*. Все штаммы получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН. Условия выращивания мицелия в стадии трофофазы и идиофазы, получение конидий и способ их сбора и получения чистой фракции описаны в предыдущем сообщении (Андриянова с соавторами, 2009).

Установлено, что моносахаридный состав изучаемых грибов близок таковому растений и содержит: глюкозу, рамнозу, ксилозу, фукозу, маннозу, галактозу. Преобладающим сахаром на всех стадиях роста и онтогенеза является глюкоза, однако этого углевода значительно больше у пеницилла в стадии идиофазы и в спорах обоих видов грибов. Фукоза и урановые кислоты специфичны для муколовых грибов, причем особый интерес представляет тот факт, что эти углеводы содержатся в значительно более высоком количестве в мицелии (+) штамма *Mucorales* по сравнению с (-)штаммом. Для *P. roqueforti* отмечено более низкое содержание D-глюкозамина и хитина на всех стадиях онтогенеза, но более высокий уровень маннозы в мицелии в стадии идиофазы. Для спор муколовых грибов характерно большее содержание галактозы и фукозы. Таким образом, впервые установлены отличия в углеводном составе муколовых и аскомицетных грибов в процессе их онтогенеза. С позиции феномена гетероталлизма получены новые данные о более высоком содержании урановых кислот, фукозы и хитина в мицелии (+) штамма.

Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-00430

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Андриянова Д. А.¹, Мейчик Н. Р.², Николаева Ю. И.², Галанина Л. А.¹, Феофилова Е. П.¹

¹ Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского РАН, Москва

² Московский Государственный Университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Клеточная стенка (КС) грибов является наружной структурой, выполняющей согласно современным представлениям, важнейшие функции. КС грибов состоит из опорных полисахаридов (аминополисахаридов, глюканов) и матрикса, включающего некоторые гетерополисахариды, белки и липиды. Состав КС не является постоянным и меняется в качественном и количественном отношении в зависимости от условий окружающей среды. Эти изменения коррелируются с формой клеток грибов, что позволяет говорить о взаимосвязи между составом КС и ее морфологией. Эту связь можно проследить, исследуя анионообменные свойства КС. Целью данной работы была оценка качественного и количественного состава ионогенных групп КС двух мицелиальных грибов.

Особенностью используемого метода является исследование полимеров КС как целостного компонента клеточной структуры без использования методов химической деструкции.

Работу проводили с двумя мицелиальными грибами: мукоровым грибом *Cunninghamella japonica* ВКМФ-1204 (-) относящимся к классу *Phycomycetes*, порядку *Mucorales*, семейству *Cunninghamellaceae* и микроскопическим грибом *Penicillium roqueforti* класс *Ascomycetes*, порядок *Eurotiales*, род *Penicillium*.

Выделение КС проводили путем обработки гомогенизированной в Homogenizator ТЕРУ МРВ-324 биомассы вегетативного мицелия жидким азотом, а затем ультразвуком (установке Ultrasonic disintegrator type UD-20 by Techpan), отмывали многократно водой с последующей обработкой смесью этилового спирта и хлороформа для извлечения липидов, с последующей стандартизацией клеточной стенки последовательно 100 мМ NaOH – H₂O – 100 мМ HCl – H₂O. Конечную стадию отмывки КС водой проводили до отсутствия хлорид-ионов в промывных водах. Определение качественного и количественного состава ионообменных групп проводили с помощью потенциометрического титрования, которое осуществляли методом отдельных навесок.

В соответствии с данными, что в трехмерной структуре КС мукоровых грибов (*C. japonica*) и аскомицетных грибов (*P. roqueforti*) содержится два типа ионогенных групп, которые определяют ионогенный состав оболочек. На основании значений рКа, группы с рКа = 3. 5-4. 0 можно отнести к свободным аминокетонам хитина, (у *C. japonica* ~200 мкмоль на 1 г сухой массы КС, а у *P. roqueforti* ~150 мкмоль на 1 г сухой массы КС). Вторая ионогенная группа с рКа = 8, 4 в КС мукорового гриба *C. japonica* содержится в количестве 120 мкмоль на 1 г сухой массы КС, тогда как у *P. roqueforti* содержится меньше данных групп - около 90 мкмоль на 1 г сухой массы КС. Можно предположить, что вторая выявленная нами группа принадлежит к структурным белкам КС, однако для точного выявления природы этой группы будут проведены дополнительные исследования. Изложенные выше данные свидетельствуют о том, что, как и у растений, в зависимости от внешних условий КС грибов может выполнять функцию природного катионо- или анионообменника.

Работа поддержана грантом РФФИ -09-04-00430

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА И АЗОТА НА РОСТ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ *CORIOIUS QUEL* (TRAMETES FR.)

Антоненко Л. А., Клечак И. Р., Кучма В. Н.

Национальный технический университет Украины «КПИ», Киев

Благодаря разнообразию биологически активных веществ высшие базидиальные грибы по-прежнему остаются в центре внимания исследователей. Спектр объектов исследований неуклонно расширяется (Шиврина и др., 1969; Ганбаров, 1989; Белова, Ефремова, 1992, Оои, 2000, 2001; Горшина и др., 2002; Белова, 2004) и среди них, уже давно достойное место занимают грибы рода *Coriolus* (*Trametes*), которые обладают противовирусными, антибактериальными, гепатопротекторными, противоопухолевыми свойствами. Бабицкой В. Г. и соавторами было установлено, что экстракты мицелия некоторых грибов, среди которых и вид *Coriolus hirsutus*, способны тормозить развитие процессов перекисного окисления липидов в мембранах.

Объектами исследования были 5 видов (31 штамм) грибов рода *Coriolus* из Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины. В предыдущих исследованиях было отобрано по накоплению биомассы 4 штамма (*C. versicolor* 353, *C. zonatus* 5302, *C. hirsutus* 5137, *C. villosus* 1009) для дальнейших исследований.

Целью работы было изучение влияния источника углеродного и азотного питания на накопление биомассы и антиокислительную активность (АОА) культуральной жидкости грибов рода *Coriolus*. Исследовали 12 источников углерода, среди которых были моно-, ди- и полисахариды, сахароспирты и 7 источников азота органической и неорганической природы. Культивирование проводилось в стационарных условиях в течение 7 суток при температуре 30°C.

Исследуемые культуры хорошо росли на моносахаридах (глюкоза, галактоза, фруктоза), дисахаридах (мальтоза, сахароза) и полисахариде (крахмал). Кроме того, для трех штаммов наибольшее накопление биомассы 1, 5-2, 3 г/л обеспечивали несколько разных источников углерода. Так, штаммы *C. versicolor* 353 и *C. hirsutus* 5137 легко усваивали мальтозу и крахмал, а *C. zonatus* 5302 и *C. villosus* 1009 – сахарозу, наряду с легко фосфорилируемой глюкозой.

Органические источники азота, а именно пептон, обеспечивали лучший рост мицелия грибов (1, 2-2, 0 г/л). Среди неорганических соединений предпочтения распределились по-разному: NH₄Cl для *C. versicolor* 353 и *C. hirsutus* 5137, NH₄H₂PO₄ и (NH₄)₂SO₄ для *C. zonatus* 5302. Полученные нами результаты по изучению влияния источника азотного питания на накопление биомассы несколько расходятся с данными, которые приводятся в литературе (Ганбаров, 1989), что говорит о штаммовой вариабельности грибов, выделенных из разных источников.

Параллельно с изучением влияния источников углерода и азота на рост грибов было также исследовано антиокислительную активность образцов. Источники углерода и азота также влияли на проявление АОА культуральной жидкости штаммов, изученных в опыте. Высокие показатели АОА в диапазоне 3, 29 Ч 10⁻³ - 5, 6 Ч 10⁻³ л/мл-мин отмечены для штамма *C. villosus* 1009 при использовании ксилитозы, сахарозы и фруктозы. Что касается, штамма *C. hirsutus* 5137, то высокие показатели в диапазоне 2, 03 Ч 10⁻³ - 3, 38 Ч 10⁻³ л/мл-мин были при использовании сахарозы, галактозы и фруктозы. Значения АОА для грибов *Coriolus* при использовании некоторых источников углеродного питания пре-

восходят показатели, полученные для *Flammulina velutipes* (Кваско, 2008). Что касается, источников азотного питания, то наибольшая АОА в культуральной жидкости наблюдалась при использовании $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и NH_4NO_3 .

Результаты исследования показывают, что среди предложенных источников азота равносильной замены пептону, как источнику азота для накопления биомассы, не найдено. Что же касается источника углерода, то для штаммов *C. hirsutus* 5137 и *C. versicolor* 353, предполагается использовать в этой роли пивное сусло, богатое на мальтозу и крахмал. Исходя из показателей АОА для дальнейших исследований было выбрано штаммы *C. villosus* 1009 и *C. hirsutus* 5137. В качестве источника углерода для увеличения АОА решено использовать сахарозу или ксилозу; а в качестве источника азота - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ или NH_4NO_3 .

ДВА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ТИПА ПЕЛЛЕТ *Ganoderma lucidum*

Барков¹ А. В., Леонтьева² М. И., А. В. Автономова, Винокуров¹ В. А., Краснопольская² Л. М.

¹ **Российский государственный университет нефти и газа имени И. М. Губкина, Москва**

² **НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва**

В погруженной культуре мицелиальные грибы часто формируют пеллеты, размер, форма и количество которых зависят от вида и штамма гриба, условий выращивания. Форма и размеры пеллет оказывают влияние на биосинтетическую активность грибного организма, поскольку условия массообмена различны для периферических и центральных гиф пеллеты. С другой стороны, морфометрические показатели пеллет можно рассматривать в качестве индикатора «физиологического благополучия» продуцента. Так, например, известно, что рост культуры в виде единичных пеллет большого диаметра (свыше 1 см) в подавляющем большинстве случаев свидетельствует о неадекватности условий выращивания потребностям грибного организма и о резком снижении им биосинтетической активности.

Цель настоящей работы состояла в изучении формы, размеров и количества пеллет, образуемых базидиальным грибом при погруженном культивировании в зависимости от условий аэрации. В качестве объекта работы использовали штамм *Ganoderma lucidum* из коллекции НИИНА РАМН. Погруженное культивирование осуществляли в биореакторе геометрическим объемом 7 л с коэффициентом заполнения 0,7 на среде, содержащей глюкозу, кукурузный экстракт и минеральные соли, при скорости вращения мешалки 50 об/мин. и температуре 26 °С. Использовали три режима аэрации с подачей 1, 5, 1 или 0, 5 объема воздуха на объем среды в минуту. В экспериментах изучали морфологию, размеры и количество пеллет, накопление погруженной биомассы.

В процессе погруженного культивирования исследуемая культура образовывала пеллеты двух морфологических типов. К первому типу относились более мелкие ассиметрично веретенообразные пеллеты, размеры которых варьировали в диапазоне от 0,5х3,0 до 1,0х5,0 мм. Вторым типом был представлен более крупными сферической формы пеллетами диаметром 4-7 мм. Было показано, что режим аэрации влияет на количество пеллет и соотношение пеллет разных морфологических типов. В количественном отношении в течение всего процесса погруженного культивирования при исследованных режимах аэрации преобладали пеллеты первого типа. Было отмечено, что по мере роста культуры количество пеллет первого морфологического типа возрастало, а второго - снижалось. Увеличению числа пеллет второго морфологического типа способствовало снижение интенсивности аэрации погруженной культуры *G. lucidum*. Обнаружение в погруженной культуре образований из 2-4 пеллет первого морфологического типа позволяет предположить, что они являются структурной единицей пеллет второго типа.

Работа частично выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

РЕАКЦИИ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ШТАММОВ *PAECILOMYCES LILACINUS* ИЗ РАЗНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ

Белозерская Т. А., Гесслер Н. Н., Иванова А. Е., Егорова А. С., Олишевская С. В.

Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва

Факультет почвоведения МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

Исследование ответных реакций микроскопических грибов на действие стрессорных агентов направлено на выявление их защитных систем, способствующих выживанию в экстремальных условиях существования. Для исследования были отобраны штаммы *P. lilacinus*, выделенные из почв разных географических регионов с разным уровнем радиоактивного загрязнения. Штаммы из Почвы Рыжего леса (зона отчуждения ЧАЭС, годы выделения 1992-1994; уровень радиоактивного загрязнения: $1,2 \times 10^2$ - $5,9 \times 10^5$ Бк/кг) и из стационара в окрестностях села Копачи (уровень радиоактивности $3,2 \times 10^6$ Бк/кг, год выделения 1987; содержание меди в почве в 30 раз превышало ПДК) были любезно предоставлены отделом физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины, штаммы из местообитаний с фоновым уровнем радиоактивного загрязнения (дер-

ново-подзолистая, Смоленская область, 1-я надпойменная терраса правого берега Днепра и торфяная почва, Новгородская область) - из рабочей коллекции кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ.

Для всех штаммов определяли радиальные скорости роста при культивировании на агаризованной среде с разными концентрациями глюкозы (0, 002 - 5%), а также содержание карбонильных групп в белках (показателя внутриклеточного окислительного стресса) и активности основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы при повышении концентрации глюкозы в среде (от 0, 002 до 2%). Определение карбонильных групп в белках, а также СОД и каталазы осуществляли по методике (1).

Выявлено увеличение содержания карбонильных групп в белках у штаммов, обладающих повышенной способностью к пигментообразованию независимо от радиоактивности места первичного обитания. Характер изменения в содержании карбонильных групп в белках под действием H_2O_2 свидетельствует о более высокой устойчивости к вызываемому стрессу у контрольных штаммов, при содержании глюкозы в среде 2%. У штаммов из загрязненных радионуклидами местообитаний, напротив, повышенная устойчивость к стрессу выявлялась при пониженном содержании глюкозы (0, 002 - 0, 2%) и коррелировала с более высокими скоростями роста. Исследование защитных механизмов у разных штаммов *P. lilacinus* выявило роль ферментативных механизмов (СОД и каталазы), а также значимость темноокрашенных пигментов. Повышение способности к пигментообразованию сопровождалось снижением активности ферментативных механизмов защиты независимо от исходного местообитания микроскопических грибов. Таким образом, штаммам из экстремальных зон свойственна олигокарботолерантность наряду с возможностью существования в условиях повышенного окислительного стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 08-04-01833

Литература

1. К. Б. Асланиди, А. Е. Иванова, Н. Н. Гесслер, А. С. Егорова, Т. А. Белозерская Сравнительное исследование адаптации к окислительному стрессу мицелиального гриба *Paecilomyces lilacinus* штамма 1941 из зоны отчуждения ЧАЭС и штаммов из зон с фоновым уровнем радиоактивного загрязнения. Радиационная биология. Радиозэкология. 2009, Том 49, № 4, С. 425–431.

СТРУКТУРЫ РЕЦЕПЦИИ МИКРОКЛИМАТА НА РАННИХ СТАДИЯХ МОРФОГЕНЕЗА РЯДА КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ.

Богдаев А. А., Богдаева С. А., Богдаев А. Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Наше исследование было посвящено изучению процесса формирования мицелиальных структур, служащих обеспечению между факторами микроклимата и морфогенезом примордиальных структур на самых ранних стадиях закладки базидиом. Объектами исследования служили 11 штаммов, относящиеся к 5 видам ксилотрофных грибов: *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus eringia*, *Hericium erinaceus*, *Lentinus edodes*. Анатомические исследования позволили констатировать, что у видов развитые базидиомы, готовые к спороношению имеют прикрепление либо непосредственно на поверхности субстрата, либо между основанием базидиомы и субстратным материалом находится тонкий слой стромы (до 2 мм). Таким образом, морфологически основание ножки плодовых тел прикрепляется к субстратной массе без заглублиения.

У *L. edodes* зона прикрепления ножки находится ниже уровня поверхности субстрата, но наблюдается развитие примордиев на стадии горошины, расположенных на стекле, полиэтилене и соединенных с основной массой мицелия лишь толстыми мицелиальными тяжами. «Горошины» формируются на поверхностях вне блока. Наблюдения позволили сделать заключение о существовании участков рецепции на поверхности субстратных блоков, определяющих пригодность к закладке зародышевых структур впоследствии формирующих базидиому.

Микроскопические исследования с целью изучения рецепторных структур на поверхности мицелия проводились с использованием метода сканирующей оптической микроскопии. Изображение выводилось на монитор компьютера. Отмечено следующее:

1. На определенной стадии процесса колонизации на поверхности субстрата формируются участки воздушного мицелия, имеющие слоистую структуру из 3-4 накладывающихся горизонтальных слоев гифов.
2. Каждый слой имеет свою ориентацию роста разветвляющихся гифальных нитей, то есть слои гифов накладываются в последовательном порядке.
3. В определенных точках поверхности колонизированного субстрата, имеющего воздушный мицелий слоистой структуры, происходит рост гифальных клеток внутренних слоев («нарастание слоев») до образования холмообразной структуры высокой оптической плотности.
4. На поверхности слоистого утолщения рыхло располагающихся клеток мицелия наблюдается деформация гифальных нитей вследствие смены положения.

5. В ряде случаев дальнейший рост холмообразной структуры необратимо прекращается. Однако, в отдельных структурах продолжает интенсивно нарастать внутренняя масса воздушных мицелиальных нитей.

По мнению авторов динамичность роста мицелиальных клеток внутренних слоев холмообразных структур является ответной реакцией на состояние параметров микроклимата непосредственно вблизи поверхности субстратной массы. Таким образом, холмообразные структуры клеток воздушного мицелия, расположенные над поверхностью субстрата способны осуществлять рецепцию микроклиматических параметров на ранних стадиях морфогенеза, предшествующих образованию примордиальных структур.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛУЧШЕГО ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДНОГО ПИТАНИЯ ДЛЯ ШТАММОВ *IRPEX LACTEUS* – ПРОДУЦЕНТОВ ЭКЗОПРОТЕИНАЗ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

Бойко М. И., Кузнецова И. А.

Донецкий национальный университет, Донецк

Грибы по отношению к источникам углерода обладают избирательной способностью (Шиврина, 1965; Федорова, Дроздова, 1982) и нередко запрос их в различных источниках углерода для роста, образования и выделения соответствующих метаболитов в питательную среду не совпадает, а иногда носит противоположный характер (Бойко М. И. и др., 1992, Федотов, 1996; Бисько, Соломко, Митропольська, 1997; Никитина, 1998; Бойко С. М., 2002).

Возрастающий дефицит реннина (сычужный фермент), использующегося в сыродельной промышленности, делает перспективным поиск новых источников сычужного фермента, в том числе грибного происхождения (Бухало та ін., 1971; Низковская, Федорова, Дроздова, 1980; Соломко, Дудка, 1985; Денисова, 1991; Негруцкий и др. . 1993; Бойко и др. ., 1995; Федотов, 1995; Кузнецова, Бойко, 2005 и др.).

Цель работы - определить лучший источник углеродного питания для биосинтеза экзопротеиназ молоко-свертывающего действия штаммов *I. lacteus*.

Для этого в жидкую глюкозо-пептонную среду вместо глюкозы в эквивалентном количестве к углероду глюкозы, вносили моносахара – фруктозу, галактозу, ксилозу; дисахариды – мальтозу, сахарозу, лактозу; многоатомные сахароспирты – сорбит, маннит. Штаммы *I. lacteus* культивировали при оптимальных температурах и рН питательной среды в течение 30 суток. Активность протеиназ молоко-свертывающего действия в культуральных фильтратах (КФ) штаммов *I. lacteus* определяли по методу Каваи и Мукаи (Kawai, Mukai, 1970).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа, а сравнение средних арифметических величин – методом Данетта (Приседский, 1999).

Установлено, что активность протеиназ молоко-свертывающего действия культурального фильтрата штамма Р-04 *I. lacteus*, произраставшего на среде с сахарозой, увеличивалась в 2, 5 раза (5-е сутки), на среде с лактозой в 2 раза (20-е сутки) и на среде с мальтозой в 1, 5 раза (10 – 15 сутки культивирования), чем на среде с глюкозой (контроль).

Наиболее активные протеиназы молоко-свертывающего действия штамма Ч-03 *I. lacteus* выявлены при его культивировании на питательных средах с сахарозой, мальтозой и глюкозой. При этом достоверного отличия в активности молоко-свертывающего фермента между вариантами опыта не выявлено. Это говорит о том, что для получения фермента с высокой активностью штамм Ч-03 можно культивировать на средах, где в качестве источника углерода может быть мальтоза, глюкоза и сахароза.

Лучшим источником углерода для биосинтеза молоко-свертывающего фермента штаммом А-Дон-02 *I. lacteus* являлась сахароза, активность фермента увеличивалась в 2 – 2, 3 раза по сравнению с активностью на глюкозо-пептонной среде. В свою очередь при культивировании штамма на питательной среде с мальтозой активность фермента была на уровне контрольного варианта (глюкоза). Таким образом для штамма А-Дон-02 лучшими источниками углерода для биосинтеза сычужного фермента являются сахароза, мальтоза и глюкоза.

Максимальная активность молоко-свертывающего фермента у культурального фильтрата штамма В-04 *I. lacteus* наблюдалась на среде с сахарозой и несколько ниже на среде с глюкозой.

Полученные данные показывают, что исследованные штаммы *I. lacteus* требуют разные источники углеродного питания для биосинтеза сычужного фермента.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ МОНОСПОРОВЫХ КУЛЬТУР ИЗОЛЯТА *IRPEX LACTEUS* FR.

Бойко С. М.

Донецкий национальный университет, Донецк

Сапротрофный дереворазрушающий гриб *Irpex lacteus* Fr. имеет широкое географическое распространение. Морфологические, физиолого-биохимические особенности данного гриба изучены в достаточной мере, что нашло свое отражение в большом количестве научных работ, использовании гриба в биотехнологических процессах для нужд различных отраслей

народного хозяйства. Однако данный гриб недостаточно изучен в популяционно-генетическом плане, что вызывает интерес у микологов разных стран. Одним из способов изучения генетических особенностей, является электрофоретический метод, позволяющий изучать изоферментные системы гриба *I. lacteus* и использовать их в качестве маркеров.

Целью нашего исследования было изучить разнообразие некоторых внутриклеточных изоферментов моноспоровых культур полученных из дикариотического изолята дереворазрушающего гриба *Irpex lacteus* Fr. Полученные моноспоровые культуры гриба выращивались на стандартной глюкозо-пептонной питательной среде в течении 14 суток. Супернатант для исследования, содержащий ферменты, получали путем гомогенизации мицелия с последующим этапом экстракции и центрифугирования. Для разделения белков использовали электрофоретический метод в полиакриламидном геле. Гистохимическое проявление зон активности осуществляли для следующих ферментов: алкогольдегидрогеназа (Adh) (КФ 3. 4. 11. 2), глутаматдегидрогеназа (Gdh) (КФ 1. 4. 1. 2), пероксидаза (Per) (КФ 1. 11. 1. 7), супероксиддисмутаза (Sod) (КФ 1. 15. 1. 1), эстераза (Est) (КФ 3. 1. 1. 1).

В результате изучения внутриклеточного разнообразия ферментов и их изоформ у моноспоровых культур *I. lacteus*, удалось установить, следующее: по ферменту Adh удалось четко идентифицировать 4 изоформы которые с различной интенсивностью и частотой проявляются у моноспоровых культур. Форма Adh3 наблюдается у 100% изученных культур. Следует отметить, что у дикариотической культуры наблюдается только 2 зоны активности фермента, Adh1 (слабая) и Adh3 (интенсивная).

Активность фермента Gdh у моноспоровых культур проявляется максимум в виде 3 зон с различной частотой встречаемости. Для изоформы Gdh2 характерна практически 100% встречаемость. При сравнении электрофоретической подвижности зон Adh3 и Gdh2 выявлено их совпадение, что может свидетельствовать, скорее всего, о низкой субстратной специфичности данных дегидрогеназ.

Для фермента Per удалось выявить 3 изофермента, которые выявлялись у всех изученных моноспоровых и у дикариотической культур. Причем изофермент Per1 показал очень высокую электрофоретическую подвижность. Похожая картина наблюдается при изучении фермента супероксиддисмутаза. Фермент Sod был выявлен у всех изученных культур, но проявлялся в виде единственной зоны.

Из всех изученных ферментных систем наибольшее разнообразие изоформ отмечено для эстеразы. Для дикариотической культуры выявлено 8 зон активности (6 четко регистрируемых и 2 слаборегилируемые). В свою очередь у моноспоровых культур обнаружено различное число изоформ эстеразы. Однако для всех их отмечена общая особенность: все исследуемые моноспоровые культуры показали наличие форм Est6, Est7, Est8 с низкой электрофоретической подвижностью.

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МИКРОМИЦЕТОВ

Гудзенко Е. В., Борзова Н. В., Варбанец Л. Д.

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного, Киев

В последние годы во многих технологических процессах амилолитические ферменты микроорганизмов все чаще вытесняют и заменяют ферменты растительного и животного происхождения. Это объясняется как высокой продуктивностью микроорганизмов по сравнению с растениями и животными, так и дешевизной и доступностью сырья. Амилолитические ферменты, которые применяются в различных процессах переработки крахмала, на сегодня составляют почти треть рынка энзимов. α -Амилаза и глюкоамилаза относятся к наиболее востребованным в промышленных технологиях ферментам, они широко используются на пищевых, спиртовых и текстильных производствах. В процессе осахаривания муки или крахмала на начальной стадии разваривания под действием α -амилазы образуются олигомерные продукты — мальтотриоза, мальтотетроза, мальтопентоза, мальтогексоза и мальтоза. Добавление на стадии осахаривания глюкоамилазы позволяет добиться практически полного гидролиза этих олигосахаридов до глюкозы.

Исследования субстратной специфичности амилолитических ферментов позволяют использовать их с максимальной эффективностью. Нами была изучена специфичность действия двух α -амилаз из *Bacillus subtilis* и *Aspergillus oryzae*, а также двух препаратов глюкоамилаз из *Aspergillus niger*. Активность α -амилаз определяли йодным методом (37 и 50 °С, рН 6, 0), а глюкоамилаз — глюкозо-оксидазным методом (37 °С, рН 4, 7). При оценке спектра субстратной специфичности количество восстанавливающих сахаров, образовавшихся в результате гидролиза поли- и олигомерных субстратов, определяли методом Шомоди-Нельсона. α -Амилаза из *A. oryzae* характеризовалась более широким спектром активности по типу связи, чем бациллярная, гидролизует кроме α -1, 4-связей, также и α -1, 6-связи в пуллулане и α -1, β -2-связи сахарозы. Следует отметить, что почти 95 % общей каталитической активности исследованных амилаз приходилось на гидролиз полисахаридов, как нативных, так и модифицированных. По скорости гидролиза ферментами субстраты можно разместить в таком порядке: растворимый крахмал > картофельный крахмал > кукурузный крахмал > амилоза > амилопектин гликоген > сахароза > мальтоза пуллулан.

Спектр специфической активности глюкоамилаз был несколько шире, чем у α -амилаз. С максимальной скоростью глюкоамилазы *A. niger* гидролизировали сахарозу (0,4 и 0,6 Е/мл), растворимый крахмал (0,29 и 0,33 Е/мл) и п-нитрофенил- α -Д-глюкопиранозид (0,08 и 0,22 Е/мл). Также обе глюкоамилазы расщепляли гликоген и амилопектин, и, с гораздо меньшей скоростью, такие субстраты как кукурузный и картофельный крахмалы, декстраны Т-20 и Т-500, трегалозу и амилозу. Отмечено отсутствие активности по отношению к пуллулану, мальтозе и паннозе.

В целом, можно сделать вывод, что изученные ферменты являются типичными α -амилазами и глюкоамилазами. Первые демонстрируют повышенное сродство по отношению к высокополимерным субстратам разной природы (скорость гидролиза была на порядок выше, чем при использовании низкомолекулярных и разветвленных субстратов), изученные же глюкоамилазы эффективнее гидролизировали дисахариды и синтетический субстрат.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о высоком технологическом потенциале грибных амилотических ферментов для внедрения их в процессы ферментативного гидролиза крахмалсодержащего сырья с целью получения глюкозных сиропов разного назначения.

МЕХАНИЗМ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *PENICILLIUM CANESCENS*

Борзова Н. В.

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного, Киев

Исследования механизмов термоинактивации ферментов представляют особую важность при выборе наилучших путей термостабилизации белка. Эти данные позволяют, как очертить область применения ферментов, так и расширить ее, подобрав условия стабилизации энзима. Изучение кинетики и механизма термоинактивации α -галактозидазы *Penicillium canescens* проводили в диапазоне температур 50 — 65 °С при рН 5, 7. Была определена и оценена зависимость этого процесса от степени очистки фермента, для чего использовали как культуральную жидкость продуцента, так препараты б-галактозидазы разной степени очистки. Было показано, что уровень активности напрямую зависит от времени инкубации фермента при заданной температуре. Была отмечена реинаktivация фермента при 40 °С через 5-24 часа (на 10-40 %) после инаktivации при 55 и 60 °С. При 65 °С, отмечалась термоденатурация α -галактозидазы, связанная с необратимыми конформационными изменениями белковой структуры. Эти результаты указывают на существование, по крайней мере, трех различных стадий в процессе инаktivации: активный (нативный) фермент, дезактивированный фермент, способный к реинаktivации, и необратимо инаktivированный фермент. Не было отмечено заметной разницы в скорости и степени инаktivации α -галактозидазы при 55 и 65 °С при различных концентрациях фермента. Однако при 60 °С препарат с большей концентрацией (11 Е/мл) проявлял большую термостабильность, чем препарат б-галактозидазы в концентрации 0,9 Е/мл. Также показано, что присутствие 0,5 % БСА оказывало значительный защитный эффект на фермент при 55 и 60 °С (на 25 и 20 % соответственно). Выраженный защитный эффект от термоинаktivации на протяжении 3 часов оказывали также олигосахариды мелибиоза, раффиноза и стахиоза (на 50, 15 и 28 % соответственно), которые являются субстратами многих б-галактозидаз. Можно предположить, что протективный эффект данных субстратов связан с ингибированием образования обратимо инаktivированной формы фермента. Нами не отмечено стабилизационного эффекта глутарового альдегида, напротив, термоинаktivация в его присутствии проходила быстрее. Вероятно, образование жесткой структуры белка вызывало снижение реакционной способности активного центра фермента. Присутствие глицерина в концентрациях от 20 до 40 % позволяет увеличить время термоинаktivации α -галактозидазы *P. canescens* более, чем в два раза, как при 55 °С (до 6 часов), так и при 60 °С (до 3 часов). В результате анализа кинетических кривых термоинаktivации б-галактозидазы *P. canescens* установлено, что при разных температурах реализуются различные механизмы инаktivации фермента. Так при 55 °С термоинаktivация проходит по диссоциативно-ассоциативному механизму ($k_{дис} = 1,7 \times 10^{-4}$, $k_{ас} = 2,8 \times 10^{-4}$, $k_{ден} = 3,61 \times 10^{-5}$, $K_{дис} = 0,59$), при 60 °С — по механизму последовательных превращений первого порядка, при более высоких температурах процесс проходит согласно реакции первого порядка по механизму необратимой денатурации ($k_{ден} = 2,97 \times 10^{-5}$, $K_{дис} = 98$).

Таким образом, изученная нами α -галактозидаза *P. canescens* представляет собой весьма эффективный катализатор, который может найти применение в различных научных и практических технологиях. Его высокая специфичность по отношению к α -1,3-связанной галактозе, показанная ранее, делает этот фермент ценным инструментом в процессах биотрансформации крови, высокая активность и стабильность в условиях тепловой инаktivации позволяет эффективно использовать фермент в самых разных технологических процессах. Полученные результаты помогут выработать наиболее приемлемую стратегию стабилизации олигомерного белка путем подавления первичных обратимых стадий инаktivации.

ОКСИЛИПИНЫ ГРИБОВ, ИХ ПОЛУЧЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

Гроза Н. В.¹, Мягкова Г. И.¹, Белозерская Т. А.²

¹ МГА тонкой химической технологии имени М. В. Ломоносова, Москва

² Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва

Окисление липидов в клетке, происходящее спонтанно под действием активных форм кислорода или при участии ряда ферментов, является источником авторегуляторных молекул, обеспечивающих адаптацию грибов к условиям существования. В результате окисления жирных кислот первоначально образуются гидропероксиды, дальнейшее преобразование которых приводит к появлению множества разнообразных продуктов, включая их стереоизомеры. Оксигенированные метаболиты компонентов липидов получили общее название оксилипины. В процессе биосинтеза оксилипинов могут принимать участие различные ферменты – диоксигеназы, липоксигеназы, липазы, пероксигеназы, лиазы, алленоксидсинтазы, алленоксидциклазы. Функции оксилипинов, как и их структура, весьма разнообразны. Так, образование и состав psi- факторов у *A. nidulans* регламентирует соотношение полового и бесполого размножения, а также играет важную роль при инфицировании семян растений (Tsitsigiannis et al., 2005). Кроме того, у *A. flavus* метаболиты жирных кислот, образующиеся при участии липоксигеназ (LOX), регулируют развитие гриба в зависимости от плотности культуры или доступности субстрата. Оксилипины обнаружены у многих грибов, например, *Aspergillus spp.* (*A. nidulans*, *A. niger*, *A. parasiticus*) (Tsitsigiannis et al., 2004), *Alternaria tomato* (Hyeon, 1976), *Sclerotinia fructicola* (Katayama, Marumo 1978), а также целого ряда других грибов (Andreou et al., 2009). Широко распространены гидроксильные производные насыщенных жирных кислот у грибов (Kock et al., 1994). Например, 3-гидроксилипины были идентифицированы на поверхности вегетативных клеток *Saccharomyces cerevisiae*, где образованные ими структуры способствовали агрегации клеток в виде хлопьев. Состав этих оксилипинов определялся как 3-гидрокси-C8:0 и 3-гидрокси-C10:0 (Kock et al., 2000).

Для изучения биологической роли оксилипинов грибов в условиях стресса, в том числе в отношениях хозяин-патоген, были разработаны методы химического, ферментативного, микробиологического получения гидрокси- и дигидроксипроизводных ненасыщенных жирных кислот (3-НЕТЕ, 3, 18-DiHETE и др.) и их изотопно-меченных аналогов. Гидроксиполиеновые кислоты применяли для исследования их влияния на жизненные функции грибов и на процессы образования вторичных метаболитов. Было показано, что в дрожжах *S. albicans* образуются дигидрокси- и тригидроксиполиеновые кислоты из субстратов – моногидроксиполиеновых кислот. При этом наблюдалось повышение агрегации гиф и концентрации нитевидных образований в зрелой культуре *S. albicans*. При исследовании влияния 3-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты на морфологию и жизненные процессы гриба *N. Crassa* было обнаружено, что микромолярные концентрации оксилипина снижают скорость роста гиф, усиливая при этом их агрегацию, и ингибируют нормальное спорообразование.

Таким образом, было выявлено, что экзогенные длинноцепочечные жирнокислотные метаболиты влияют на изменение жизненных процессов и являются прооксидантными мессенджерами у грибов различных видов.

ПРОЯВЛЕНИЯ АПОПТИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА У ДРОЖЖЕЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РОСТА

Дерябина Ю. И., Исакова Е. П.

Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН

Проблема изменения физиологии клетки в ходе стрессорных воздействий не теряет своей актуальности на протяжении многих десятков лет. Низшие эукариоты – дрожжи – являются прекрасным инструментом для ее изучения. Возможность создания разнообразных клеточных моделей и относительная простота применения к ним молекулярно-генетических методов делает дрожжевую клетку чрезвычайно привлекательным объектом многоплановых исследований в области физиологии и биохимии стрессов. В задачи представленных исследований входило определение степени нарушения жизнеспособности дрожжевых клеток в ходе продолжительного периодического культивирования (условия «эндогенного» гиперокисления). В работе использовали штаммы мезофильного дрожжеподобного гриба *Endomyces (Dipodascus) magnusii* и метилотрофных дрожжей *Pichia methanolica*. На культурах исследовали различные модели, позволяющие изучать основные проявления адаптивного ответа дрожжей на окислительный стресс, возникающий в процессе роста и старения дрожжевой культуры. Изучение проявлений «эндогенного» окислительного стресса проводили с использованием метода детекции нарушений структуры ДНК окрашиванием бромистым этидием с последующим анализом клеток под флуоресцентным микроскопом. Результаты наших исследований показали наличие характерных проявлений апоптического фенотипа (маргинация и конденсация ядерного хроматина) в клетках обеих культур, находящихся в стадиях перехода в стационарную фазу роста (12-13 ч. культивирования) и глубокой стационарной фазы (43 ч. культивирования). Дрожжевые клетки, находящиеся в стадии логарифмического роста, не проявляли подобных признаков нарушения клеточной интактности и морфологии ядра. Интенсивность флуоресценции возрастала у дрожжей по мере продолжительности культивирования, что свидетельствовало о наступлении начальных этапов программируемой клеточной смерти.

Работа выполнялась при поддержке грантов РФФИ 08-04-01691-а «Устойчивость к окислительному стрессу, старение и запрограммированная смерть в разных систематических группах живых организмов» и РФФИ 09-04-90360-Ю-Осет_а «Биомедицинские и генетические аспекты исследований механизмов стрессового и антистрессового воздействия на организм».

ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОБРАЗЦОВ МИКСОМИЦЕТОВ РАЗНОГО ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Дудка И. А., Анищенко И. Н., Терентьева Н. В., Кривомаз Т. И.
Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

Для установления влияния топических связей миксомицетов разного географического происхождения на внутривидовую изменчивость их биометрических признаков исследовались диаметр спор и ширина капиллиция образцов миксомицетов *Arcyria cinerea*, *A. denudata*, *Metatrichia vesparium* и *Cribraria cancellata* из горных регионов Кубы, Мексики и Франции, лесов Украины и Польши и полупустынь Казахстана. Образцы были собраны на разных древесных субстратах, исследование морфологии спорофоров миксомицетов проводилось с помощью светового микроскопа "GS M27257" и стереомикроскопа "Olympus VT-II 205816". Для каждого образца было проведено по 100 измерений обоих исследуемых признаков.

Изменчивость признаков определялась методами кластерного анализа, многомерного дискриминантного анализа с учетом соответствующих показателей таксономического различия, дендрограммы сходства были построены по методам простой и комплексной связи и методу Уорда.

Анализ дендрограмм показал следующие результаты. Для *A. cinerea* наиболее близкими оказались образцы из Кубы и Франции, образовавшие отдельный кластер на расстоянии 0, 18, и Мексики и Польши (расстояние 0, 22), а отдаленными по обоим признакам оказались образцы из Украины и Казахстана. Для *C. cancellata* наиболее близкими по морфометрическим признакам оказались образцы из Франции и Мексики (0, 12). Возможно, они были собраны на подобных типах субстратов, которые представлены опадом хвойных деревьев. Максимально отдаленной оказалась группа образцов *C. cancellata* из Кубы (0, 7), что объясняется, скорее всего, специфическим субстратом: мертвыми остатками пальмы *Roystonea regia*, произрастающей в тропических горных лесах. Дендрограмма сходства *M. vesparium* продемонстрировала четкое распределение всех исследуемых образцов на три отдельных кластера: объединились образцы из Украины и Мексики (0, 18), Кубы и Польши (0, 2), Казахстана и Франции (0, 56). Для *A. denudata* образцы из Казахстана и Мексики образовали кластер, который на значительном расстоянии (1, 36) отдален от всех других групп образцов. Наиболее близкими оказались образцы из Украины и Польши (0, 3).

Статистический анализ морфометрических признаков исследованных видов миксомицетов свидетельствует о некотором разбросе средних значений размеров спор для большинства мест произрастания. Установлено, что средний диаметр спор в образцах *A. cinerea* и *A. denudata* незначительно колеблется в пределах 6, 5-7, 2 мкм. Наименьший диаметр спор был отмечен у образцов *C. cancellata* из Польши и Украины, соответственно 4, 5 и 5, 9 мкм, а наибольший - у образцов *M. vesparium* из всех мест сбора, который варьирует в пределах 8-8, 8 мкм и достигает 11 мкм у образцов из Франции. Среднее значение ширины нитей капиллиция у образцов *A. cinerea* и *A. denudata* колеблется в пределах 2, 4-3, 5 мкм, у образцов *C. cancellata* и *M. vesparium* его значение больше и колеблется в пределах 4, 08-6, 2 мкм.

Одновременно наблюдалось высокая, не зависящая от географического расположения места сбора, стабильность формы спор. У большинства образцов исследованных миксомицетов споры имеют сферическую форму, как, например, у *C. cancellata*. У остальных исследованных видов форма спор эллипсоидальная, но приближается к сферической.

В целом изменчивость морфометрических показателей исследованных структур 4-х видов миксомицетов не показала четкой зависимости от географического расположения места сбора образцов. Скорее всего, она определяется микроусловиями (температура, влажность, тип субстрата) конкретного локалитета.

СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ В РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ СИСТЕМЫ TRITICUM AESTIVUM - SEPTORIA NODORUM BERK.

Заикина Е. А., Бурханова Г. Ф., Яруллина Л. Г.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

Септориозы являются наиболее распространенными заболеваниями зерновых культур, снижение урожайности от которых могут достигать 30%. Как известно, для защиты растений от болезней широко используются химические средства, подавляющие рост и развитие патогенных микроорганизмов. Однако интенсивное применение пестицидов биоцидной природы приводит, с одной стороны, к химическому загрязнению экосистем, и с другой - к появлению высокорезистентных к пестицидам форм патогенов. В связи с этим актуальными становятся исследования, направленные на расшифровку молекулярных механизмов формирования устойчивости растений к патогенам и на поиск различных молекул для индуцирования иммунного ответа в растительных тканях.

Процесс распознавания патогенов в растениях осуществляется с помощью сигнальных систем, которые определяют реакцию клеток на различные химические и физические воздействия. Число веществ, выполняющих функции медиаторов сигнальных систем, постоянно возрастает. Такую роль могут выполнять жасмоновая (ЖК)

и салициловая (СК) кислоты, окись азота, перекись водорода и некоторые другие соединения. Эффективными элиситорами защитных реакций растений являются многие природные олигосахариды, в первую очередь структурные компоненты клеточных стенок грибов (гликан, хитин, хитозан) и растений (олигогалактоуриды). Препараты хитина и низкомолекулярного хитозана подавляют рост грибов в культуре *in vitro*. Элиситорные свойства хитина проявляются в усилении синтеза фитоалексинов, в повышении активности хитиназы, β -глюканазы, ФАЛ, ингибиторов протеиназ, пероксидазы. В сельскохозяйственной практике хитозан используется для повышения урожайности культурных растений, за счет повышения их устойчивости к болезням. С использованием ДНК-чипов у *Arabidopsis thaliana* выявлено до 60 генов, реагирующих на добавление хитина. Среди них быстрой (10-30 мин) и высокой экспрессией характеризовались гены, ответственные за синтез регуляторных белков, участвующих в транскрипции и передаче информации.

Учитывая гемибиотрофный тип паразитизма *s. Nodorum* значительный интерес представляют исследования воздействия ск, жк, хос на формирование защитного ответа с участием афк. В данной работе анализировали 7-ми суточные проростки пшеницы *t. Aestivum* l. Сорта башкирская 24. У части проростков пшеницы срезали листья и помещали их во влажную камеру на фильтровальную бумагу, смоченную в растворе бензимидазола (40 мг/л). Отрезки листьев инокулировали суспензией пикноспор *s. Nodorum* из расчета 10^6 спор/мл. Хос (1 мг/л), ск и жк в концентрациях 0.05 мМ и 10^{-7} м использовали для замачивания семян пшеницы. Через 24, 48, 72 ч после инфицирования в листьях определяли концентрацию H_2O_2 и активность оксидоредуктаз.

Результаты исследований показали, что предобработка растений пшеницы хос, ск и жк снижала степень развития *s. Nodorum* в растительных тканях. Сигнальные молекулы в различной степени усиливали продукцию H_2O_2 в листьях, оказывали модулирующее действие на активность оксидоредуктаз и усиливали экспрессию гена анионной пероксидазы, что положительно коррелировало с формированием устойчивости к грибу. Полученные данные позволяют говорить о том, что в растениях существуют дифференциальные пути индуцирования защитных реакций, в которых задействованы афк.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке АВЦП «развитие научного потенциала высшей школы» №113/09.

ДРОЖЖИ – ПЕРСПЕКТИВНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТАРЕНИЯ НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

Звягильская Р. А.

Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва

Обзор. Старение – это универсальное явление, результат сложных генетических и эпигенетических запрограммированных процессов, запускаемых разными факторами стресса (окислительным стрессом, температурным шоком, доступностью питательных веществ и др.). Хотя старение и является многофакторным процессом, в основе которого лежат разные механизмы, общим для всех старых клеток эукариот является их повреждение в результате накопления поврежденных макромолекул и снижения митохондриальной активности. Постоянное удаление “отработанных” компонентов и их замена вновь синтезированными способствует поддержанию клеточного гомеостаза и отодвигает процесс старения. Рассмотрена роль лизосом как главной внутриклеточной протеолитической системы, ответственной за деградации почти всех долго-живущих белков. Деградации поврежденных структур лизосомами предшествует макроаутофагия (“самопоедание”) и аутофагия, опосредованная шаперонами. В процесса аутофагии долго-живущие белки и другие макромолекулярные агрегаты и поврежденные внутриклеточные органеллы вначале поглощаются аутофагосомами. Сами аутофагосомы имеют ограниченную способность деградировать и поэтому должны образовывать комплексы (сливаться) с лизосомами. В отличие от макроаутофагии, аутофагия, опосредованная шаперонами, не требует образования промежуточных везикул и цитозольные белки, распознаваемые на этом пути, прямо транслоцируются в лизосомы. С возрастом скорость процесса образования аутофагосом и эффективность слияния аутофагосом с лизосомами уменьшается. Кроме того, внутри лизосом увеличивается концентрация свободных радикалов и пигментов “старости”, что также уменьшает эффективность их работы. Открытие генов, вовлеченных в процесс аутофагии и создания сети аутофагосома/лизосома, позволяет выявить различные молекулярные пути, которые могут участвовать в процессах старения и увеличения продолжительности жизни.

Исследования последних лет привели к осознанию того, что программы старения у дрожжей и высших эукариотических организмов имеют общие элементы и что дрожжи, простейшие эукариоты, растущие с высокой скоростью на средах простого состава, имеющие относительно малые размеры хорошо изученного генома, отличающиеся легкостью изменения физиологического и генетического статуса, являются чрезвычайно удобной моделью не только для функционального анализа уже известных белков, участвующих в старении, но и для выявления новых, а также для выявления соединений (например, спермидин, митохондриально-направленные липофильные катионы с делокализованным зарядом, обладающие антиоксидантной активностью, слабые разобщители и др.), способствующих увеличению продолжительности жизни. Предполагается проследить взаимосвязь некоторых из этих соединений с процессом аутофагии.

Работа поддержана РФФИ (грант 09-04-01238).

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА КАК ИНДИКАТОРА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У МИКРОМИЦЕТОВ

Ильин Д. Ю., Лихачев А. Н.

Пензенская ГСХА, Пенза, МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

Одним из приемов биомониторинга состояния почв служит изучение изменения видового состава сообщества почвенной микрофлоры. Однако подобные исследования не являются достаточно результативными при необходимости индикации действия высокоспецифичных или слабовыраженных факторов, когда на первый план выходят высокочувствительные к конкретному фактору виды микроорганизмов. Индикатором химического стресса, вызванного воздействием тяжелых металлов, у микромицетов может служить продукт перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид. Цель настоящей работы – изучение возможности использования такого показателя как содержание малонового диальдегида в мицелии чувствительных видов почвенных микромицетов в качестве индикатора химического загрязнения.

Объектами наших исследований стали культуры таких видов как *Penicillium brevicomactum*, *P. cyclospium*, *P. purpurogenum*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata*.

Было изучено воздействие растворимых солей тяжелых металлов: свинца, хрома, кадмия и цинка, вносимых в питательную среду для глубинного культивирования. Опыт проводили в трех повторностях. Концентрации тяжелых металлов в пересчете на элемент составляли 0, 1 мМ, 0, 5 мМ, 1 мМ и 5 мМ. После 5 суток культивирования определяли окислительный статус мицелия. Концентрацию малонового диальдегида устанавливали фотометрически по окрашенному продукту, образующемуся в ходе реакции определяемого вещества с тиобарбитуровой кислотой (Стальная, Гаришвили, 1977).

Выявлена неоднозначная реакция изученных культур на внесение в среду солей тяжелых металлов в разных концентрациях. Было установлено наличие окислительного стресса у исследованных видов при добавлении в среду концентраций солей, превышающих 0, 5 мМ. Исключение составило внесение цинка, его токсичное действие для всех культур проявилось только в высоких концентрациях (5 мМ). Это, по-видимому, объясняется эссенциальностью цинка для микромицетов (Беккер, 1988). Наиболее чувствительными к прочим изученным солям тяжелых металлов оказались виды *F. moniliforme* и *A. alternata*. Обнаружены высокие концентрации малонового диальдегида (от 290 до 360 мкмоль/г сырой массы, в зависимости от вида и металла) в их мицелии, которые превышали средние контрольные показатели у этих видов (170 и 230 мкмоль/г сырой массы, соответственно) уже в концентрации солей хрома, свинца и кадмия 0, 1 мМ, и еще более высокие (от 385 до 580 мкмоль/г сырой массы) – при концентрациях 0, 5 мМ и 1 мМ. В концентрациях элементов на уровне 5 мМ развития мицелия этих видов не отмечалось. Виды рода *Penicillium* обладают относительной толерантностью к воздействию токсикантов подобного рода: их мицелий медленно развивался при концентрации хрома в среде до 5 мМ, другие элементы в этой концентрации угнетали развитие мицелия. Внесение солей свинца в концентрации 1 мМ повлекло за собой образование малонового диальдегида в значительном объеме у видов рода *Penicillium* (от 230 до 315 мкмоль/г при контрольных показателях от 160 до 180 мкмоль/г сырой массы). Отмечена повышенная чувствительность *P. purpurogenum* к внесению в питательную среду солей кадмия и свинца. Содержание малонового диальдегида в мицелии этого вида при содержании токсикантов от 0, 5 мМ было от 290 до 300 мкмоль/г, что выше контрольных значений (175 мкмоль). Более высокая устойчивость к токсикантам у представителей этого рода определяется, вероятно, экологической пластичностью. В перспективе предполагается выделение групп видов и штаммов микромицетов по степени чувствительности к конкретным поллютантам, определяемой по уровню накопления малонового диальдегида.

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ПОЛИФОСФАТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ФОСФОРНОГО И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА У ДРОЖЖЕЙ

Кулаковская Т. В., Вагабов В. М., Томашевский А. А., Бреус Н. А., Кулаев И. С.

Институт Биохимии и Физиологии Микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН, Пущино

Неорганические полифосфаты, линейные полимеры ортофосфорной кислоты, выполняют в клетках микроорганизмов разнообразные функции, в том числе участвуют в гомеостазе фосфорных соединений и энергии. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* полифосфаты локализованы в различных клеточных компартаментах клетки, в том числе в митохондриях, вакуолях, и ядрах, однако основным местом локализации тех из них, которые служат фосфорным резервом, является цитозоль. Эти полифосфаты наиболее эффективно накапливаются при лимитировании по азоту, а затем и по углероду, но в присутствии солей магния. При этом в цитоплазме образуется большое количество мелких электроноплотных гранул.

С использованием мутантных штаммов с инактивированными генами *PPX1* и *PPN1*, кодирующими экзополифосфатазы, показано, что в отсутствие этих двух ферментов, отщепляющих фосфат с конца полимерной цепи, рост клеток *S. cerevisiae* на фосфат-дефицитной среде не нарушается. Это связано с тем, что система использования полифосфатов при дефиците фосфора в среде включает эндополифосфатазу, фермент, расщепляющий длинноцепочечные полифосфаты на более короткие молекулы, которые уже могут расщепляться другими ферментами, в том числе пирофосфатазами.

Содержание отдельных фракций неорганических полифосфатов у дрожжей находится в зависимости от источника углерода. Относительно низкомолекулярная фракция со средней длиной цепи около 15 фосфатных остатков в большей степени накапливается в условиях преобладания гликолиза, тогда как наиболее высокополимерная фракция со средней длиной цепи свыше 200 фосфатных остатков в наибольшей степени накапливается в условиях окислительного фосфорилирования.

Неорганические полифосфаты являются активными участниками ростовых процессов у дрожжей и вовлечены в общий энергетический поток в качестве дополнительного источника энергии. Динамика накопления полифосфатов у дрожжей после фосфорного голодания носит двухфазный характер, независимо от преобладания гликолиза или окислительного фосфорилирования. На первой стадии происходит накопление полифосфатов, тогда как далее, несмотря на избыток фосфата, наблюдается уменьшение их содержания, причем это уменьшение затрагивает различные фракции этих полимеров не в одинаковой степени. В наибольшей степени уменьшается содержание наиболее длинноцепочечных полифосфатов. Их уровень существенно снижается через 1-1,5 часа при росте в условиях избытка фосфата как на глюкозе, так и на этаноле. Это указывает на то, что данные фракции полифосфатов представляют собой в первую очередь резерв энергии, используемый для поддержания высокой скорости роста.

Нарушение синтетазной функции митохондриальной АТФазы, вызванное мутацией в гене *ATP22*, приводит к уменьшению накопления неорганических полифосфатов на стационарной стадии роста у дрожжей при культивировании на глюкозе. Нарушение функционирования АТФазы вакуолярной мембраны при мутации по гену, кодирующему одну из ее субъединиц, приводит к резкому уменьшению содержания полифосфатов независимо от стадии роста, причем в наибольшей степени уменьшается содержание длинноцепочечных фракций. Таким образом, между обменом полифосфатов и клеточной биоэнергетикой у дрожжей наблюдается тесная взаимосвязь.

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СКЛЕРОЦИЕВ СМОРЧКАМИ НА ТВЕРДЫХ ЕСТЕСТВЕННЫХ СРЕДАХ

Кутковая О. В.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев

Несмотря на продолжительные исследования представителей р. *Morchella* Dill. ex Fr., получение плодовых тел в контролируемых условиях является неустановленным и случайным (Schmidt, 1983). Поняне немного известно относительно условий плодоношения сморчков и в природе. Непредсказуемость и короткая продолжительность плодоношения данных видов мешает их детальным исследованиям *in vivo*. А невозможность достижения последовательного плодоношения в лабораторных условиях побуждает исследователей к подробному изучению сморчковых грибов, особенно их жизненного цикла (Volk, Leonard, 1989). Первым этапом, как известно, в инициации плодоношения сморчков является массовое получение склероциев. Т. J. Volk и Т. J. Leonard (1989) при подборе субстратов для получения склероциев выяснили, что такие субстраты как пшеница, рожь, овес, кукуруза, кукурузная шелуха и солома оказывают содействие формированию этих структур. R. Amir с соавторами (1992) и A. Philippoussis и C. Balis (1995) сообщают о формировании склероциев на комплексных средах, состоящих из питательно богатых и бедных сред.

В связи с этим нами исследовано образование склероциев тремя штаммами (СС-КР, MS-1, СС-ЗО-2. 05) сморчка степного (*Morchella steppicola* Zerova) на средах, состоящих из смеси питательно богатого (зерно пшеницы, проса, сои) и бедного (торф, перлит) субстратов.

В результате проведенных исследований установлено, что все исследуемые субстраты мицелий обрастал за 8-14 суток. Смесь пшеницы с торфом и пшеницы с перлитом мицелий зарастал быстрее, чем другие субстраты (за 8 – 9 суток). Наиболее медленное развитие происходило на смеси сои с перлитом и сои с торфом (за 14 суток). Почти все субстраты мицелий обрастал полностью. Лишь среда, состоящая из сои с перлитом, зарастала на 80%. Иницирование склероциев происходило на 8-10 сутки в зависимости от субстрата и штаммовых особенностей. Склероции штамма MS-1 наиболее быстро начинали формироваться на смеси сои и торфа, склероции штамма СС-КР - на смесях пшеницы с перлитом, сои с перлитом и проса с перлитом, склероции штамма СС-ЗО-2. 05 - на субстратах пшеницы с перлитом и проса с перлитом. За балльной оценкой самым благоприятным субстратом для формирования склероциев сморчком степным является смесь зерна пшеницы и торфа, хуже всего образовывались склероции на субстрате из сои и перлита. Для использования в качестве питательно бедного компонента среды лучше использовать торф, чем перлит. При определении особенностей расположения склероциев установлено, что в смеси сои и торфа склероции образуются лишь в слое торфа. При использовании субстрата из сои и перлита склероции в основном формируются между слоем перлита и стенками банки. В смеси проса и торфа склероциальные структуры массово образуются между слоями субстратов, в пласте торфа формируется больше склероциев, чем в слое проса. Довольно часто можно наблюдать образование склероциев между субстратом и стенками банки. В субстрате из проса и перлита склероции в основном образовывались в просе, в слое перлита склероции формируются лишь при контакте со стенками банки. В смеси пшеницы с торфом склероции массово формируются на границе пластов пшеницы и торфа, в слое пшеницы склероции сливаются с зерном в общую массу. В торфе формируются обособленные склероции, диаметр которых достигает 1 см и больше. В субстрате из пшеницы и перлита большее количество склероциев формируется в пласте

пшеницы, однако крупных экземпляров не наблюдалось, в перлите формируются мелкие склероции ($d < 1$ см) и лишь при контакте со стенками банки.

Таким образом, наиболее благоприятным для образования склероциев является субстрат, в котором в качестве питательно богатого компонента используется пшеница, а в качестве питательно бедного – торф.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА И РАЗВИТИЯ *ASPERGILLUS FUMIGATUS* ПРИ АНОКСИИ

Миненко Е. А.

Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, Мюнхен, Германия

В последние десятилетия наблюдается значительный рост интереса исследователей к патогенным грибам, ранее не имевшим большого медицинского значения. К ним относится, в первую очередь, плесневый гриб *Aspergillus fumigatus*. Этот гриб является оппортунистом, способным вызывать у пациентов с ослабленной иммунной системой серьезные и часто летальные аспергиллезы. Одним из наиболее распространенных заболеваний является инвазивный аспергиллез легких. В течение инфекции *Aspergillus* вызывает обширные повреждения тканей организма за счет инвазивного роста гиф и последовательно привлекает и активирует иммунные эффекторные клетки человека. Инфекция и воспаление в легких приводит к некрозу тканей, в очагах которого обнаруживается недостаток кислорода. Известно, что приспособление к недостатку кислорода является важным фактором вирулентности у некоторых прокариотических патогенов. Однако подобная адаптация у эукариотических патогенов исследована недостаточно широко. Целью работы было обнаружение роста гриба при аноксии и исследование роли двух протеинов: NrpA и SrbA при аноксии. В работе использовали методы SDS-PAGE и Western-Blot, клонирование генов и трансформацию изучаемых штаммов грибов. Для создания условий пониженного содержания кислорода применяли устройство „Anoxomat“ (Mart Microbiology The Netherlands).

Исследования показали хорошее прорастание спор *A. fumigatus* и рост гиф при аноксии (O_2 0, 2%). Для сравнения были изучены *A. niger* и *A. giganteus*, которые показали также хорошее прорастание спор и рост гиф в аналогичных условиях. Все исследованные грибы сохраняют жизнеспособность при недостатке кислорода в течение более шести суток. При помещении уже проросших спор гриба в условия с пониженным содержанием кислорода активного роста, как и отмирания клеток, не наблюдалось. Одной из важнейших молекул для восприятия недостатка кислорода у грибов является белок SrbA. SrbA содержит два трансмембранных домена, один из которых после расщепления предположительно мигрирует в ядро, где является транскрипционным фактором. Одной из задач работы было получение моноклональных антител к белку SrbA. Полученные антитела будут использоваться в дальнейшем для изучения изменения концентрации SrbA при попадании гриба в аноксию. Вторым интересным белком является NrpA, который по некоторым данным в шесть раз больше синтезируется при гипоксии.

NrpA принадлежит к большой группе белков CipC. NrpA является малым (15kDa) цитозольным растворимым протеином, который не индуцируется различными видами стресса. Однако, как показали наши эксперименты, усиления его синтеза в условиях аноксии не происходит. Этот белок не играет существенной роли при аноксии, так как споры и гифы мутанта *Aspergillus fumigatus* Д nrpA оставались жизнеспособными более шести суток в условиях недостатка кислорода. Исследованный комплементант *Aspergillus fumigatus* Д nrpA + nrpA также показал свою жизнеспособность в условиях недостатка кислорода.

Дальнейшие исследования NrpA, SrbA, роста и развития *Aspergillus* при аноксии помогут понять поведение гриба в некротических тканях легкого человека и тем самым способствовать развитию знаний в области медицинской микологии.

ВЛИЯНИЕ ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ И 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА НА РОСТ *P. ADAMETZII* ЛФ F-2044. 1. 17 И ОБРАЗОВАНИЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

Михайлова Р. В., Жуковская Л. А.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Глюкозооксидаза (ГО) (β -D-глюкозо: O_2 -1-оксидоредуктаза, КФ 1. 1. 3. 4.) – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление β -D-глюкозы до β -D-глюконолактона и пероксида водорода. ГО используется в пищевой промышленности в качестве антиоксиданта и консерванта. В химической промышленности фермент применяется для получения гидрохинона, глюконовой кислоты и ее солей. ГО – незаменимый реагент в медицинской диагностике, используемый для определения содержания глюкозы в биологических жидкостях с помощью биохимических фотометров, автоматических анализаторов глюкозы, биосенсоров и тест-полосок.

В лаборатории ферментов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» отобран продуцент ГО – *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044. 1. Из ДНК данного гриба выделен и охарактеризован ген *gox*, кодирующий фермент, сконструированы векторы для экспрессии гена *gox* и трансформацией при помощи метода электропора-

ции получен рекомбинантный штамм *P. adametzii* ЛФ F-2044. 1, характеризующийся повышенным в 2, 0 раза уровнем образования ГО.

Известно, что биологически активные вещества, такие как парааминобензойная кислота и 24-эпибрассинолид, способны регулировать рост живых организмов и усиливать их устойчивость к неблагоприятным факторам. В литературе сведений о влиянии данных соединений на образование ГО грибами не обнаружено. Цель работы – изучить влияние парааминобензойной кислоты и 24-эпибрассинолида на рост *P. adametzii* ЛФ F-2044. 1. 17 и образование ГО.

Установлено, что парааминобензойная кислота (10^{-5} - 10^{-13} моль) не влияет на рост продуцента фермента. Так, к окончанию культивирования в контрольном варианте количество биомассы составило 8, 6 мг/мл, а в опытных – 7, 61-8, 4 мг/мл. Показано, что парааминобензойная кислота только в концентрации 10^{-11} моль повышала уровень образования ГО на 15% и продуцирующую способность гриба на 24%. При введении парааминобензойной кислоты в концентрациях 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-13} моль уровень образования ГО грибом составил 96, 8-103, 3%, а продуцирующей способности гриба – 99, 1-110, 8%.

Анализ влияния 24-эпибрассинолида (10^{-7} - 10^{-17} моль) на рост *P. adametzii* ЛФ F-2044. 1. 17 и образование ГО показал, что внесение данного вещества в питательную среду во всех испытанных концентрациях способствовало увеличению показателя накопления биомассы грибом на 7, 2-26, 9%. Максимальный стимулирующий эффект на рост гриба 24-эпибрассинолид оказывал в концентрации 10^{-7} моль. При этом отмечено снижение уровня образования ГО на 28, 7% и продуцирующей способности мицелия гриба на 44, 1%. Снижение концентрации вносимого вещества до 10^{-9} моль способствовало повышению уровня образования ГО грибом на 4, 15%. Максимальная стимуляция образования ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044. 1. 17 выявлена при использовании 10^{-11} моль 24-эпибрассинолида (увеличение уровня образования ГО на 28% и продуцирующей способности на 8, 1%). Дальнейшее снижение концентрации вносимого вещества до 10^{-13} моль- 10^{-17} моль не оказывало влияния на образование фермента грибом.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что парааминобензойная кислота в испытанных концентрациях не влияет на рост *P. adametzii* ЛФ F-2044. 1. 17, а 24-эпибрассинолид – стимулирует рост гриба на 7, 2-26, 9%. При использовании 10^{-11} моль парааминобензойной кислоты и 10^{-11} моль 24-эпибрассинолида получена стимуляция продукции ГО грибом (увеличение уровня образования ГО грибом на 15% и 28% соответственно).

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ КАТАЛАЗЫ *PENICILLIUM PICEUM* F-648 A3

Мороз И. В., Михайлова Р. В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Каталаза (H_2O_2 -оксидоредуктаза, КФ 1. 11. 1. 6) катализирует окислительно-восстановительную реакцию, в ходе которой пероксид водорода разлагается до молекулярного кислорода и воды. Каталаза, наряду с супероксиддисмутазой и глутатионпероксидазой, является компонентом комплексной ферментной антиоксидантной системы защиты клеток. Каталаза применяется в легкой, химической, пищевой промышленности, медицине и научных исследованиях. Фермент получают из печени млекопитающих и путем микробиологического синтеза. Поэтому поиск эффекторов синтеза фермента микроорганизмами-продуцентами является актуальной задачей, имеет теоретическую и практическую значимость.

Ранее нами отобран продуцент каталазы – мицелиальный гриб *Penicillium piceum* F-648, в результате его длительной адаптации к H_2O_2 получен штамм *Penicillium piceum* F-648 A3, отличающийся повышенным на 24 % уровнем образования каталазы (1). Известно, что экспрессия защитных ферментов, в том числе и каталазы, является адаптивным ответом клетки на окислительный стресс, индуцированный не только H_2O_2 , но и другими веществами, вызывающими свободнорадикальные процессы. Кроме того, к настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал по направленной регуляции процессов микробного синтеза с помощью редокс-потенциала (Eh). Технологически реализуемым способом изменения Eh питательных сред является внесение в их состав окислителей или восстановителей.

Цель данной работы – исследование влияния окислителей различной химической природы на образование внеклеточной каталазы *P. piceum* F-648-A3. В работе использовали гидропероксид *трет*-бутила (тБГП), феррицианид, перманганат калия и нингидрин в концентрации 0, 005-2, 0 мМ.

Установлено, что добавление в питательную среду 0, 01-0, 1 мМ тБГП практически не влияло на рост *P. piceum* F-648-A3 и синтез фермента. Наличие 1, 0-2, 0 мМ данного органического гидропероксида приводило к снижению накопления биомассы грибом и уровня образования каталазы на 2-16 % и 2-30 % соответственно. Ингибирующее действие другого органического окислителя – нингидрина проявлялось уже в концентрации 0, 1 мМ и сопровождалось угнетением роста гриба на 4 %, а биосинтеза фермента – на 18 %. Перманганат калия оказывал наибольший ингибирующий эффект: в присутствии в среде 0, 05 мМ этого соединения на 11 % уменьшалась биомасса *P. piceum* F-648 A3 и на 18 % уровень образования каталазы. В то же время установлено, что внесение в питательную среду 0, 01-0, 5 мМ феррицианида калия приводило к повышению уровня накопления фермента в культуральной жидкости и продуцирующей способности мицелия гриба на 23-52 %. Наибольший стимулирующий

щий эффект обнаружен при использовании 0, 1 мМ исследуемого окислителя. Можно предположить, что активирующее действие феррицианида калия связано с наличием железа в его составе.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что вещества, обладающие окислительными свойствами, могут как стимулировать, так и ингибировать биосинтез каталазы *P. roseum* F-648 АЗ. В качестве стимулятора образования фермента грибом целесообразно использовать 0, 1 мМ феррицианида калия.

Исследования проводились при финансовой поддержке БРФФИ (проект № Б08МЛД-018).

Литература.

1. Павловская Ж. И., Михайлова Р. В., Мороз И. В., Еремин А. Н. // Прикл. биохимии и микробиол. – 2003. – Т. 39, № 1. – С. 31–36.

СТРУКТУРА, ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ СПОРАНГИОСПОР, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СПОРОГЕННОГО МИЦЕЛИЯ *MUCOR CIRCINELLOIDES* VAR. *LUSITANICUS*

Мысякина И. С., Фунтикова Н. С.

Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского РАН, Москва

Качество спорангиоспор муконовых грибов, используемых в качестве инокулята, оказывает существенное влияние на их всхожесть, характер прорастания, морфологию образующегося мицелия, накопление биомассы гриба и количественный выход целевых продуктов. Целью работы было исследование влияния продолжительности культивирования гриба *M. circinelloides* var. *lusitanicus* 12М на структурную организацию образующихся на мицелии спорангиоспор, их жизнеспособность (всхожесть) и проявление дрожжеподобного роста при их прорастании. Кроме того, были проведены исследования состава эндогенных липидов спор, и установлены липидные характеристики, позволяющие прогнозировать характер клеточного роста при прорастании – по мицелиальному или дрожжеподобному типу.

Твердофазное культивирование гриба *M. circinelloides* var. *lusitanicus* 12М на пшеничных отрубях (и других зерновых отходах) способствовало усиленному спорогенезу и образованию спорангиоспор, способных прорастать как в виде мицелия, так и дрожжеподобных клеток. В условиях интенсивного спорогенеза происходило существенное изменение состава грибных липидов, что не способствовало формированию качественных спорангиоспор с высокой жизнеспособностью. При этом способность к прорастанию и развитию гриба в виде альтернативных морфотипов зависели от возраста спорангиоспор.

Споры 4-суточной культуры прорастали исключительно с образованием мицелия. Процент прорастания 7-суточных спор снижался незначительно, при инокуляции в жидкую среду с глюкозой наблюдались рост деформированного мицелия, а также появление дрожжеподобных клеток при снижении накопления биомассы. Споры 14-суточной культуры теряли всхожесть на 27%, большая часть жизнеспособных спор прорастала в виде дрожжеподобных клеток, а развивающийся мицелий был деформирован, вакуолизирован, наблюдалось нарушение апикального роста гиф. Увеличение возраста спорогенной культуры до 20 сут приводило к потере всхожести у 98% образуемых спор, а 25-суточные споры полностью теряли способность к прорастанию.

Методом сканирующей электронной микроскопии спорангиоспор, дающих начало мицелию, и спор, потерявших всхожесть, было показано, что спорангиоспоры 6-суточной культуры, растущей на пшеничных отрубях, способные к прорастанию в виде гиф, имеют больший объем и более ровную поверхность, чем споры 25-суточной культуры на отрубях, на поверхности которых отмечены глубокие инвагинации. Ультратонкие срезы молодых спорангиоспор 5-суточной культуры (просвечивающая электронная микроскопия) демонстрируют плотную зернистую текстуру цитоплазмы с хорошо различимыми митохондриями, ядром, липидными гранулами и цитоплазматической мембраной, плотно прилегающей к клеточной стенке. Спорангиоспоры 25-суточной культуры обезвожены, часто плазмоллизированы, с мембранными инвагинациями, уменьшенным количеством крист в митохондриях, деформациями клеточной стенки, наличием конденсированного электронно-плотного и электронно-прозрачного материала.

В условиях увеличивающейся дегидратации в процессе старения культуры при длительном твердофазном культивировании в спорах наблюдалось снижение доли ТАГ в общих липидах. У диморфного гриба *M. circinelloides* var. *lusitanicus* 12М отмечена корреляция между составом липидов спорангиоспор, их жизнеспособностью и индукцией дрожжеподобного роста при прорастании: дрожжеподобный рост наблюдался уже при небольшом снижении в липидах спорангиоспор доли ТАГ и увеличении доли ДАГ и СЖК, кроме того, уменьшалось содержание эфиров стерина (ЭС) и основных фосфолипидов (ФХ, ФЭА, ФС). Отношение массивных фосфолипидов (ФЭА/ФХ) повышалось от 0,39 до 0,94, а отношение фосфо- и гликолипидов (ФЛ/ГЛ) снижалось с 1,6 до 0,5, что свидетельствовало о критических изменениях структурной организации и функциональности мембран и коррелировало с падением жизнеспособности спорангиоспор. Отмечено повышение уровня свободных стерина, половина которых, однако, приходилась на метилированные производные. Последние не способны полноценно выполнять в мембранах структурные функции, для обеспечения которых необходимо высокое содержание эргостерина – главного десметилстерина грибов. Об исчерпании в старых спорангиоспорах резервного пула эргостерина, заключенного в ЭС, свидетельствовало

снижение соотношения этерифицированных и свободных стеринов (ЭС/ССт) с 1.26 до 0.3. Спорангиоспоры с таким составом липидов полностью теряли жизнеспособность.

Таким образом, снижение жизнеспособности спорангиоспор старых культур и изменение характера роста гриба при их прорастании в значительной степени коррелируют с изменением их липидного состава. Это подтверждается тем фактом, что добавление экзогенных липидов влияло на стратегию развития культур, вырастающих из старых спорангиоспор: добавка ТАГ способствовала нормальному развитию культур из спор с дефицитом внутриклеточных липидов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00659.

ДИМОРФИЗМ МУКОРОВЫХ ГРИБОВ: РОЛЬ ПОЛИМЕРОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ И ЛИПИДОВ В ОБРАЗОВАНИИ ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ И МИЦЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Мысякина И. С., Андриянова Д. А., Феофилова Е. П.

Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского РАН, Москва

Проявление диморфизма у грибов сопряжено с существенными изменениями биосинтетических и энергетических процессов и структурно-морфологических характеристик, что имеет адаптивный характер и направлено на поддержание жизнеспособности организма в изменившихся условиях. Диморфизм определяет жизненную стратегию грибов путем образования клеток альтернативных морфотипов, обеспечивающих рост и выживание культуры в различных (в том числе стрессовых) условиях. У грибов, в частности, у представителей пор. Mucorales, он характеризуется наличием двух морфологических форм – мицелиальной и дрожжеподобной, наиболее существенные различия которых обусловлены структурой и механизмами формирования клеточной стенки, а также характером роста клетки (апикальным или сферическим).

Мукоровые грибы являются классической моделью для изучения диморфизма. В своем большинстве они не патогенны, однако отдельные виды в определенных условиях могут вызывать оппортунистические инфекции – мукоромикозы разной локализации (при этом патогенной формой гриба является мицелиальная). Взгляд на явление диморфизма как результат стрессового воздействия ряда эффекторов морфогенеза и мембранотропных соединений, оказывающих влияние на липидный бислой мембран и синтез основного опорного биополимера, определяющего морфологию клетки – хитина, позволяет предположить наличие корреляции между составом липидов (в том числе мембранных), полимеров клеточной стенки (синтез которых осуществляется мембранно-связанными ферментами) и способностью грибов рода *Mucor* к диморфному росту. Интересно, что состав гетерополисахарида мукорана, который входит в состав клеточных стенок, меняется в связи с морфологией грибов. Переход у мукоровых грибов от мицелиальной формы к дрожжеподобной (диморфизм) сопровождается изменениями в составе моносахаридов мукорана, а именно изменениями в содержании галактозы и фукозы. Эти изменения в составе полиуронидов клеточных стенок также рассматриваются в настоящее время как биохимические критерии, определяющие морфогенез грибов.

Различия в компонентном составе полимеров клеточной стенки не являются единственным фактором, определяющим характер морфогенетических процессов и форму клеток. В ряде работ, посвященных исследованию взаимосвязи липидного обмена с морфогенезом грибов, показана важность липидов как структурных и регуляторных компонентов клетки. Вероятно, особое значение имеет состав стеринов, выполняющих роль пластификаторов и регуляторов микровязкости липидного бислоя и активности мембранно-связанных ферментов. Нами впервые показано, что эргостерин и холестерин влияют на накопление биомассы *Cunninghamella echinulata*, увеличивая ее выход, и вызывают гомогенный рост мицелия.

Мицелиальная и дрожжевая формы грибов имеют разную вирулентность, и в последние годы интерес к изучению роли липидов в диморфизме возрос благодаря тому, что этот феномен оказался связан с широким распространением возбудителей микозов животных и человека и патогенов сельскохозяйственных растений. В связи с возросшим интересом к исследованию роли липидов и компонентов клеточной стенки в морфогенетических процессах, актуальным является поиск критериев, необходимых для оценки способности грибов к диморфизму. Исследование способности к диморфному росту в стрессовых условиях у представителей мукоровых грибов, у которых этой способности ранее не было отмечено, позволит существенно расширить представления о распространенности этого явления и его биохимических механизмах.

Работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-00430 и 10-04-00659.

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА МЕЛАНИНА У *INONOTUS OBLIQUUS* (PERS.) PILAT

Поединок Н. Л.

Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

Меланины – черные, коричневые или желтые пигменты сложной полимерной структуры, производные тирозина и белков, содержатся в тканях практически всех эукариотических организмов (животных, растений, грибов, простейших) и выполняют разнообразные биологические функции. Известно, что пигменты коричневого и черного цвета вырабатываются клетками многих живых организмов, как защитная реакция в ответ на разного вида излучения. В настоящее время есть ос-

нования признавать у меланинсодержащих микроскопических грибов существование, как минимум двух фоторецепторных систем: микохромной и системы с участием меланинового пигмента в качестве первичного фоторецептора [Жданова]. Сложность структуры меланинов позволяет этим биополимерам перехватывать и рассеивать фотоны и электроны. В результате происходит ослабление энергии облучения и преобразование ее в энергию химических связей. Имеются указания о положительном влиянии освещения в видимой части спектра на интенсивность пигментации разных видов микромицетов. Данные о влиянии низкоинтенсивного излучения на рост и синтез меланиновых пигментов макромицетами в литературе практически отсутствуют. Свет в видимой части спектра можно рассматривать как экологически чистый регулятор онто- и морфогенеза, биологической активности грибов разных экологических и систематических групп. Известно, что характер биохимических изменений в клетках зависит как от длины волны, так и от интенсивности освещения.

Нами изучена возможность использования различных источников света низкой интенсивности (лазеры, светодиоды) на рост и синтез меланина известными своими лекарственными свойствами гриба *Inonotus obliquus*. Уже известны работы, где исследователи рассматривают этот гриб, как перспективный продуцент меланинов и меланинсодержащих субстанций. Лазеры использовали в качестве источников когерентного света. При расчете режима облучения мы исходили из предположения, что возможный механизм, ответственный за биологическую активность света, инициируется поглощением отдельного фотона излучения. Исходя из этого, экспозиция выбиралась такой, чтобы число падающих фотонов было практически одинаковым при обработке мицелия в разных спектральных диапазонах. Нами показано, что наибольший биологический эффект имел место при кратковременном облучении посевного мицелия синим светом. Следует отметить, что когерентный свет в тех же диапазонах длин волн, что и неполяризованный, оказывал больший стимулирующий эффект на рост и синтез меланина. Так облучение лазерным светом (488 нм) увеличивало скорость линейного роста на 26,6%, количество биомассы – на 57,0% и общего меланина – на 53,6%. Использование светодиодного излучения, в том же спектральном диапазоне, привело к увеличению скорости линейного роста на 22%, биомассы – на 23,6%, и общего меланина – на 19,5%. Это подтверждает теорию некоторых исследователей, которые обосновывают биологическую активность когерентного лазерного излучения через механизм пространственной микронеоднородности лазерного поля и считают неполяризованное низкоинтенсивное излучение (светодиодное) тех же самых спектральных диапазонов биологически менее активным. Зеленый свет (514 и 520 нм) не вызывал достоверного изменения биологической активности исследуемого нами гриба. Красный свет (632,8 и 660,0 нм) способствовал увеличению контролируемых показателей на 10-16%. Проведенные нами исследования дают основания говорить о перспективности использования лазерной техники в биотехнологии культивирования *Inonotus obliquus* с целью получения биомассы и меланина. Возможность целенаправленного воздействия лазера на внутриклеточные процессы и регулирования процесса биосинтеза обусловлена селективным воздействием когерентного света на электроны фоточувствительных структур и фоторецепторы в биологических объектах.

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ШТАММОВ МАКРОМИЦЕТОВ В ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЕ

Пучкова Т. А.¹, Бисько Н. А.², Филимонова Т. В.¹, Черноок Т. В.¹, Осадчая О. В.¹, Поединок Н. Л.²

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Институт ботаники имени Н. Г. Холодного, Киев

Объектами исследования являлись новые штаммы грибов, относящихся к различным эколого-трофическим группам: ксилотрофы (*Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Hericium erinaceus*), гумусовые сапротрофы (*Morchella esculenta*, *Morchella conica*, *Phallus impudicus*) (отдел Basidiomycota) и энтомопатогены (*Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*) (отдел Ascomycota). Грибы выращивали на плотной сусло-агаровой среде при температурах 17, 25 и 30 °С.

У грибов *C. sinensis* и *C. militaris* наблюдались очень плотные, опушенные колонии, с высоким ватно-войлочным мицелием, ровным или слегка волнистым краем. Центр колоний выпуклый. В темноте мицелий грибов белый. При освещении мицелия *C. militaris* отмечено образование желтовато-оранжевого пигмента. Оптимальная температура роста для этих грибов – 20-25 °С. Низкая температура культивирования (17 °С) оказалась более предпочтительной для исследуемых штаммов грибов, чем более высокая (30 °С). При 25 °С линейная скорость роста *C. sinensis* составила 2,5 мм/сут, ростовой коэффициент – 38,6. Линейная скорость роста *C. militaris* составила 2,2 мм/сут, ростовой коэффициент – 20. При микроскопировании вегетативного мицелия гифы и конидиофоры мицелия ? гиалиновые с гладкими стенками, конидии цилиндрические, гладкостенные. После 20 суток культивирования мицелиальная культура формировала много округлых спор, главным образом размером 5-10 мкм.

Для исследуемых ксилотрофных базидиомицетов оптимальная температура роста была в пределах 25-30 °С. Наиболее активный рост отмечен у *S. commune* и *T. versicolor*. Их колонии отличались более высоким, плотным, вагообразным воздушным мицелием без концентрических кругов. Линейная скорость роста составила у *S. commune* 5,8-11,7 мм/сут, у *T. versicolor* 6,0-12,4 мм/сут, ростовой коэффициент – 90-135 и 90-120, полное зарастание чашки Петри наблюдалось на 8-10 сутки инкубации. *H. erinaceus* значительно уступал данным грибам по скорости роста, отличался паутинистым, негустым воздушным мицелием. Линейная скорость роста *H. erinaceus* составила 3,2 мм/сут, ростовой коэффициент – 4,1-5,3, полное зарастание чашки Петри наблюдалось на 17-22 сутки. Реверзум колоний цвета среды.

Изучаемые гумусовые сапротрофы лучше росли при температуре около 25 °С. Линейная скорость роста составила у *Morchella conica* 10,2-12,2 мм/сут, у *M. esculenta* 8,4-10,8 мм/сут, ростовой коэффициент – 45-108 и 24,5-77,1, полное зарастание чашки Петри наблюдалось на 5-8 сутки инкубации. Оба гриба образовывали коричневый пигмент, предположительно меланиновой природы. Реверзум колоний окрашен в темный цвет. Вегетативный мицелий *M. esculenta* плотный, ватообразный, колонии с концентрическими крутами. У *M. conica* на поверхности колонии присутствовали зернистые включения.

Очень медленно растущим грибом оказался *Ph. impudicus*. Линейная скорость роста у него составила 0,8-2,5 мм/сут, после 8 сут. культивирования рост значительно замедлялся, ростовой коэффициент – 2,5-3,0. Мицелий гриба белый, ватообразный, высокий. Реверзум колонии цвета среды.

Микроскопирование вегетативного мицелия всех базидиальных грибов позволило выявить пряжки и анатомозы, что важно для оценки чистоты культуры.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОМИЦЕТОВ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ И СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП

Пучкова Т. А.¹, Бисько Н. А.², Филимонова Т. В.¹, Черноок Т. В.¹, Осадчая О. В.¹, Поединок Н. Л.²

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск
Институт ботаники имени Н. Г. Холодного, Киев

Объектами исследования являлись новые штаммы грибов, относящихся к различным эколого-трофическим группам: ксилотрофы (*Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Hericium erinaceus*), гумусовые сапротрофы (*Morchella esculenta*, *Morchella conica*, *Phallus impudicus*) (отдел Basidiomycota) и энтомопатогены (*Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*) (отдел Ascomycota).

Проведены исследования на наличие ферментов обмена азотных соединений (протеаза, нитрат-редуктаза, уреазы), углеводных соединений (амилаза, целюлаза, ксиланаза, α -глюкозидаза), окислительно-восстановительных процессов (монофенолмонооксигеназы, пероксидазы) и обмена липидов.

Все исследованные штаммы имели положительную реакцию на протеазу, которая проявлялась наличием прозрачных зон под колониями на 3-6 сут. культивирования грибов. Штаммы *C. sinensis*, *M. conica*, *M. esculenta*, *Ph. impudicus* показали четкую, положительную реакцию на нитрат-редуктазу, которая была значительно слабее у высших базидиомицетов. Активность фермента проявлялась появлением ярко-красного окрашивания. На уреазу наблюдалась слабая положительная реакция только у *M. conica*, *M. esculenta*. Активность фермента начинала проявляться только на 6 сут. культивирования, появлялось слабое розоватое окрашивание. У молодого мицелия всех исследуемых грибов отмечен высокий уровень активности амилазы, с возрастом он несколько снижался. Ксиланазная активность отмечена у большинства исследуемых грибов, кроме *M. conica*. Наиболее высокая у *P. impudicus*. Лучшее всего целлюлазная активность проявилась у ксилотрофных базидиомицетов *T. versicolor*, *S. commune*. Хотя *C. sinensis*, *M. conica*, *M. esculenta* относятся к другой экологической группе, они также дали четкую положительную реакцию на данный фермент. В комплекс целлюлолитических ферментов также входит β -глюкозидаза, обнаруженная у всех исследованных штаммов. Исследуемые культуры показали четкую положительную реакцию на липазу, которая лучше проявилась у *T. versicolor* и *P. impudicus*, относительно слабо – у *C. sinensis*. Положительная реакция на лакказу отмечена у всех штаммов, о чем свидетельствовало появление вокруг колоний фиолетового окрашивания с 6-нафтолом и темно-вишневого с гваяколом. Положительная реакция на тирозиназу отмечалась у всех штаммов после 10 сут. культивирования, что связано с повышением продукции этого фермента клетками гриба с возрастом колоний. Наиболее активными оказались штаммы *M. conica*, *M. esculenta*, *T. versicolor* и *P. impudicus*. Среди исследуемых макромицетов образование пероксидазы отмечено у дереворазрушающих грибов *T. versicolor*, *S. commune*, *H. erinaceus*. У остальных грибов четкой положительной реакции на пероксидазу обнаружено не было.

Таким образом, исследуемые грибы – макромицеты разных экологических и систематических групп имеют достаточно широкий спектр ферментов, с помощью которых они способны разлагать сложные соединения растительного происхождения.

ВЛИЯНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ЛИПОФИЛЬНЫХ КАТИОНОВ НА ДРОЖЖЕВЫЕ МИТОХОНДРИИ

Суханова Е. И., Тренделева Т. А., Звягильская Р. А.
Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва

Исследовано влияние жирных кислот и митохондриально-направленных липофильных катионов на прочно сопряженные митохондрии из дрожжей *Dipodascus (Endomyces) magnusii* и *Yarrowia lipolytica*. Найдено, что жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая, пендадекановая, олеиновая, линолевая, линоленовая, индолилуксусная и нафтилуксусная), но не гидрореперекиси ненасыщенных жирных кислот, в микромолярных концентрациях активировали дыхание в состоянии 4 и снижали мембранный потенциал, что указывало на их разобщающее действие. Деполяризация мембраны, вызванная насыщением

ными и ненасыщенными жирными кислотами, полностью обращалась и предотвращалась добавлением бычьего сывороточного альбумина и АТФ. Положительно заряженные (следовательно, транспортирующиеся исключительно в митохондриях) производные липофильного катиона трифенилфосфония, соединенного C_{10} -алифатической цепью с убихиноном, компонентом электронтранспортной цепи митохондрий или пластохиноном, компонентом фотосинтетической цепи переноса электронов в низких микромолярных концентрациях обладали антиоксидантной активностью, ингибируя образование пероксида митохондриями, а также проявляли свойства «относительно слабых» разобщителей, в более высоких концентрациях увеличивали образование пероксида, т. е. обладали прооксидантной активностью и ингибировали дыхание, в еще больших концентрациях вызывали набухание митохондрий за счет, вероятно, их прооксидантного и детергентного действия. В очень низких, еще не разобщающих концентрациях липофильные катионы с делокализованным зарядом (SkQ1, SkQ3, MitoQ и C_{12} TRP) усиливали разобщающее действие насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Вероятнее всего, жирные кислоты пересекали митохондриальную мембрану в протонированной форме по механизму flip-flop и затем депротонировались в митохондриях. Образовавшаяся при этом анионная форма жирной кислоты комплексовалась с липофильным катионом, что значительно облегчает диффузию пары (анион жирной кислоты–липофильный катион) через митохондриальную мембрану в обратном направлении. Цикл завершается протонированием жирной кислоты и освобождением липофильного катиона, который вновь поступает в митохондрии электрофоретически. Высказано предположение о том, что выявленное разобщающее действие липофильных катионов может быть, по крайней мере отчасти, объяснено их взаимодействием с эндогенным пулом жирных кислот. Используя в качестве движущей силы трансмембранный потенциал и накапливаясь в митохондриях, липофильные катионы могут взаимодействовать с пулом эндогенных жирных кислот и увеличивать протонную проницаемость митохондрий по механизму, близкому к описанному выше, а именно: выход липофильного катиона осуществляется в паре с жирной кислотой, кислота протонируется, липофильный катион освобождается и вновь поступает в митохондрии за счет трансмембранного потенциала. Чем больше пул эндогенных жирных кислот, тем длительнее будет функционировать этот цикл. Снижение мембранного потенциала будет способствовать «самосохранению» митохондрий.

Работа поддержана РФФИ (гранты 06-04-49687 и 09-04-01238).

ПРИОННЫЕ И НЕПРИОННЫЕ АМИЛОИДЫ ДРОЖЖЕЙ

Тер-Аванесян М. Д., Ураков В. Н., Афанасьева Е. Г., Кушников В. В.

Российский кардиологический НПК Росмедтехнологий, Москва

Амилоиды – это фибриллярные полимеры растворимых в норме белков. Образование амилоидов сопровождается конформационной перестройкой белков с формированием специфической «кросс-в» структуры. Возникновение амилоидов является причиной обширной группы заболеваний человека и животных, называемых амилоидозами. Амилоиды обычно неинфекционны, за исключением особой их разновидности, называемых прионами. Передача прионов между различными видами затруднена. В основе этого явления, называемого прионным межвидовым барьером, лежит высокая чувствительность полимеризации прионных белков к минимальным различиям в их первичной структуре. Прионные амилоиды описаны также у низших эукариот, у которых они выступают в роли нехромосомно наследуемых детерминант. На примере одного из прионов дрожжей *S. cerevisiae* будут рассмотрены принципы их размножения и наследования, показано отличие прионных амилоидов от неприонных. Будут приведены результаты исследования механизмов межвидовых барьеров при передаче прионов между различными видами дрожжей *Saccharomyces*.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований, Wellcome Trust и проводится в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы.

НОВЫЕ ДАННЫЕ ОБ ИНДУКЦИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ МИТОХОНДРИЙ

Тренделева Т. А., Звягильская Р. А.

Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва

В работе использовали прочно-сопряженные митохондрии, выделенные из дрожжей *Yarrowia lipolytica*, облигатного аэроба, содержащего полностью компетентную дыхательную цепь со всеми тремя пунктами энергетического сопряжения. Об образовании поры судили по снижению величины мембранного потенциала (регистрируемого с помощью потенциал-зависимого зонда – сафронина O) и по высоко-амплитудному набуханию митохондрий (регистрируемого при 540 нм). Ранее было показано, что митохондрии *Y. lipolytica* лишены природной системы поглощения Ca^{2+} , но могут поглощать и удерживать Ca^{2+} в присутствии специфического Ca^{2+} -ионофора ETН129. В отличие от митохондрий млекопитающих, дрожжевые митохондрии оказались устойчивыми к действию высоких концентраций Ca^{2+} и лишены классической циклоспорин-чувствительной Ca^{2+} -фосфат-зависимой поры. Совместное добавление Ca^{2+} и ETН129 вызывало лишь снижение мембранного потенциала, полностью восстанавливаемое добавлением бычьего сыво-

роточного альбумина. Доказано, что снижение мембранного потенциала, вызываемое Ca^{2+} и ЕТН129, обусловлено активацией $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмена, зависящего от эндогенного пула жирных кислот. Не удалось обнаружить и пору, индуцируемую в митохондриях животных при совместном действии низких концентраций Ca^{2+} и насыщенных жирных кислот. Жирные кислоты (насыщенные и ненасыщенные) вызывали разобщение митохондрий (активацию дыхания в состоянии 4 и деполаризацию внутренней митохондриальной мембраны), но не их набухание. Не было обнаружено в митохондриях *Y. lipolytica* и поры, индуцируемой в митохондриях животных их деэнергизацией, истощением пула адениновых нуклеотидов, добавлением высоких концентраций фосфата при кислых значениях рН. Действие пероксида, *t*-бутилпероксида, а также совместное действие фениларзиноксида, менадиона и оксалоацетата, приводило к снижению мембранного потенциала, обращаемому АТР, но не к набуханию митохондрий. Впервые в митохондриях дрожжей обнаружен АТР-зависимый K^+ -канал “животного типа”, открываемый в ответ на добавление диазоксидов и GTP и закрываемый добавлением АТР и 5-гидроксидекановой кислоты. Показано неполное открытие канала и в физиологических условиях - при увеличении скорости дыхания. Высказано и доказано предположение о том, что это явление, эквивалентное слабому разобщению, может быть защитным механизмом, предотвращающим митохондрии от окислительного стресса (известно, что митохондрии являются основными источниками активных форм кислорода в клетке и что полное восстановление коэнзима Q, главного коллектора восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи, способствует увеличению продукции активных форм кислорода). Также показано впервые, что возможно полное открытие АТР-зависимого K^+ -канала и его превращение в неспецифический АТР-зависимый канал под действием ряда факторов. Открытие неспецифического канала может приводить к выходу из митохондрий апоптотических факторов, в норме локализованных в межмембранном пространстве, и запуску необратимой стадии апоптоза (или некроза) дрожжевых клеток в условиях, приводящих к снижению внутриклеточной концентрации АТР.

Работа поддержана РФФИ (гранты 06-04-49687 и 09-04-01238).

ВЛИЯНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ЛИПОФИЛЬНЫХ КАТИОНОВ НА ДРОЖЖЕВЫЕ МИТОХОНДРИИ Тренделева Т. А., Суханова Е. И., Звягильская Р. А. Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва

Исследовано влияние жирных кислот и митохондриально-направленных липофильных катионов на прочно сопряженные митохондрии из дрожжей *Dipodascus (Endomyces) magnusii* и *Yarrowia lipolytica*. Найдено, что жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая, пентадекановая, олеиновая, линолевая, линоленовая, индолилуксусная и нафтилуксусная), но не гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, в микромолярных концентрациях активировали дыхание в состоянии 4 и снижали мембранный потенциал, что указывало на их разобщающее действие. Деполаризация мембраны, вызванная насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами, полностью обращалась и предотвращалась добавлением бычьего сывороточного альбумина и АТР. Положительно заряженные (следовательно, транспортирующиеся исключительно в митохондрии) производные липофильного катиона трифенилфосфония, соединенного C_{10} -алифатической цепью с убихиноном, компонентом электронтранспортной цепи митохондрий или пластохиноном, компонентом фотосинтетической цепи переноса электронов в низких микромолярных концентрациях обладали антиоксидантной активностью, ингибируя образование пероксида митохондриями, а также проявляли свойства «относительно слабых» разобщителей, в более высоких концентрациях увеличивали образование пероксида, т. е. обладали прооксидантной активностью и ингибировали дыхание, в еще больших концентрациях вызывали набухание митохондрий за счет, вероятно, их прооксидантного и детергентного действия. В очень низких, еще не разобщающих концентрациях липофильные катионы с делокализованным зарядом (SkQ1, SkQ3, MitoQ и C_{12} TRP) усиливали разобщающее действие насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Вероятнее всего, жирные кислоты пересекали митохондриальную мембрану в протонированной форме по механизму flip-flop и затем депротонировались в митохондриях. Образовавшаяся при этом анионная форма жирной кислоты комплексовалась с липофильным катионом, что значительно облегчает диффузию пары (анион жирной кислоты-липофильный катион) через митохондриальную мембрану в обратном направлении. Цикл завершается протонированием жирной кислоты и освобождением липофильного катиона, который вновь поступает в митохондрии электрофоретически. Высказано предположение о том, что выявленное разобщающее действие липофильных катионов может быть, по крайней мере отчасти, объяснено их взаимодействием с эндогенным пулом жирных кислот.

ОСОБЕННОСТИ ПОТРЕБЛЕНИЯ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НЕКОТОРЫМИ ВИДАМИ РОДА *PENICILLIUM*

Тугай Т. И., Василевская А. И., Артышкова Л. В., Наконечная Л. Т.

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

Многолетний мониторинг микобиоты помещений объекта «Укрытие», характеризующихся повышенным радиационным фоном, позволил установить, что среди выделенных микромицетов наибольшим видовым разнообразием отличался род *Penicillium* (Zhdanova et al., 2000; Жданова и др., 2005; Dighton et al., 2008). У ряда штаммов выделенных видов рода *Penicillium* были выявлены ранее неизвестные у микроорганизмов радиоадаптивные свойства, а именно: радиотро-

пизм, радиостимуляция и радиоадаптивный ответ (Zhdanova et al., 2004; Турай и др., 2007; Dighton et al., 2008). Эти свойства, соответственно, проявлялись в способности штаммов направленно расти к источнику ионизирующей радиации, активации ряда ростовых процессов, повышенной устойчивости к действию высоких доз радиации после предварительного влияния малых доз. В литературе практически отсутствуют данные по изучению физиологических особенностей грибов с такими уникальными свойствами. Следует отметить, что выделенные виды грибов, кроме продолжительного действия повышенного радиационного фона, находились фактически в отсутствие основных источников питания, и, прежде всего, углерода. В связи с этим целью данного исследования было изучить некоторые физиологические особенности видов рода *Penicillium*, которые проявляли и не проявляли радиоадаптивные свойства, в условиях роста грибов на средах с лимитированным содержанием источника углерода.

Объектами исследования служили 4 вида (5 штаммов) рода *Penicillium*, среди которых *P. aurantiogriseum* Dierckx 47 и *P. westlingii* Zalessky 75 проявляли радиотропизм, радиостимуляцию и радиоадаптивный ответ, *P. spinulosum* Thom 85 и *P. spinulosum* 87 не проявляли радиотропизма по отношению к источнику ионизирующего излучения и у *P. purpurescens* (Sopp) Biourge 72 изученные радиоадаптивные свойства отсутствовали. Грибы изучали в условиях стационарного поверхностного культивирования в течение 3-21-х суток при $25 \pm 2^\circ \text{C}$ на среде Чапека, в которой источником углерода была глюкоза в концентрации от 20 г/л до 0,01 г/л. О физиологических особенностях этих видов грибов судили по количеству образовавшейся биомассы и потребленного субстрата, морфологии культур (на средах с концентрациями глюкозы 0, 1 и 0,01 г/л), величине pH культуральной жидкости.

Критерием эффективности потребления глюкозы изученными видами грибов служила величина экономического коэффициента, который характеризует энергетические затраты при накоплении грибной биомассы (Перт, 1978). Показано, что величины экономических коэффициентов зависели от исходной концентрации глюкозы в среде и наличия радиоадаптивных свойств. При росте всех изученных видов грибов на среде с максимальной концентрацией глюкозы 20 г/л величины экономических коэффициентов были наименьшими (0, 27-0, 48) и сравнимы с известными в литературе данными для микроорганизмов. С уменьшением концентрации глюкозы в среде возрастала эффективность потребления субстрата грибами. Максимальная эффективность потребления субстрата у *P. westlingii* 75 и *P. aurantiogriseum* 47 выявлена при росте на среде с концентрацией глюкозы 0,25 г/л, а у *P. spinulosum* 85 и *P. spinulosum* 87 – 1 г/л, при этом величины экономических коэффициентов были в диапазоне 0, 8-1, 2. У *P. purpurescens* 72, у которого радиоадаптивные свойства отсутствовали, эффективность потребления субстрата не зависела от концентрации глюкозы в среде (величины экономических коэффициентов составляли в среднем 0, 2-0, 4).

Полученные нами данные свидетельствуют о взаимосвязи между наличием радиоадаптивных свойств у видов рода *Penicillium* и проявлением у них олигокарботолерантности. Изменения в эффективности потребления субстрата у изученных видов грибов, по нашему мнению, может быть обусловлено изменениями в их энергетическом метаболизме.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ КИСЛОТНОСТИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА *LEPISTA PERSONATA* (FR. : FR.) СООКЕ

Тюфкий А. В.

Донецкий национальный университет, Донецк

В настоящее время отработаны технологии проведения исследований и культивирования съедобных грибов - шампиньона, вешенки и некоторых других видов, которые внедрены в промышленное производство. Но существует недостаточное разнообразие искусственно культивируемых видов грибов, поэтому перспективным является исследование гриба *L. personata*, который широко распространен в природе, а также, имеет антиоксидантные, противоопухолевые, противомикробные и иммуномодулирующие свойства (Dulger, 2002; Moradali, 2007; Murcia, 2002; Ouzouni, 2009).

Изучение влияния физико-химических факторов на рост грибов является перспективным направлением в биотехнологии, что позволяет культивировать их в искусственных условиях, а также, влиять на разнообразные физиологические процессы: скорость роста, потребление питательных веществ, накопление биомассы или выделение внеклеточных ферментов (Соломко, 1992; Элланская и др., 1992). Одним из ключевых факторов, влияющих на рост и развитие грибов является кислотность питательной среды, что связано с поступлением веществ в клетку и проявлением различных физиологических процессов (Беккер, 1963).

Основной задачей данного исследования было определение значений кислотности среды, при которых происходит рост мицелия этого гриба и максимальное накопление биомассы в лабораторных условиях. Для этого общепринятыми методами выделили чистые культуры из четырех плодовых тел гриба *L. personata*, собранных на территории Донецкой области. Культивирование проводили при 24°C в колбах Эрленмейера объемом 100 мл с 30 мл пшеничной питательной среды: 100 г пшеницы отваривали 30 мин, отвар процеживали и добавляли 10 г глюкозы. Объем полученного раствора доводили до 1 л и использовали его для приготовления питательных сред с кислотностью от 3 до 10 единиц с шагом в одну единицу. Измерение кислотности среды проводили электрометрически в день постановки эксперимента и на 15-е сутки вместе с определением накопления сухой биомассы мицелия весовым методом.

Статистический анализ результатов эксперимента показал, что для изолята P-1 и P-2 *L. personata* наибольшее накопление биомассы было при pH 5 – 1, 89 г/л и pH 6 – 1, 71 г/л. У изолята P-3 *L. personata* наблюдался более широкий

оптимум от рН 6 до рН 8 и составлял 1, 40-1, 49 г/л. Самый широкий оптимум накопления биомассы обнаружен у изолята Р-4 *L. personata*, который находился в пределах от рН 5 до рН 9 и накопление биомассы мицелия составляло – 1, 82 и 1, 93 г/л соответственно. С увеличением или уменьшением кислотности среды относительно оптимальных значений рН накопление биомассы у всех изолятов *L. personata* постепенно уменьшалось, причем более низкие значения кислотности среды сильнее угнетали рост мицелия, чем более высокие.

После завершения культивирования гриба наблюдали следующие закономерности изменения рН питательной среды: при начальных значениях от рН 3 до рН 6 происходило увеличение кислотности питательной среды на 0, 5-1, 5 единицы, а при начальных значениях от рН 7 до рН 10 – уменьшение на 1-3, 5 единицы, что свидетельствует о влиянии продуктов метаболизма исследованных изолятов на кислотность питательной среды в направлении оптимальных значений для роста гриба.

Таким образом, для большинства исследованных изолятов *L. personata* оптимум кислотности питательной среды для накопления биомассы мицелия находится в пределах от рН 5 до рН 6.

ПОЛИСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ КЛЕТЧНЫХ СТенок МИЦЕЛИЯ *PENICILLIUM ROQUEFORTI*

Усов А. И.², Андриянова Д. А.¹, Смирнова Г. П.², Галанина Л. А.¹, Феофилова Е. П.¹

¹ Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского РАН, Москва

² Институт органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Клеточные стенки грибов состоят преимущественно из полисахаридов. Данные по строению полисахаридов представляют интерес для химической таксономии грибов, а сами полисахариды часто находят ценное практическое применение. Несмотря на широкое использование *Penicillium roqueforti* в сыроделии, строение клеточных стенок этого вида изучено недостаточно. В данной работе штамм *P. roqueforti* выделяли с поверхности твердого сыра и выращивали в течение 4 суток на среде Галаниной. Из обезжиренного мицелия гриба при экстракции горячей водой получен препарат водорастворимых полисахаридов (выход 10, 2%), в составе которых найдены манноза, глюкоза и галактоза. Остаток мицелия обрабатывали 1 М NaOH при комнатной температуре и после подкисления щелочного экстракта получали не растворимый в воде глюкан с выходом 17, 8%. После высушивания полисахарид потерял способность растворяться в щелочи, однако его удалось растворить в 10% растворе хлорида лития в диметилсульфоксиде. Такие растворы использовались для метилирования полисахарида и для спектроскопических исследований. При изучении глюкана методом метилирования было показано, что его молекулы имеют линейное строение и содержат связи 1>3 и 1>4 между остатками глюкозы в соотношении около 5:2. Эти данные были подтверждены анализом спектра ¹³C-ЯМР полисахарида, из которого также следовала α-конфигурация всех остатков глюкозы.

Не растворимые в воде (1>3)-α-D-глюканы были выделены ранее из нескольких видов высших и низших грибов, в том числе из родственного *Penicillium chrysogenum* [2], а близкие по структуре β-D-глюканы с двумя типами связей (1>3) и (1>4), различающиеся их соотношением, находили в дрожжах (*Schizosaccharomyces pombe* [3]) и высших растениях (*Aconitum kusnezoffii*). Такие полисахариды представляют интерес для изучения их биологической функции в клеточной стенке грибов, а после химической модификации (сульфатирования или карбосиметилирования), способной придать им растворимость в воде, могут быть использованы как биологически активные полимеры.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00430.

МЕДЬ (II) ИНДУЦИРУЕТ ПРОДУКЦИЮ ИНДОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЕ ГРИБА ШИИТАКЕ

Цивилева О. М.¹, Бычков Н. А.², Панкратов А. Н.², Щерба В. В.³, Пучкова Т. А.³, Никитина В. Е.¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

²Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Саратов

³Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Известно явление взаимозависимости окислительного стресса, цитодифференцировки и перехода к репродуктивной стадии развития мицелия высших грибов, необходимости при этом усиления антиоксидантной защиты. К числу эффекторов, способствующих углублению окислительного стресса и активизации тех вторичных метаболитов гриба, которые принимают участие в развитии последствий этого стресса, можно отнести медь (II), которая вызывает окислительный стресс в результате образования свободных радикалов в реакциях Габера-Вайса и Фентона.

В настоящей работе проведено исследование качественного состава низкомолекулярных внеклеточных метаболитов базидиомицета *Lentinus edodes* (шиитаке), биосинтез которых активизируется при выращивании гриба на синтетических средах с разными концентрациями Cu²⁺ (в интервале концентраций катиона от 2·10⁻⁴ до 1·10⁻² моль/л).

К питательной среде (состоящей из D-глюкозы, 5·10⁻² моль/л и L-аспарагина, 1·10⁻² моль/л), был добавлен пентагидрат сульфата меди до концентрации 10⁻²-10⁻⁴ моль/л. Далее в результате выращивания грибной культуры получа-

ли образцы культуральных жидкостей. Продукты разделения (на Sephadex G-25) фильтрата культуральной жидкости *L. edodes* (выращенного в присутствии сульфата меди указанных выше концентраций) анализировали методом электронной абсорбционной спектроскопии.

Различия электронных спектров начинают проявляться при концентрации Cu(II) $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л и выше. Кривые поглощения для вариантов опыта при концентрации добавки Cu(II) в среде культивирования не более $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л практически совпадают.

Основываясь на анализе модельных смесей, бесклеточных питательных сред указанного выше химического состава с дополнительно внесенными добавками фенольных и индольных соединений, а также на литературных данных [напр., 3], интерпретировали отличия электронных спектров, характерные только для Cu(II) -содержащих образцов культуральных жидкостей либо искусственных добавок индольных соединений. В результате наличие информативной полосы поглощения $\lambda=357$ нм в образцах, полученных при культивировании *L. edodes* в присутствии Cu(II) (концентрации $2 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), интерпретировали как полосу поглощения индольного кольца. Полученные данные, во-первых, позволили судить о том, что Cu^{2+} в указанном интервале концентраций стимулирует биосинтез внеклеточных соединений класса индолов у гриба шиитаке, и, во-вторых, планировать эксперимент по физико-химической идентификации индивидуальных веществ индольной природы, продуцируемых в условиях глубинного культивирования *L. edodes*.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ СИНТЕЗА ПИГМЕНТА ГРИБОМ *LAETIPORUS SULFUREUS*

Черноок Т. В., Бабицкая В. Г., Пучкова Т. А., Щерба В. В., Иконникова Н В., Осадчая О. В., Филимонова Т. В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Каротиноиды привлекают внимание биологов в связи с многообразием их функций в растительном и животном организме. До сих пор основным источником каротиноидов для животных и человека являются растения. Тем не менее, весьма интересным и перспективным источником каротиноидов могут быть и грибы. Одним из представителей базидиальных грибов, способных к синтезу полиеновых пигментов кетокаротиноидной природы (ксантофиллов), является серно-желтый трутовик *Laetiporus sulphureus*. Этот ксилотрофный гриб бурой гнили древесины растет преимущественно на лиственных породах деревьев и образует плодовые тела, окрашенные в оттенки желтого, оранжевого и розового цветов. Окраска обусловлена наличием в плодовом теле пигмента полиеновой природы, лэтипороксантина. Серно-желтый трутовик относится к съедобным и лекарственным грибам. Имеются сведения об антимикробных, противоопухолевых, цитотоксических свойствах плодовых тел гриба. *L. sulphureus* хорошо растет и при глубинном культивировании на относительно дешевых субстратах (ржаная мука и крахмал) при низких значениях pH (3, 0-3, 5) питательной среды. Гриб неприхотлив к минеральному питанию, отличается ограниченными потребностями в физиологически активных веществах, характеризуется крупноклеточной структурой (диаметр пеллет 2-3 мм), позволяющей легко отделять его от культуральной жидкости. При этом в мицелии накапливается значительное количество полиеновых пигментов каротиноидной природы – до 10-12 мг/г сухой биомассы. Были исследованы возможности направленного синтеза пигмента с целью повышения продуктивности данного гриба по данному биоактивному соединению. Для этого использовали физиологически активные синтетические органические вещества способные влиять на рост и развитие растений: фенилмочевину, дифенилмочевину, циклогексанон, циклогексан, β -ионон в различных концентрациях: от 10^{-2} до 10^{-7} . В отличие от других физиологически активных веществ — гербицидов, дефолиантов, десикантов и удобрений регуляторы роста и развития растений можно характеризовать как синтетические и природные органические соединения, которые в малых количествах влияют на жизненные процессы растений, не оказывают в используемых концентрациях токсического действия и не являются источником питания. Классический стимулятор синтеза каротина у растений β -ионон не увеличивал содержание пигмента у *L. sulphureus*, а в высоких концентрациях даже угнетал способность гриба синтезировать окрашенный пигмент. Фенилмочевина в концентрации 10^{-5} и 10^{-6} , дифенилмочевина в концентрации 10^{-6} , и циклогексан в концентрации 10^{-7} увеличивали синтез пигмента грибом на 20-25%, по сравнению с контролем. Циклогексанон в концентрации 10^{-3} повышал содержание пигмента в мицелии гриба более чем в 1, 5 раза - на 50-60%. Концентрация каротиноидного пигмента в мицелии достигала с этим стимулятором 17-20 мг/г сухой биомассы. В других концентрациях циклогексанон не оказывал столь существенного влияния на синтез пигмента грибом. На рост гриба данные стимуляторы не оказывали существенного влияния, β -ионон в высоких концентрациях подавлял рост гриба, а в концентрации 10^{-6} и 10^{-7} β -ионон и фенилмочевина незначительно увеличивали прирост биомассы на 5-6%. Таким образом показано, что на синтез пигмента у базидиального гриба *L. sulphureus* существенное влияние оказывает циклогексанон в концентрации 10^{-3} , что может значительно улучшить технологию получения мицелия, обогащенного данным биоактивным соединением полиеновой природы.

ПОИСК ГИАТУСА МЕЖДУ ВИДАМИ *LECCINUM HOLOPUS* И *LECCINUM VARIICOLOR***Иванов Д. М.****Санкт-Петербургский государственный университет**

В результате измерения суммарной бета активности радионуклидов в сухих плодовых телах грибов рода *Leccinum* S.F. Gray было установлено, что у некоторых образцов *Leccinum holopus* (Rostk.) Watling - Подберезовик болотный - произрастающих в сообществах с березой на олиготрофных сфагновых болотах (окрестности заказника Мшинское болото, Гатчинский р-н, Ленинградская обл.), значения превышают допустимый уровень 2500 Бк/кг (Сан-ПиН 2.3.2.1078-01) в 4-6 раз.

Это способствует особому интересу к *L. holopus* как потенциальному биомонитору загрязнения лесных и болотных сообществ радионуклидами, в том числе и чернобыльского происхождения (Публикация 91 МКРЗ).

Однако в сходных местообитаниях, особенно на границе болот, в сообществах с участием сосны, в те же сроки плодоношения, встречается другой близкий вид *L. variicolor* Watling - Подберезовик разноцветный.

Цель данной работы - рассмотреть признаки, по которым можно проследить линию раздела между рассматриваемыми видами.

У Подберезовика болотного цвет кожицы шляпки белый, беловатый, бежевый, иногда с зеленоватым оттенком, чешуйки ножки светлые. У Подберезовика разноцветного цвет шляпки мраморно-серый иногда с коричневатым оттенком, ножка белая с черными чешуйками, которая в местах повреждения синее.

В своих крайних формах эти виды хорошо различаются. Однако существует большое количество форм, отличающихся по морфологическим признакам (окраска шляпки, цвет чешуек ножки, изменение мякоти на срезе). Окраска - признак важный, но неоднозначный, зависящий как от стадии развития плодового тела, так и от субъективного восприятия цвета.

Размеры, характеризующие микроскопические признаки (размер спор, гимено- и каулоцистид) у рассматриваемых видов перекрываются. Так, для исследованных образцов обоих видов размер спор составлял 16,0-18,0 x 5,0-7,0 мкм. Следует отметить, что размер спор у образцов с превышением допустимой суммарной бета активности был несколько выше - 18,0-21,0 x 6,0-7,0 мкм, что также соответствует описанию этих видов.

Для разделения образцов, принадлежащих к рассматриваемым видам, применялся следующий метод анализа целевых фрагментов ДНК.

Для области ITS1-5,8S-ITS2 рДНК при амплификации с праймерами ITS1F/4B получены следующие значения (п.н.): *L. holopus* - 1580, *L. variicolor* - 1650. После проведения рестрикционного анализа ITS1-5,8S-ITS2/Hinf I наблюдается следующий набор фрагментов (п.н.): *L. holopus* - 900, 470, *L. variicolor* - 980, 460.

Для участка IGS1 рДНК при амплификации с праймерами CNL12 и 5SA получены следующие значения (п.н.): *L. holopus* - 1050, *L. variicolor* - 1200. Размеры фрагментов IGS1/Hinf I (п.н.): *L. holopus* - 900, 170, *L. variicolor* - 440, 310, 170.

Область ITS1-5,8S-ITS2 рассматриваемых видов в NCBI представлена следующими последовательностями - *L. holopus*: AF454561 (Нидерланды), AF454562 (Норвегия), AF454563 (Швеция), AF454564 (Бельгия); *L. variicolor*: AF454571 (Нидерланды), AF454572 (Нидерланды). При выравнивании последовательностей программой Clustalw2 и построении деревьев, основанных на результатах непараметрического бутстрэп анализа с использованием пакета статистических программ Phylip, было установлено, что индексы бутстрэпа показывают широкую географическую вариабельность *L. holopus* в зависимости от местообитания.

Работа проведена в рамках программы Рособразования и CRDF «Фундаментальные исследования и высшее образование» (РНП 2.2.2.3.16048, Y5-B-12-02).

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЛИПИДНОГО КОМПОНЕНТА МЕМБРАН В ПРОЦЕССЕ МОРФОГЕНЕЗА БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ**Сеник С. В.¹, Котлова Е. Р.¹, Кияшко А. А.¹, Новиков А. В.²****¹Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург****²Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург**

Широкий круг функциональных различий, которыми обладают гифы базидиальных грибов, и скоординированность их роста и развития в разных частях колонии указывают на наличие сложной регуляторной системы, позволяющей интегрировать биохимические процессы на большом расстоянии. Одним из важнейших элементов этой системы являются мембранные липиды. В частности, известно об участии фосфатидилинозит-4,5-бисфосфатов, а также некоторых рафтообразующих липидов, например, инозитфосфат-содержащих церамидов и гликозилцерамидов (ГлЦер) в регуляции полярного роста гиф. Установлено, что ГлЦер участвуют в реакциях, связанных с дифференцировкой клеток мицелия и инициацией плодообразования. Имеются сведения о регуляторной активности фосфатидилсеринов (ФС) и фосфатидных кислот (ФК). В частности, показано, что ФК могут контролировать многие этапы морфогенеза грибов, например, спорообразование. Что касается фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ), составляющих основу клеточных мембран, их роль в морфогенезе грибов пока малопонятна.

Целью настоящей работы являлось установление взаимосвязи процесса синтеза отдельных молекулярных видов мембранных липидов с основными этапами развития базидиальных грибов, среди которых нами были выделены следующие стадии: 1) интенсивный рост мицелия, представленного недифференцированными гифами; 2) снижение ростовой активности, появление многочисленных дифференцированных клеток; 3) появление примордиев; 4) образование дифференцированных плодовых тел. Исследования были проведены на поверхностных культурах *Flammulina velutipes*, *Pholiota highlandensis*, *Schizophyllum commune* и *Psilocybe coprofila*. Состав и содержание отдельных классов липидов определены методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии, в т.ч. ГЖХ-МС, и денситометрии. Анализ молекулярных видов липидов осуществлен с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

Согласно полученным данным, мембранные липиды изученных базидиальных грибов представлены в основном ФХ, ФЭ и стеринами. Среди минорных компонентов выявлены ФС, ФК, фосфатидилинозиты, кардиолипины и ГлЦер. Наиболее универсальным процессом, наблюдающимся в ходе развития культуры, оказалось постепенное уменьшение соотношения ФХ/ФЭ с 1,3-1,6 у активно растущих вегетативных гиф до 0,6-0,9 в культурах с дифференцированными гифами, а также в плодовых телах.

Исследование состава жирных кислот (ЖК) ФХ и ФЭ показало, что эти соединения этерифицированы преимущественно пальмитиновой ($C_{16:0}$), олеиновой ($C_{18:1}$) и линолевой ($C_{18:2}$) кислотами. Среди минорных компонентов обнаружены $C_{14:0}$, $C_{14:1}$, $C_{16:1}$, $C_{18:0}$, $C_{18:3}$, а также кислоты с нечетным количеством атомов углерода, в т.ч. $C_{15:0}$ и $C_{17:0}$. Развитие поверхностных культур сопровождалось изменениями в составе ЖК обоих классов липидов. Как правило, на стадии торможения активного роста происходило постепенное увеличение доли насыщенных жирных кислот ($C_{16:0}$, $C_{18:0}$) и уменьшение доли ненасыщенных ($C_{18:2}$, $C_{18:3}$). Образование плодовых тел коррелировало с увеличением относительного содержания линоленовой кислоты.

Существенные изменения в ходе роста и развития обнаружены во фракции ГлЦер. В процессе вегетативного роста большинства культур количество ГлЦер изменялось незначительно, но на стадии образования плодовых тел резко возрастало. Кроме того, на ранних стадиях развития *F. velutipes* были зарегистрированы модификации на уровне соотношения отдельных молекулярных видов этих липидов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 09-04-01634) и Федерального агентства по образованию (ГК № П1373).