

БИОТЕХНОЛОГИЯ

4.13 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

В номере

- **Использование микробных биопленок в очистке стоков, биосинтезе и биокатализе**
- **Сверхсинтез ацетолактата у природного мутанта лактококка**

Главный редактор
В.Г. ДЕБАБОВ

Редакционная коллегия: М.Ю. Бебуров, В.В. Бирюков, А.М. Боронин, М.Yu. Galperin (США),
А.В. Глазунов, И.О. Гордон (отв. секретарь), М.В. Иванов, С.В. Костров,
С.В. Машко, А.И. Мирошников, А.М. Носов, К.Г. Скрябин, А.Ya. Strongin (США),
А.Г. Тоневицкий (зам. главного редактора), В.И. Швец

Редакция журнала
И.О. Гордон, С.Г. Емельянова,
И.А. Северина, О.В. Боровкова

Адрес: 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, дом 1

Телефон редакции (495) 315-08-01

Факс (495) 315-05-01

e-mail: editor@genetika.ru

<http://www.genetika.ru/journal>

БИОТЕХНОЛОГИЯ

4.2013 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Издается с мая 1985 г.

Выходит 6 раз в год

Москва

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Новости биотехнологии 3

Biotechnology News 3

Проблемы, перспективы

Problems and Prospects

Максимова Ю.Г. Микробные биопленки в биотехнологических процессах 9

Maksimova Yu.G. Microbial Biofilms in Biotechnological Processes 9

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

Producers, Biology, Selection, and Gene Engineering

Серебренников В.М., Котова Л.Н., Глазунов А.В. Сверхсинтез α -ацетолактата из глюкозы у продуцента диацетила *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* B2103, природного мутанта, лишённого α -ацетолактатдекарбоксилазы. 24

Serebrennikov V.M., Kotova L.N., and Glazunov A.V. α -Acetolactate Oversynthesis from Glucose in a Diacetyl Producer *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* B2103, a Natural Mutant Deprived of α -Acetolactate Decarboxylase 24

Видягина Е.О., Ковалицкая Ю.А., Логинов Д.С., Королева О.В., Шестибратов К.А. Экспрессия гена ксилоглюканазы *sp-Xeg* из *Penicillium canescens* усиливает рост и ризогенез трансгенных растений осины. 39

Vidyagina E.O., Kovalitskaya Yu.A., Loginov D.S., Koroleva O.V., and Shestibratov K.A. Expression of Xyloglucanase *sp-Xeg* Gene from *Penicillium canescens* Accelerates Growth and Rooting in Transgenic Aspen Plants 39

Технология биопрепаратов

Biologicals Technology

Орлова Н.В., Антонова Л.П., Лобанова Н.В., Мосина А.Г., Ермолина Л.В. Влияние различных добавок на уровень продукции и степень сialiрирования рекомбинантного эритропоэтина человека, секретируемого производственной клеточной линией *CHO-Epo-2*. 48

Orlova N.V., Antonova L.P., Lobanova N.V., Mosina A.G., and Ermolina L.V. Effect of Various Additional Components on the Human Recombinant Erythropoietin Production and Sialylation Profile in *CHO-Epo-2* Industrial Cell Line 48

Экология

Ecology

Егорова Д.О., Горбунова Т.И., Первова М.Г., Демаков В.А. Бактериальная деструкция смеси, полученной при химической модификации полихлорированных бифенилов полиэтиленгликолями 56

Egorova D.O., Gorbunova T.I., Pervova M.G., and Demakov V.A. Bacterial Degradation of a Mixture Obtained as a result of Chemical Modification of Polychlorinated Biphenyls by Polyethylene Glycols 56

Использование биопрепаратов

- Кляйн О.И., Куликова Н.А., Степанова Е.В., Филиппова О.И., Федорова Т.В., Малошенко Л.Г., Филимонов И.С., Королёва О.В.* Получение и характеристика биологически активных продуктов солубилизации бурого угля базидиальными грибами белой гнили 65

Метрология, стандартизация, контроль

- Полтавченко А.Г., Ериш А.В., Пьянков С.А., Никонov А.М., Волков Г.Н., Кривенчук Н.А.* Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Инструментальный учет результатов анализа 74

- Сенявина Н.В., Хаустова С.А., Сахаров Д.А., Тоневитский Е.А., Гребенник Т.К., Еремина О.В., Тоневитский А.Г.* Соотношение концентраций пуриновых метаболитов в сыворотке крови у беременных женщин 83

Utilization of Biopreparations

- Klein O.I., Kulikova N.A., Stepanova E.V., Filippova O.I., Fedorova T.V., Maloshenok L.G., Filimonov I.S., and Koroleva O.V.* Obtaining and Characteristics of Biologically Active Products of Brown Coal Solubilization by White Mold Basidial Fungi. 65

Metrology, Standardization, and Control

- Poltavchenko A.G., Vorsh A.V., Pyankov S.A., Nikonov A.M., Volkov G.N., and Krivenchuk N.A.* The Multiplex Serodiagnosis of Infectious Diseases. Tools for Results Accounting . . . 74

- Senyavina N.V., Khaustova S.A., Sakharov D.A., Tonevitsky E.A., Grebennik T.K., Eremina O.V., and Tonevitsky A.G.* Ratios of Concentrations of Purine Metabolites in Pregnant Women Sera . . . 83

Использование биопрепаратов

УДК 604.4:582.28

О.И. КЛЯЙН¹, Н.А. КУЛИКОВА³, Е.В. СТЕПАНОВА¹, О.И. ФИЛИППОВА², Т.В. ФЕДОРОВА¹, Л.Г. МАЛОШЕНОК¹, И.С. ФИЛИМОНОВ³, О.В. КОРОЛЁВА^{1,*}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

² МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, 119991

³ Международный учебно-научный биотехнологический центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

e-mail: koroleva@inbi.ras.ru

Получение и характеристика биологически активных продуктов солюбилизации бурого угля базидиальными грибами белой гнили

Исследована способность базидиальных грибов *Trametes hirsuta* и *T. maxima* солюбилизировать бурый уголь в условиях жидкофазного культивирования. Установлено, что способность грибов разрушать уголь обусловлена активностью лигнолитических ферментов Мп-пероксидазы и лигнинпероксидазы. Проведена оценка ростстимулирующей активности биопрепаратов (БП), полученных на основе культуральных жидкостей исследуемых штаммов базидиомицетов при росте на богатой и бедной средах. Показано, что полученные БП ингибируют рост побегов и корней пшеницы на стадии прорастания, однако не влияют на дальнейший рост растений или даже стимулируют его. Продукты культивирования базидиомицетов в присутствии угля обладают способностью стимулировать корни проростков, а на более поздней стадии развития не влияют на рост растений (БП на основе *T. hirsuta*) или стимулируют его (БП на основе *T. maxima*). Установлена выраженная детоксицирующая способность БП по отношению к гербициду атразину, связанная, по-видимому, с присутствием в них лакказы.

Ключевые слова: биосолюбилизация, бурый уголь, лигнолитические ферменты, *Trametes hirsuta*, *Trametes maxima*.

Бурый уголь имеет низкую энергетическую ценность, а его традиционное сжигание приводит к загрязнению окружающей среды оксидами азота и серы и другими вредными веществами. В связи с этим актуальной является проблема поиска альтернативных способов его использования в народном хозяйстве. Еще в 60-х годах прошлого века было показано, что внесение бурого угля в

почву приводит к увеличению урожайности сельскохозяйственных культур [1]. В дальнейшем в качестве стимуляторов роста растений было предложено использовать гуматы, представляющие собой щелочные экстракты угля, получаемые путем его обработки гидроксидами щелочных металлов или аммония и являющиеся ближайшими аналогами природных гуминовых веществ (ГВ). По срав-

Кляйн Ольга Ивановна, Куликова Наталья Александровна, Степанова Елена Владимировна, Филиппова Ольга Игоревна, Федорова Татьяна Владимировна, Малошенко Лилия Георгиевна, Филимонов Иван Сергеевич, Королёва Ольга Владимировна.

Список сокращений: БП — биопрепарат(ы); ГВ — гуминовые вещества; КЖ — культуральная жидкость; МЕ — международная единица активности фермента; ФС II — фотосистема II; ЭТЦ — электронтранспортная цепь.

* Автор для переписки.

нению с углем гуматы характеризуются большей стимулирующей активностью по отношению к растениям, что объясняется процессом разрушения высокомолекулярных соединений бурого угля при обработке щелочью и, как следствие, увеличением их растворимости [2]. Было показано, что этот процесс может происходить также при обработке бурого угля экстрацеллюлярными ферментами базидиальных грибов белой гнили [3], в ходе которого происходит коллоидное растворение угля под действием энзимов, т.е. биосолюбилизация. Установлено, что ведущую роль в этом процессе играет лигниндеградационная система, в которую входят лигнинпероксидаза, Mn-пероксидаза, лакказы и другие ферменты, а также низкомолекулярные вторичные метаболиты [4—6]. В настоящее время способность к биосолюбилизации угля показана для целого ряда базидиальных грибов, таких как *Phanerochaete chrysosporium*, *Nematoloma frowardii* и *Stropharia rugosoannulata* [7—13]. В отличие от гуматов, получаемых методом щелочной экстракции, продукты биосолюбилизации, образующиеся при росте базидиомицетов в присутствии бурого угля, могут также содержать синтезированные в процессе роста грибов вещества ароматической природы (гуминоподобные вещества, меланины) и соединения, обладающие окислительно-восстановительной и биологической активностью. Однако исследования по оценке биологических свойств продуктов биосолюбилизации, насколько нам известно, не проводились.

Целью работы было изучение ростстимулирующей и детоксицирующей способности биопрепаратов на основе культуральной жидкости (КЖ), получаемой при биосолюбилизации бурого угля базидиомицетами белой гнили.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объекты исследования. В результате предварительного скрининга базидиомицетов — возбудителей белой гнили в качестве объекта исследований были отобраны штаммы *Trametes hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pil. 072 и *Trametes maxima* (Mont.) David & Rajchenb 0275 — продуценты высокоактивных лакказ и пероксидаз. Ранее было показано, что эти штаммы обладают высоким делигнифицирующим потенциалом при росте на труднодеградируемых лигноцеллюлозных субстратах [14]. Оба штамма были взяты из коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН [15]. Штаммы хранили на агаризованных скошенных средах, которые готовили путем разбавле-

ния сула водой в объемном соотношении 1:4 с добавлением 2% агара (Helicon, Россия) при температуре 4°. При хранении без пересева в течение 6—12 мес культура не теряла биосинтетическую активность. Образец бурого угля был получен из Солнцевского буроугольного месторождения (Сахалинская область, РФ).

Жидкофазное культивирование базидиомицетов с бурым углем. При выращивании посевного материала в колбу объемом 750 мл, содержащую керамические бусы диаметром 5—7 мм (Carl Roth, ФРГ) и 150 мл питательной среды, pH 6,0, вносили фрагменты мицелия со скошенного агара и культивировали поверхностным способом при 26—27° в течение 6—8 сут. Культивирование базидиомицетов осуществляли на среде следующего состава, г/л: глюкоза — 10,0; пептон («Дифэм», Россия) — 3,0; KH_2PO_4 — 0,6; $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; K_2HPO_4 — 0,4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,0005; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,5 (все соли фирмы «Химмед», Россия, марки «х.ч.» и «ос.ч.») [14].

Далее посевной материал измельчали с помощью керамических бус, находящихся в колбе, и пересевали на среды, содержащие бурый уголь. В работе использовали как полную питательную среду (далее по тексту богатая среда), так и среду, не содержащую легкодоступный источник углерода — глюкозу (бедная среда). Богатая среда имела следующий состав, г/л: глюкоза — 10,0; NaNO_3 — 3,0; KH_2PO_4 — 0,6; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; K_2HPO_4 — 0,4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,0005; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,5, CuSO_4 — 0,25, pH до стерилизации 6,0. Бедная среда имела похожий состав, но не включала глюкозу. Для культивирования грибов в присутствии угля в колбы емкостью 750 мл вносили 25 мл инокулята, 200 мл питательной среды и 20 г измельченного бурого угля с размером частиц ≤ 1 мм. Культивирование базидиомицетов проводили на капроновой сетке, лежащей на поверхности среды (для последующего отделения мицелия), в темной аэрируемой камере в течение 30 сут при 28°. Стерилизацию угля, питательных сред и капроновых сеток осуществляли путем автоклавирования (120°, 1 атм, 30 мин). В качестве контрольного варианта использовали выращивание базидиомицетов без внесения угля в питательные среды. Опыты проводили в трехкратной повторности.

По окончании ферментации из колб удаляли сетки с выросшей культурой. Далее мицелий промывали и отделяли от сетки, а уголь из КЖ удаляли путем фильтрования. Биомассу мицелия оп-

ределяли весовым методом после высушивания до постоянной массы при температуре 105°. КЖ, содержащую продукты биосолобилизации угля (БП), концентрировали путем ультрафильтрации на мембране с порогом отсечения 5 кДа при давлении 3 Бар (2,961 атм.) и температуре 20°. К концу эксперимента КЖ была сконцентрирована в 10 раз (K = 10). По достижении K = 5 проводили процесс диафильтрации водой (V = 2 л) с последующим концентрированием до K = 10.

Определение активности ферментов лигнолитического комплекса. Активность *лигнинпероксидазы* оценивали по скорости окисления вератрового спирта (Sigma, США) до вератрового альдегида, измеряя снижение поглощения при 310 нм в 0,1 М Na-тарtratном буфере ("Химмед"), pH 3,0 [16].

Активность *Mn-пероксидазы* определяли согласно [17], используя в качестве субстрата Mn²⁺. За единицу активности принимали количество фермента, осуществляющего окисление 1 мкмоль Mn(II) за 1 мин.

Активность *лакказы* определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм, используя в качестве хромогенного субстрата 10 мМ катехол (Sigma) в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 4,5 [18]. За условную единицу активности принимали количество фермента, обеспечивающее увеличение оптической плотности на 1 ед. за 1 мин. Скорость ферментативных реакций регистрировали на спектрофотометрах производства PerkinElmer (США). Перевод величин ферментативной активности в международные единицы (МЕ) проводили с использованием коэффициента экстинкции субстрата.

Ростстимулирующую активность БП оценивали с помощью биотестирования по методу проростков. В качестве тест-культуры использовали мягкую пшеницу *Triticum aestivum* L. сорта «Московская-35». В чашки Петри укладывали по 10 семян пшеницы, добавляли 5 мл исследуемого БП и оставляли в термостате при 24° на 72 ч. После термостатирования у каждого проростка измеряли длину побега и срединного корня. В качестве контроля вместо БП использовали дистиллированную воду.

Детоксицирующую активность БП оценивали на основании проведения лабораторно-вегетационных экспериментов с применением в качестве токсиканта гербицида атразина. Тест-культурой служила пшеница *T. aestivum* сорта «Московская-35». Опыты проводили в вегетационных сосудах, в которые помещали по 10 г перлита (ОАО «Стройперлит», Россия), а затем вносили

20 мл питательной среды Кноппа, г/л: K₂HPO₄ — 0,14; KCl — 0,1; KNO₃ — 0,14; MgSO₄·7H₂O — 1,42; Ca(NO₃)₂·12H₂O — 4,88; FeCl₃·6H₂O — 0,05; pH 5,5. Далее в сосуды последовательно вносили водный раствор гербицида и КЖ. В контрольные варианты, не содержащие гербицид и КЖ, вносили аналогичный объем дистиллированной воды. Концентрация атразина составляла 20 мг/кг перлита. Через сутки после внесения растворов в сосуды помещали пророщенные семена пшеницы в количестве 10 семян на сосуд. Продолжительность культивирования растений составляла 20 дней, освещение — 16 мкМ фотонов/м²/с, фотопериод — 12 ч; полив осуществляли по мере необходимости. Регистрируемыми тест-откликами были эффективность фотосинтеза растений, длина побегов и их сырая биомасса. Эффективность фотосинтеза оценивали по показателю переменной флуоресценции F_v/F_m. Флуоресценцию регистрировали с помощью импульсного флуориметра Imaging-PAM M-series (Heinz Walz, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты по культивированию базидиомицетов *T. hirsuta* и *T. maxima* показали, что во всех исследованных вариантах внесение угля приводит к увеличению биомассы грибов (рис. 1).

Биомасса грибов при культивировании исследованных штаммов на буром угле возрастала в 3—9 раз по сравнению с аналогичным вариантом без внесения угля, что свидетельствует о возможности использования базидиальными грибами угля в качестве источника углерода. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными, указывающими на способность различных базидиальных грибов солубилизировать уголь; в число этих организмов входят *Gymnopus erythropus* [19], *Clitocybula dusenii* и *Nematoloma*

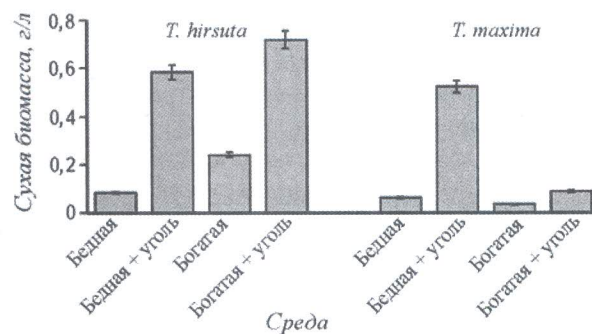


Рис. 1. Биомасса мицелия базидиомицетов *T. hirsuta* и *T. maxima*, культивируемых на бедной и богатой средах в присутствии и в отсутствие угля (повторность трехкратная)

frowardii [20], *Phanerochaete chrysosporium* [21], *T. versicolor* и *Lentinula edodes* [22] и *T. maxima* [23]. Наиболее значительное стимулирование накопления биомассы бурым углем наблюдали в условиях бедной среды, т.е. при отсутствии легкодоступного источника углерода, что, по-видимому, свидетельствует об активизации ферментов лигнолитического комплекса, отвечающих за биодеградацию угля в этих условиях.

Мониторинг активности основных ферментов лигнолитического комплекса (лигнинпероксидаза, Мп-пероксидаза и лакказы) показал, что она имеет сложную динамику и характеризуется наличием от одного до нескольких максимумов и минимумов (данные не приведены) в течение 30 сут. Поэтому для интегральной оценки активности ферментов проводили расчет средней активности за время культивирования (табл. 1). В целом можно сказать, что средняя активность основных ферментов лигнолитического комплекса была выше при культивировании штаммов на богатой среде, чем на бедной (кроме Мп-пероксидазы у *T. maxima*), что связано с ранее проведенной оптимизацией богатой среды для максимально эффективного синтеза ферментов лигнолитического комплекса [24].

Как видно из данных, представленных в табл. 1., *T. hirsuta* и *T. maxima* характеризовались сходной лигнинпероксидазной и лакказной активностью, но различались по Мп-пероксидазной активности, которая была значительно выше у

T. hirsuta при культивировании на всех использованных средах. Максимальная активность Мп-пероксидазы была отмечена при культивировании *T. hirsuta* на богатой среде, где ранее была зафиксирована наибольшая масса мицелия. При этом для всех вариантов с внесением угля наблюдали увеличение биомассы при возрастании Мп-пероксидазной активности, что позволяет предположить ведущую роль этого фермента в процессе биосолоубилизации угля выбранными штаммами.

Активность лигнинпероксидазы, так же как и Мп-пероксидазы, повышалась при внесении в питательную среду бурого угля. Наибольшая активность этого фермента была отмечена при культивировании *T. hirsuta* на богатой среде в присутствии угля, что может указывать на то, что данный фермент также играет определенную роль в биосолоубилизации субстрата. Об этом же свидетельствует снижение соотношения активности Мп-пероксидазы и лигнинпероксидазы в ферментативном комплексе при внесении угля в питательную среду. Для *T. hirsuta* наблюдали снижение указанного показателя с 3,4 до 2,6 при культивировании на бедной среде и с 3,3 до 1,3 — при культивировании на богатой среде. В случае гриба *T. maxima*, характеризующегося более низкой активностью Мп-пероксидазы, аналогичное соотношение в условиях бедной среды варьировало в диапазоне 2,2—1,9, а при культивировании штамма на богатой среде не изменялось и составляло 0,6 (см. табл. 1). Таким

Таблица 1

Интегральная оценка активности основных лигнолитических ферментов за 30 сут культивирования базидиомицетов *T. hirsuta* и *T. maxima* на бедной и богатой средах в присутствии угля и без него (аналитическая ошибка равна 5%)

Среда	Активность, МЕ/мл		
	Лигнинпероксидаза	Мп-пероксидаза	Лакказа
<i>T. hirsuta</i>			
Бедная	2,26	7,78	0,12
Бедная + уголь	5,03	13,27	0,03
Богатая	5,47	17,88	0,26
Богатая + уголь	14,96	19,04	0,17
<i>T. maxima</i>			
Бедная	3,30	7,41	0,02
Бедная + уголь	4,02	7,59	0,01
Богатая	3,66	2,18	0,21
Богатая + уголь	7,67	5,16	0,05

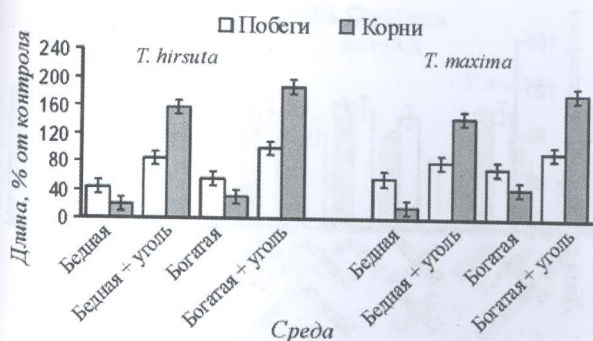


Рис. 2. Влияние БП на основе КЖ базидиомицетов *T. hirsuta* и *T. maxima*, культивируемых на бедной и богатой средах в присутствии угля и без него, на рост корней и побегов пшеницы в условиях биотестирования по методу проростков (n = 30)

образом, при внесении угля в питательную среду происходит увеличение не только абсолютного, но также и относительного содержания лигнинпероксидазы в ферментативном комплексе исследуемых базидиальных грибов.

Активность лакказы, напротив, снижалась при культивировании базидиомицетов в присутствии угля. Причиной данного эффекта является, по-видимому, взаимодействие с ферментом образующихся при биосольюбилизации угля гуминовых соединений, приводящее либо к снижению активности лакказы, либо к заниженным значениям активности фермента при ее определении в присутствии интерферирующих ГВ [25].

Таким образом, полученные данные указывают на преобладание в ферментативном комплексе исследуемых базидиомицетов Mn-пероксидазы и лигнинпероксидазы, а также на их ведущую роль в биосольюбилизации угля: внесение в питательную среду бурого угля индуцирует их продукцию, а конкретное соотношение этих энзимов в ферментативном комплексе определяется физиолого-биохимическими особенностями штамма.

Ранее нами было показано [23], что в процессе биосольюбилизации угля под действием *T. hirsuta* и *T. maxima* ГВ угля одновременно подвергаются процессам как деструкции, так и конденсации. На основании сравнительного физико-химического анализа исходных и трансформированных грибами ГВ было установлено, что общее направление их модификации определяется физиолого-биохимическими особенностями штамма. Следовательно, можно предположить, что КЖ изучаемых штаммов могут обладать различной биологической активностью. Поэтому далее проводили оценку ростстимулирующей и детоксицирующей активности полученных БП.

Оценка показала, что БП на основе КЖ *T. hirsuta* и *T. maxima*, выращиваемых без угля, обладают выраженной ингибирующей активностью по отношению к побегам и корням проростков пшеницы (рис. 2).

Полученные результаты хорошо согласуются с оценкой токсичности аналогичных БП, проведенной ранее на четырех стандартизованных тест-культурах разной таксономической принадлежности [26]. На основании проведенных исследований авторы пришли к выводу, что токсичность БП была обусловлена метаболитами базидиомицетов, выделяемыми в процессе роста.

В настоящей работе было впервые показано, что внесение в питательную среду угля приводит к снижению токсичности БП по отношению к побегам: БП на основе КЖ базидиомицетов, выращиваемых на бедной среде в присутствии угля, снижали длину побегов лишь до 80—84% от контрольной величины, а выращиваемых на богатой среде восстанавливали 100%-ную величину побегов. Одновременно с этим наблюдали выраженный стимулирующий эффект БП, полученных на основе КЖ в присутствии угля, по отношению к корням. При проращивании пшеницы на БП на основе КЖ *T. hirsuta* длина корней составляла 157—187% от контрольной. Аналогичные величины для БП на основе КЖ *T. maxima* лежали в диапазоне 144—179% от контроля. Можно предположить, что под действием базидиальных грибов происходит биосольюбилизация угля с выделением в раствор ГВ, которые стимулируют рост корней. Полученные результаты хорошо согласуются с существующими данными о преимущественно положительной активности гуминовых соединений, особенно их низкомолекулярных фракций, по отношению к корням [27].

Тестирование БП в условиях лабораторно-вегетационного эксперимента показало отсутствие у них токсичности по отношению к растениям (рис. 3). Длина и масса растений пшеницы, выращенных в присутствии БП на основе КЖ грибов *T. hirsuta*, практически не отличались от контрольных. Исключение составил препарат, полученный при культивировании гриба на богатой среде в отсутствие угля: внесение этого БП привело к снижению длины и массы растений до 80 и 60%, соответственно.

БП на основе *T. maxima* обладали умеренным стимулирующим действием: длина растений, выращенных в присутствии БП на основе КЖ на бедной среде без угля, составила 114% от длины контрольных растений, а масса — 138%.

Таким образом, оценка стимулирующей активности БП на основе КЖ без угля показала, что по-

лучаемые БП ингибируют рост побегов и корней пшеницы на стадии прорастания, однако не влияют на дальнейший рост растений или даже стимулируют его. При культивировании базидиомицетов в присутствии угля получаемые БП обладают способностью стимулировать корни проростков. На более поздней стадии развития растений БП на основе *T. hirsuta* не влияет на рост пшеницы, а на основе *T. maxima* — обладает умеренным стимулирующим действием.

Оценку детоксицирующего потенциала БП проводили с использованием в качестве токсиканта атразина — гербицида, принадлежащего к классу сим-триазинов и являющегося специфическим ингибитором фотосинтезирующей системы (ФСП). Выступая как синтетический аналог пластохиона, атразин блокирует перенос электрона по электронтранспортной цепи (ЭТЦ), снижая количество его первичных акцепторов. В дальнейшем это приводит к уменьшению показателя переменной флуоресценции F_v/F_m (см. "Условия эксперимента"), характеризующего квантовую эффективность первичной фотосинтетической реакции. Поэтому токсичность атразина в процессе роста можно оценивать по интенсивности флуоресценции хлорофилла, не повреждая при этом растение. Следует, однако, отметить, что снижение относительной флу-

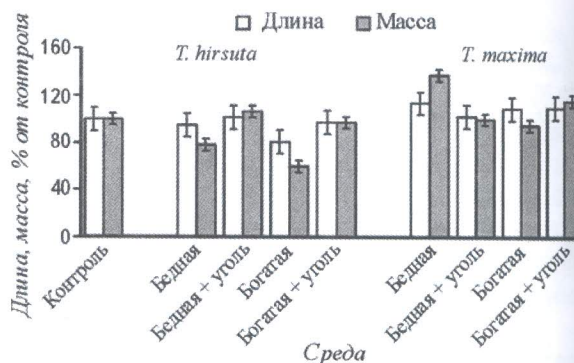


Рис. 3. Влияние БП на основе КЖ базидиомицетов *T. hirsuta* и *T. maxima*, культивируемых на бедной и богатой средах в присутствии угля и без него, на рост пшеницы в условиях лабораторно-вегетационного эксперимента (n = 10 (длина) или n = 3 (масса))

оресценции может происходить вследствие действия как специфических ингибиторов фотосинтеза, так и токсикантов с другим механизмом действия. Уменьшение F_v/F_m характеризуется определенной временной задержкой и может быть обусловлено не только изменением состояния ЭТЦ, но и нарушением других важнейших процессов жизнедеятельности, например, синтеза белка [28]. Результаты измерения переменной флуоресценции хлорофилла приведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние БП на основе КЖ базидиомицетов *T. hirsuta* и *T. maxima*, культивируемых на бедной и богатой средах в присутствии угля и без него, на переменную флуоресценции хлорофилла пшеницы (детоксикацию гербицида атразина) в условиях вегетационного эксперимента

Среда	F_v/F_m	
	Без атразина	В присутствии атразина
Контроль (без БП)	0,67±0,02*	0,05±0,02
<i>T. hirsuta</i>		
Бедная	0,67±0,05	0,08±0,04
Бедная + уголь	0,71±0,01	0,08±0,01
Богатая	0,73±0,02	0,11±0,03
Богатая + уголь	0,69±0,04	0,13±0,04
<i>T. maxima</i>		
Бедная	0,71±0,01	0,06±0,03
Бедная + уголь	0,71±0,03	0,08±0,02
Богатая	0,70±0,05	0,12±0,03
Богатая + уголь	0,69±0,02	0,20±0,04

* Стандартное отклонение, n = 3.

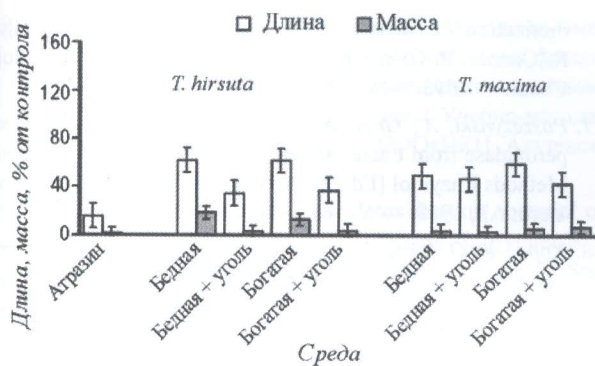


Рис. 4. Влияние БП на основе КЖ базидиомицетов *T. hirsuta* и *T. maxima*, культивируемых на бедной и богатой средах в присутствии угля и без него, на рост пшеницы в присутствии атразина в условиях лабораторно-вегетационного эксперимента (n = 10 (длина) или n = 3 (масса))

Как видно из данных, представленных в табл. 2, в присутствии атразина происходило резкое снижение F_v/F_m с 0,67 до 0,05, что указывает на высокую токсичность гербицида в выбранных условиях. В то же время, внесение БП не влияло на эффективность фотосинтеза растений при их выращивании без атразина. Однако в присутствии гербицида исследуемые БП, полученные на основе КЖ грибов, выращиваемых на богатой среде, способствовали частичному восстановлению фотосинтетической активности растений. Это свидетельствует о детоксицирующей активности исследуемых БП по отношению к атразину. По всей видимости, наблюдаемый эффект обусловлен присутствием в БП ферментов лигнолитического комплекса, выделяемых базидиомицетами в процессе роста и участвующих в деградации атразина. В частности, ранее была установлена роль лакказы и в меньшей степени Мп-пероксидазы в разложении этого гербицида такими базидиальными грибами как *Coriolus hirsutus*, *Corioloopsis fulvocinerea* и *Cerrena maxima* [29].

Анализ длины и биомассы растений, проведенный после окончания эксперимента, подтвердил наличие детоксицирующей способности исследуемых БП (рис. 4).

Внесение БП на основе КЖ *T. hirsuta* привело к увеличению длины растений с 16% (в присутствии атразина) до 35—62% от контрольных значений, а массы растений — с 1% (с атразином) до 3—18%. Аналогичные значения для *T. maxima* составили 43—59% и 3—8%, соответственно. Более выраженный детоксицирующий эффект в среднем был отмечен для БП, полученных на основе КЖ *T. maxima*, что совпадает с ранее отмеченным возрастанием ферментативной активности в этих условиях (см. табл. 1). При этом внесение угля в

среду для культивирования, которое приводило к снижению лакказной активности в БП, одновременно сопровождалось снижением их детоксицирующего потенциала. Полученные результаты продемонстрировали выраженную детоксицирующую активность БП по отношению к атразину, возможно, связанную с присутствием в них лакказы.

Таким образом, проведенное исследование показало способность базидиальных грибов *T. hirsuta* и *T. maxima* сольубилизовать бурый уголь, обусловленную выделяемыми ими ферментами лигнолитического комплекса, такими как Мп-пероксидаза и лигнинпероксидаза. Оценка стимулирующей активности БП на основе КЖ грибов без угля показала, что получаемые БП ингибируют рост побегов и корней пшеницы на стадии прорастания, однако не влияют на дальнейший рост растений (*T. hirsuta*) или даже стимулируют его (*T. maxima*). При культивировании базидиомицетов в присутствии угля получаемые БП обладают способностью стимулировать рост корней проростков; на более поздней стадии развития растений БП не влияют на рост растений (*T. hirsuta*) или стимулируют его (*T. maxima*). Установлена выраженная детоксицирующая способность БП по отношению к атразину, связанная, по-видимому, с присутствием в них лакказы. Полученный препарат БП на основе КЖ *T. maxima*, выращенного на богатой среде в присутствии угля, является перспективным для дальнейшего исследования с целью использования в сельском хозяйстве в качестве стимулятора роста растений, в том числе на территориях с повышенной техногенной нагрузкой.

Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 годы». (Заявка № 2012-1.2.1-12-000-1013-066, Соглашение № 8111).

Получено 6.03.13

ЛИТЕРАТУРА

- Христева Л.А., Солоха К.И., Горюва А.И. Об общности и различиях в действии гумусовых физиологически активных веществ на растение, о его природе и некоторых агрономических аспектах их использования: Мат. Всес. науч. конф. «Теоретические основы действия физиологически активных веществ и эффективность удобрений их содержащих». — Днепропетровск: Проминь, 1967. — С. 14—26.
- Попов А.И. Гуминовые вещества. Свойства, строение, образование. — С.-Петербург: Изд-во С.-Петербургского университета, 2004. — 248 с.

3. Hofrichter, M. Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. II. The ligninolytic enzymes of the coal-humic-acid-depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii* b19 / M. Hofrichter, W. Fritsche // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1997. — V. 47. — P. 419—424.
4. Solarska, S. Isolation and screening of natural organic matter-degrading fungi / S. Solarska, T. May, F.A. Roddick, A.C. Lawrie // Chemosphere. — 2009. — V. 75. — N. 6. — P. 751—758.
5. Gramss, G. Degradation of soil humic extract by wood- and soil-associated fungi, bacteria, and commercial enzymes / G. Gramss, D. Ziegenhagen, S. Sorge // Microb. Ecol. — 1999. — V. 37. — N. 2. — P. 140—151.
6. Rezacova, V. Modifications of degradation-resistant soil organic matter by soil saprobic microfungi / V. Rezacova, H. Hrselova, H. Gryndlerova, I. Miksik, M. Gryndler // Soil Biol. Biochem. — 2006. — V. 38. — N. 8. — P. 2293—2299.
7. Cohen, M.S. Degradation of coal by the fungi *Polyporus versicolor* and *Poria monticola* / M.S. Cohen, P.D. Gabriele // Appl. Environ. Microbiol. — 1982. — V. 44. — P. 23—27.
8. Fakoussa, R.M., Willmann, G. Biochemical and enzymatic studies of the active compounds in solubilization/liquefaction of hard coal and lignite: Proc. of 1st International Symposium on Biological Processing of Coal. — Orlando, USA: University of Central Florida, 1990. — P. 3—13.
9. Catcheside, D.E.A. Solubilization of Australian lignites by fungi and other microorganisms / D.E.A. Catcheside, K.J. Mallet // Energy Fuels. — 1991. — V. 5. — P. 141—145.
10. Monistrol, I.F. Liquefaction and/or solubilization of Spanish coal by newly isolated microorganisms / I.F. Monistrol, L.F. Laborda // Fuel Proc. Technol. — 1994. — V. 40. — P. 205—216.
11. Holker, U. Growth substrates control the ability of *Fusarium oxysporum* to solubilize coal / U. Holker, R.M. Fakoussa, M. Hofer // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1995. — V. 44. — P. 351—355.
12. Wadhwa, G. Sharma Microbial pretreatment of coals: A tool for solubilization of lignite in organic solvent — quinoline / G. Wadhwa, D.K. Sharma // World J. Microbiol. Biotechnol. — 1998. — V. 14. — P. 751—763.
13. Hatakka, A. Biodegradation of lignin: Biopolymers. Lignin, humic substances and coal [Eds. M. Hofrichter, A. Steinbüchel]. — Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2001. — V. 1. — N. 1. — P. 129—180.
14. Koroleva-Skorobogat'ko, O. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis / O. Koroleva-Skorobogat'ko, E. Stepanova, V. Gavrilova, O. Morozova, N. Lubimova, A. Dzchafarova, A. Yaropolov, A. Makower // J. Biotechnol. Appl. Biochem. — 1998. — V. 28. — N. 1. — P. 47—54.
15. Сивочуб О.А. Каталог культур базидиомицетов Коллекции Ботанического Института им. В.Л. Комарова РАН. — С.-Пб.: Наука, 1992. — 25 с.
16. Marzullo, L. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates / L. Marzullo, R. Cannio, P. Giardina, M.T. Santini, G. Sannia // J. Biol. Chem. — 1995. — V. 270. — P. 3823—3827.
17. Paszczyński, A., Grawford, R.L., Huynh, V.-B. Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrisosporium*: Purification: Methods Enzymol [Eds. W.A. Wood, S.T. Kellogg]. — New York: AP, 1988. — V. 161. — P. 264—271.
18. Королева О.В. Выделение и изучение некоторых свойств лакказы из базидиомицета *Cerrena maxima* / О.В. Королева, И.С. Явметдинов, В.Г. Шлеев, Е.В. Степанова, В.П. Гаврилова // Биохимия. — 2001. — Т. 66. — С. 618—622.
19. Snajdr, J. Transformation of C-14-labelled lignin and humic substances in forest soil by the saprobic basidiomycetes *Gymnopus erythropus* and *Hypholoma fasciculare* / J. Snajdr, K.T. Steffen, M. Hofrichter, P. Baldrian // Soil Biol. Biochem. — 2011. — V. 42. — N. 9. — P. 1541—1548.
20. Hofrichter, M. Degradation of lignite (low-rank coal) by ligninolytic basidiomycetes and their manganese peroxidase system / M. Hofrichter, D. Ziegenhagen, S. Sorge, R. Ullrich, F. Bublitz, W. Fritsche // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — V. 52. — N. 1. — P. 78—84.
21. Kabe, Y. Decolorization of coal humic acid by extracellular enzymes produced by white-rot fungi / Y. Kabe, T. Osawa, A. Ishihara, T. Kabe // Coal Prep. — 2005. — V. 25. — N. 4. — P. 211—220.
22. Gotz, G.K.E. Fungal biosolubilization of Rhenish brown coal monitored by Curie-point pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry using tetraethylammonium hydroxide / G.K.E. Gotz, R.M. Fakoussa // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — V. 52. — N. 1. — P. 41—48.
23. Кляйн О.И. Трансформация гуминовых веществ высокоокисленного бурого угля базидиальными грибами *Trametes hirsuta* и *Trametes maxima* / О.И. Кляйн, Н.А. Куликова, А.И. Константинов, Т.В. Фёдорова, Е.О. Ландесман, О.В. Королёва // Прикл. биохим. микробиол. — 2013. — № 3. — С. 49—56.
24. Koroleva, O.V. Laccase and Mn-peroxidase production by *Coriolus hirsutus* strain 075 in a jar fermenter / O.V. Koroleva, E.V. Stepanova, V.P. Gavrilova, N.S. Yakovleva, E.O. Landesman, I.S. Yavmetdinov, A.I. Yaropolov. // J. Biosci. Bioeng. — 2002. — V. 93. — N. 5. — P. 449—455.
25. Eichlerova, I. Laccase activity in soils: Considerations for the measurement of enzyme activity / I. Eichlerova, J. Snajdr, P. Baldrian // Chemosphere. — 2012. — V. 88. — N. 10. — P. 1154—1160.
26. Терехова В.А. Грибные препараты для деградации лигнинсодержащих отходов: оценка биобезопасности / В.А. Терехова, О.В. Королева, А.А. Рахлеева, Н.А. Куликова, Е.О. Ландесман, О.И. Кляйн // Теор. прикл. экол. — 2012. — № 3. — С. 19—23.
27. Canellas, L.P. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots / L.P. Canellas, F.L. Olivares, A.L. Okorokova-Facanha, A.R. Facanha // Plant Physiol. — 2002. — V. 130. — N. 4. — P. 1951—1957.

28. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Рубин А.Б. Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты. Учебно-методическое пособие. — М.: Изд-во ООО«ПКЦ Альтекс», 2012. — 138 с.
29. Gorbatoва, O.N. Increase of the detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis / O.N. Gorbatoва, O.V. Koroleva, E.O. Landesman, E.V. Stepanova, A.V. Zherdev // Appl. Biochem. Microbiol. — 2006. — V. 42. — N. 4. — С. 414—419.

O.I. KLEIN¹, N.A. KULIKOVA³, E.V. STEPANOVA¹,
O.I. FILIPPOVA², T.V. FEDOROVA¹, L.G. MALOSHENOK¹,
I.S. FILIMONOV³, and O.V. KOROLEVA^{1,*}

¹ The Bach Institute for Biochemistry, Russ. Acad. Sci., 119071, Moscow Russia

² The Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow Russia

³ The International Education-Research Center of Biotechnology, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow Russia

e-mail: koroleva@inbi.ras.ru

Obtaining and Characteristics of Biologically Active Products of Brown Coal Solubilization by White Mold Basidial Fungi

A biosolubilizing activity of *Trametes hirsuta* and *T. maxima* basidiomycetes towards brown coal during liquid-phase cultivation has been studied. The degrading capacity of the studied fungi was demonstrated to be ensured by the activity of ligninolytic enzymes of Mn-peroxidase and lignin-peroxidase. A growth-stimulating capacity of the biopreparations (BPs) based on the culture liquids of the studied strains grown in a complete or limited medium was assessed. The obtained BPs were shown to inhibit wheat shoots and roots at the germination stage, but the later stages of plant development are either not suppressed or even stimulated by the BPs. After the basidiomycetes were cultivated in the presence of brown coal, the obtained BPs stimulated the root growth at the germination stage and either did not influence the plant growth (BP derived from the *T. hirsuta* culture liquid) or stimulated it (BP derived from *T. maxima* culture liquid) at the later stages of the plant development. A pronounced detoxifying ability of the BPs in respect of an atrazine herbicide was observed. This activity was presumably related to the occurrence of laccases in the studied BPs.

Key words: biosolubilization, brown coal, ligninolytic enzymes, *Trametes hirsuta*, *Trametes maxima*.

* Author for correspondence.