

На правах рукописи

КАСАТОВА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**АКТИВНОСТЬ ЭКЗООКСИДОРЕДУКТАЗ
МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В СВЯЗИ
С БИОДЕСТРУКЦИЕЙ ИМИ
ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ**

03.01.04 –биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2011

Работа выполнена на кафедре биохимии и физиологии растений ФГБОУ ВПО
“Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского”.

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор
Смирнов Василий Филиппович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Обухова Лариса Михайловна

доктор медицинских наук,
Зимин Юрий Викторович

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Мордовский
государственный университет им.
Н.П. Огарева»

Защита состоится " ____ " _____ г. в ____ часов на заседании
диссертационного совета Д 212.166.15 Нижегородского государственного
университета им Н.И. Лобачевского по адресу 603950, Нижний Новгород, пр.
Гагарина, 23, корп. 1, биологический факультет.

e-mail: laser.85@mail.ru

fax: 8-(831)462-30-85

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского
государственного университета им Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2011г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

С.В. Копылова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

В настоящее время является актуальной проблема биодegradации синтетических и природных промышленных полимеров микроскопическими грибами. Одним из главных ее аспектов является исследование биохимических основ деструктивного процесса. Установлено, что происходящее в ходе деструкции изменение физико-химических свойств материалов обусловлено преимущественно реакциями окисления и гидролиза (Tirpak, 1969). Интенсивность роста микромицетов и степень повреждения ими материала определяются как наличием или отсутствием в нем химических компонентов, способных поддерживать рост микромицетов, так и биохимическими особенностями биодеструкторов, в частности, наличием у них ферментных систем, позволяющих утилизировать различные синтетические и природные питательные субстраты (Ali et al., 2009). Как следствие, знание негрибостойких составляющих полимера позволяет предполагать участие тех или иных групп ферментов в процессе его дегradации грибами (Aamer et al., 2008). При этом нахождение новых путей увеличения или снижения активности этих ферментов, а также изменения их продукции микромицетами при росте в присутствии различных полимеров может способствовать решению проблем ресурсосбережения, а также повышению степени экологической безопасности промышленных производств (Ali et al., 2009).

Внеклеточные оксидоредуктазы (в частности пероксидазы, каталазы и фенолоксидазы) мицелиальных грибов в настоящее время активно исследуются как в связи с проблемой биодеструкции материалов, так и в связи с вопросами биоутилизации ксенобиотиков. Это связано с тем, что данные ферменты с одной стороны способны осуществлять окисление химических группировок широкого диапазона органических соединений, а с другой стороны могут повышать устойчивость грибов к внешним воздействиям (Головлева, Мальцева, 1987). Наиболее подробно изучены оксидоредуктазы базидиальных грибов, в то время как литературные данные, касающиеся данных ферментов у дейтеромицетов, крайне противоречивы (Рабинович и др., 2004). При этом известно, что жизнедеятельность последних имеет важнейшее значение для протекания начальных этапов биодеструктивного процесса и подготовки компонентов материала к утилизации другими группами организмов-деструкторов (Головлева, Мальцева, 1987). В настоящее время открытыми остаются вопросы, касающиеся продуцирования, механизмов работы, путей активации и ингибирования, а также роли в деструкции различных органических соединений экзооксидоредуктаз данных грибов.

Цель исследования

Целью представленной работы являлось исследование возможности участия пероксидазы, фенолоксидазы и каталазы микромицетов-биодеструкторов в процессе биоповреждения природных и синтетических

полимеров, а также изучение влияния ряда химических соединений и слабого импульсного магнитного поля на активность данных ферментов.

Задачи исследования

1. Определить видовой состав и выявить наиболее активных микодеструкторов материалов, в деградации компонентов которых могут принимать участие внеклеточные оксидоредуктазы.
2. Установить оптимальные значения pH среды и изучить динамику пероксидазной, фенолоксидазной и каталазной активности микромицетов-активных деструкторов данных полимеров.
3. Определить возможность участия исследуемых экзооксидоредуктаз в разрушении синтетических и природных полимеров.
4. Исследовать действие химических и физических факторов (фунгицидов “Катон LXE” и “Экодез”, сульфата меди (II), слабого импульсного магнитного поля) на пероксидазную, фенолоксидазную и каталазную активность изучаемых грибов.

Научная новизна работы

Исследована динамика активности внеклеточных пероксидазы, каталазы и фенолоксидазы *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* и *Penicillium ochrochloron*, а также выявлены оптимальные для ее проявления значения pH реакционной среды.

Впервые показана возможность участия пероксидазы, фенолоксидазы и каталазы гриба *A. terreus* в деструкции ПВХ-композиций, включающих природные компоненты, а также выявлены химические соединения, способные регулировать уровень активности данных ферментов.

Впервые показано воздействие слабого импульсного магнитного поля на пероксидазную, каталазную и фенолоксидазную активность микромицета *T. viride*, зависимость которой от длительности экспозиции является нелинейной.

Научно-практическая значимость

Полученные результаты расширяют теоретические представления о биохимических механизмах начальных этапов биодеструкции полимеров природного и синтетического происхождения, а также могут служить базой для разработки научно-обоснованных и целенаправленных принципов как защиты полимерных композиций от микробиологической деградации, так и биоутилизации отходов промышленных производств.

На защиту выносятся следующие положения

1. Деструкция ПВХ-композиций, включающих природные компоненты, может быть связана с участием пероксидазы, фенолоксидазы и каталазы мицелиальных грибов.
2. Воздействие слабого импульсного магнитного поля (1,5 мТл, 15Гц) в зависимости от длительности экспозиции может способствовать как

снижению, так и повышению уровня пероксидазной и фенолоксидазной активности микромицетов.

3. Некоторые химические соединения (CuSO_4 , фунгициды “Катон LXE” и “Экодез”) могут быть использованы в качестве регуляторов активности внеклеточных пероксидазы, каталазы и фенолоксидазы грибов-биодеструкторов, что в конечном итоге позволит изменять степень биостойкости полимерных композиций.

Апробация работы и публикации

Материалы диссертационного исследования были доложены на научно-практических конференциях “Ломоносов-2009” (Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, Москва, 2009), “Экотоксикология-2009. Современные биоаналитические системы, методы и технологии” (Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи, Пущино, 2009), “Биотехнология: экология крупных городов” (Международная научно-практическая конференции, Москва, 2010).

По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 2 – в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Основной текст изложен на страницах, включая таблиц, рисунков. Список литературы включает источники, в том числе на иностранных языках.

Личный вклад автора

Автор лично провел все экспериментальные исследования по изучению экзооксидоредуктазной активности микромицетов, а также анализ, обобщение и статистическую обработку полученных результатов.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. В.Ф. Смирнову, за мудрые советы, поддержку и терпение. Автор работы признателен д.б.н. Н.А Беловой (ИТЭБ РАН), любезно предоставившей генератор магнитного поля для проведения исследований. Слова сердечной благодарности автор направляет в адрес сотрудников ОБИ НИИХ, а также преподавателей и сотрудников кафедры биохимии и физиологии растений за постоянную поддержку и понимание и отдельно благодарит к.б.н. И.В Стручкову, к.б.н. Ю.В. Синецыну, д.п.н. К.Д. Дятлову, к.б.н. Л.Н. Олюнину, к.б.н. В.С. Сухова и Н.А. Леньшину за проявленное участие, помощь и ценные замечания на всех этапах выполнения работы. Работа выполнена в рамках программы АВЦП (проект № 2.1.2/1056).

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В данной главе анализируются данные отечественной и зарубежной научной литературы, касающиеся функционирования оксидоредуктаз грибов-биодеструкторов, включая механизмы их продукции, пути активации и ингибирования, а также участия в деструкции различных органических соединений. В обзоре литературы также рассматриваются современные представления о механизмах действия магнитных полей на метаболические процессы живых организмов, в частности, грибов.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Материалы исследования

Объектами исследования являлись штаммы микроскопических грибов, рекомендованные ГОСТ 9.049-91 для определения грибостойкости полимерных материалов (*Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium martensii*, *Penicillium ochro-chloron*, *Trichoderma coningii*, *Trichoderma viride*), полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

2.2. Методы исследования

Исследуемые грибы поддерживались на косяках с твердой питательной средой Чапека-Докса методом периодического пересева. При проведении микробиологических тестов грибы выращивались на твердой питательной среде Чапека-Докса в чашках Петри. Грибостойкость определялась по ГОСТ 9.049-91.

Сублетальные концентрации (конечные концентрации в среде, ингибирующие рост колоний на 50-80%) CuSO_4 , “Катона LXE” (действующие вещества: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он и 2-метил-4-изотиазолин-3-он) и “Экодеза” (алкилдиметилбензиламмония хлорид) определялись экспериментально посредством оценки средней скорости роста колоний путем измерения их диаметра.

Для проведения биохимических анализов культуры грибов выращивались на качалках, обеспечивающих встряхивание колб со скоростью 200 об/мин в стерильных колбах Эрленмейера на жидкой, обедненной по углероду, питательной среде Чапека-Докса (ОПС), а также на ряде модифицированных питательных сред на ее базе. После окончания культивирования культуральную жидкость отделяли от мицелия путем фильтрования. Для последующих исследований использовалась как культуральная жидкость, так и мицелий.

Слабое импульсное магнитное поле (СИМП) получали с помощью источника VL 2 (пачки по 20 импульсов с амплитудой 1,5 мТл, следующие с частотой 15 Гц), предоставленного лабораторией биофизики внутриклеточной регуляции ИТЭБ РАН.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически (СФ-2000): каталазы – по убыли H_2O_2 ($\lambda=240$ нм) (Li, Shellhorn, 2007), фенолоксидазы – по окислению п-фенилендиамина ($\lambda=535$ нм) (Flurkey et al., 1995), пероксидазы – по окислению п-фенилендиамина в присутствии H_2O_2 (Nagaraya et al., 2009). За условную единицу (у.е.) активности ферментов принимали изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 минуту в пересчете на 1 мг белка в контроле.

Содержание белка в культуральной жидкости и в мицелии определяли по методу Лоури-Фолина (Досон и др., 1991).

Содержание диеновых (ДК) и триеновых конъюгатов (ТК) в мицелии оценивали спектрофотометрически при $\lambda=232$ нм и $\lambda=275$ нм соответственно (Камышников, 2000). Определение содержания малонового альдегида (МДА) проводили по реакции с тиобарбитуровой кислотой ($\lambda=532$ нм) (Стальная, Гаришвили 1977).

Полученные экспериментальные данные были статистически обработаны с помощью программы “Microsoft Excel”. Для установления достоверности различий использовали t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде средних значений с указанием средней квадратичной ошибки. Для оценки статистической значимости различий использовали уровень вероятности $p<0.05$.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Выявление наиболее активных микодеструкторов полимерных материалов различных групп

Был определен видовой состав микромицетов, участвующих в биоповреждении как широко используемых промышленных полимеров, так и экспериментальных композиций на основе поливинилхлорида (ПВХ), впервые синтезированных в НИИ химии ННГУ (табл. 1). В данном эксперименте исследовались материалы, в состав которых входят компоненты, химическое строение которых позволяет предполагать участие в деструктивном процессе, наряду с другими экзометаболитами, и внеклеточных оксидоредуктаз микромицетов.

Было установлено, что наиболее грибостойкими являлись ПВХ, эпоксидные компаунды, наименее – древесина и ДСП, а наиболее активными деструкторами исследуемых материалов являются *A. terreus*, *A. niger*, *T. viride* и *P. ochro-chloron*. Для дальнейших биохимических исследований были выбраны *A. terreus*, *T. viride*, так как только они были способны расти на ПВХ-содержащих полимерах, включающих природные компоненты и представляющих особый интерес для изучения биохимических механизмов процесса начальной биодеструкции материалов микромицетами.

Таблица 1

**Видовой состав активных микодеструкторов
различных групп полимерных материалов**

Материалы	Грибостойкость	Активные микодеструкторы
Эпоксидные компаунды (эпоксидные смолы)	+	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium ochro-chloron</i>
Пара-арамидное волокно (полиамиды)	++	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Trichoderma viride</i>
Бутилкаучук (эластомеры)	+++	<i>Aspergillus niger</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Chaetomium globosum</i> <i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium ochro-chloron</i>
ДСП	+++	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium ochro-chloron</i>
Древесина	+++	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Trichoderma coningii</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Penicillium ochro-chloron</i>
ПВХ*	-	-
ПВХ: хитозан	++	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium martensii</i> <i>Fusarium moniliforme</i>
ПВХ: древесина	++	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Penicillium funiculosum</i> <i>Trichoderma viride</i>

*- по литературным данным,

+ - грибостойкость до 2 баллов (низкая степень повреждения материала),

++ - грибостойкость 2-3 балла (средняя степень повреждения материала),

+++ - грибостойкость 4 и более баллов (высокая степень повреждения материала).

3.2. Изучение условий, наиболее благоприятных для проявления пероксидазной, фенолоксидазной и каталазной активности микромицетов-биодеструкторов

На данном этапе работы изучалось изменение фенолоксидазной, пероксидазной и каталазной активности *A. terreus* и *T. viride* в зависимости от различных значений pH реакционной среды (рис. 1 а, б), а также исследовалась временная динамика активности этих ферментов (рис. 2).

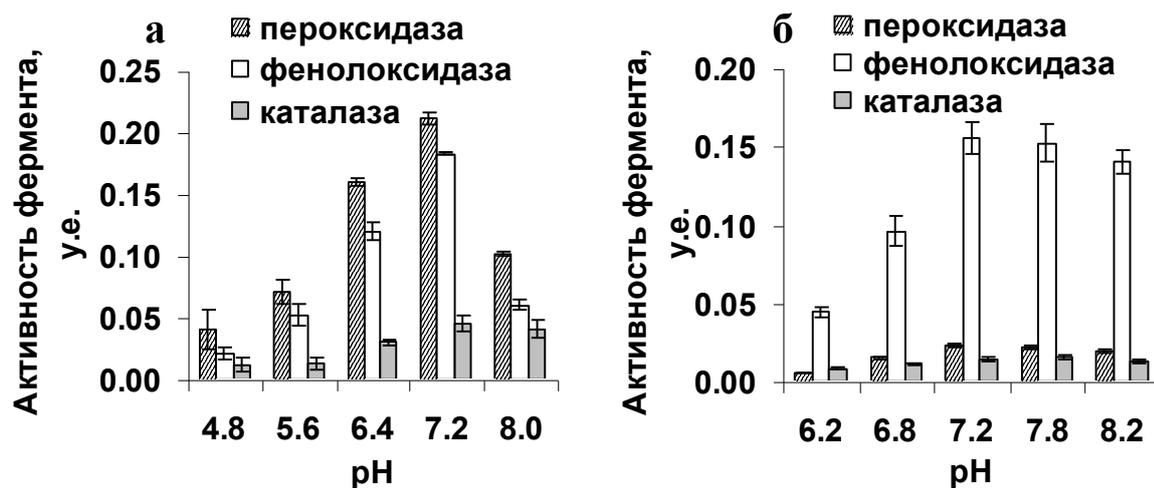


Рис. 1. Изменение пероксидазной, фенолоксидазной и каталазной активности *T. viride* (а) и *A. terreus* (б) в зависимости от различных pH реакционной среды

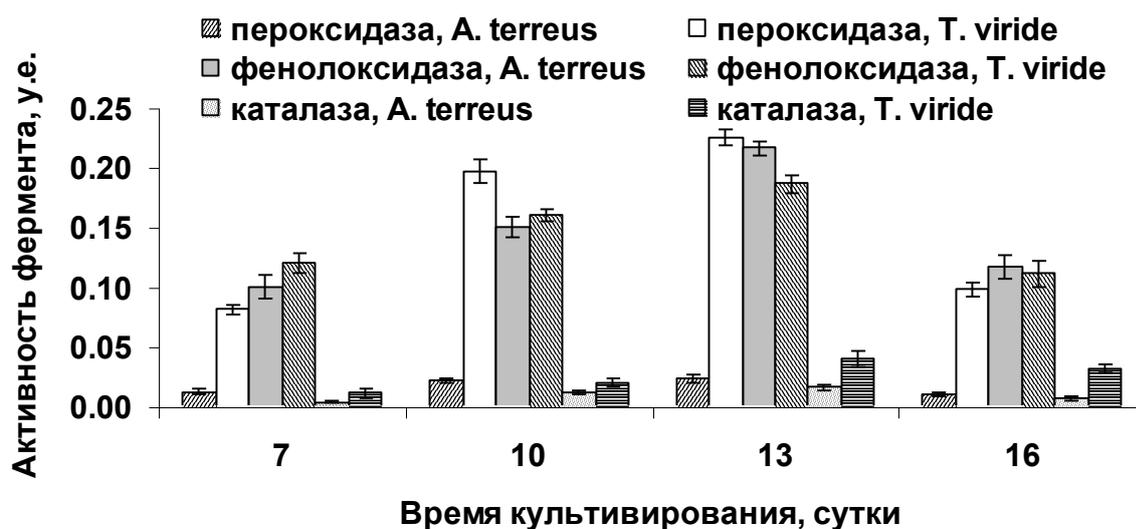


Рис. 2. Изменение пероксидазной, фенолоксидазной и каталазной активности *A. terreus* и *T. viride* в течение периода культивирования

Было установлено, что максимальные значения пероксидазы и фенолоксидазы *T. viride* наблюдаются при pH=7.2; максимальное значение активности каталазы достигается при pH=7.2 и сохраняется при pH=7.8. Благоприятные значения для проявления активности всех исследуемых оксидоредуктаз *A. terreus* находятся в диапазоне 7.2-8.2. Результаты этих экспериментов согласуются с работами Ревина и др. (2000), Куракова и др. (2001), Павловской и др. (2003), Klaus et al. (2004), в которых было установлено, что оптимальные значения pH для каталазы, пероксидазы и фенолоксидазы ряда грибов-биодеструкторов находятся в нейтральной или слабощелочной области.

Максимальный уровень активности исследуемых ферментов *A. terreus* и *T. viride* практически во всех случаях наблюдается на 10-13 сутки культивирования. В связи с этим дальнейшие исследования экзооксидоредуктазной активности грибов проводили именно на этом временном отрезке.

3.3. Влияние компонентов среды культивирования на пероксидазную, фенолоксидазную и каталазную активность микромицетов-биодеструкторов

В настоящее время актуальной является проблема создания полимерных композиций с регулируемой биостойкостью на базе синтетических, в частности ПВХ, и природных, легко разлагаемых микроорганизмами, компонентов. Древесина может быть использована в качестве легко утилизируемого наполнителя для создания таких биоразлагаемых композиций, т.к. практически все ее химические составляющие способны служить источником углерода и энергии для организмов-биодеструкторов. Процесс биодеструкции древесины дейтеромицетами, в том числе родов *Aspergillus* и *Trichoderma*, долгое время связывали, главным образом, с активностью целлюлазного комплекса, разрушающего углеводный компонент древесины, однако экспериментальные данные последних лет говорят о возможности участия ферментов данных грибов и в биодеструкции лигнинового компонента за счет, в том числе, каталазы, пероксидазы и фенолоксидазы (Guillen et al., 2000). В связи с этим на следующем этапе работы изучалась экзооксидоредуктазная активность исследуемых микромицетов при их росте на средах с добавлением ПВХ и древесины (Рис 3, табл.2).

Было установлено, что наибольшее повышение пероксидазной и фенолоксидазной активности исследуемого гриба наблюдается при его росте на опилках древесины сосны, а каталазной активности – на березовых опилках. При росте исследуемого гриба на опилках древесины дуба уровень активности всех исследуемых экзооксидоредуктаз значительно снижался. Такие различия в уровне активности исследуемых оксидоредуктаз могут быть обусловлены различным содержанием лигнина в исследуемых типах древесины, отличиями в его химическом составе, а также присутствием экстрактивных веществ: смол, ароматических спиртов, полифенолов.

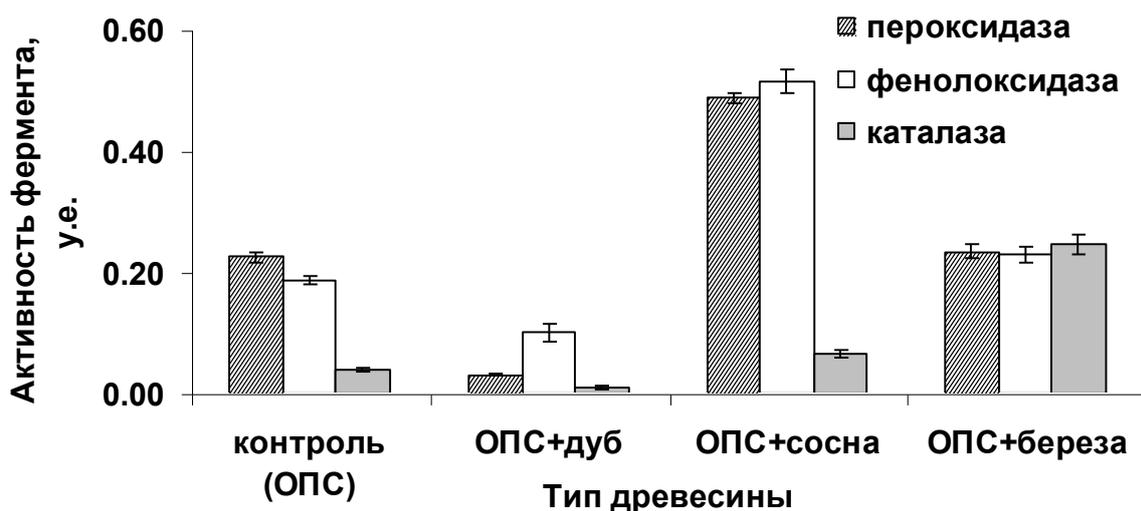


Рис. 3. Изменение уровня пероксидазной, каталазной и фенолоксидазной активности *T. viride* при росте на средах, содержащих древесину различных типов

Поскольку фенолоксидазная и пероксидазная активность исследуемого гриба на древесине сосны была максимальной, а в случае каталазы имело место повышение активности по отношению к контрольному уровню, в дальнейших исследованиях использовался именно этот тип древесины.

Было установлено, что активность пероксидазы, фенолоксидазы и каталазы обоих исследуемых грибов изменяется сходным образом. На древесине сосны у *A. terreus* так же как и у *T. viride* происходит увеличение уровня активности исследуемых оксидоредуктаз, причем в наибольшей степени увеличивается активность фенолоксидазы. Что касается ПВХ, то при культивировании грибов в присутствии этого компонента активность каталазы и пероксидазы остается на уровне контроля, а активность фенолоксидазы снижается.

Таблица 2

Изменение активности экзооксидоредуктаз *T. viride* и *A. terreus* при культивировании грибов на средах, содержащих ПВХ и древесину сосны

Среда культивирования	Фермент	Изменение активности по сравнению с ОПС, %	
		<i>A. terreus</i>	<i>T. viride</i>
ОПС+ПВХ	пероксидаза	-4,5	-9,0
	фенолоксидаза	-17,5*	-28,0*
	каталаза	-3,5	-5,6
ОПС+древесина сосны	пероксидаза	+ 60,0*	+ 137,6*
	фенолоксидаза	+122,0*	+ 201,8*
	каталаза	+ 58,3*	+ 65*

*- достоверное изменение ферментативной активности ($p \leq 0.05$)

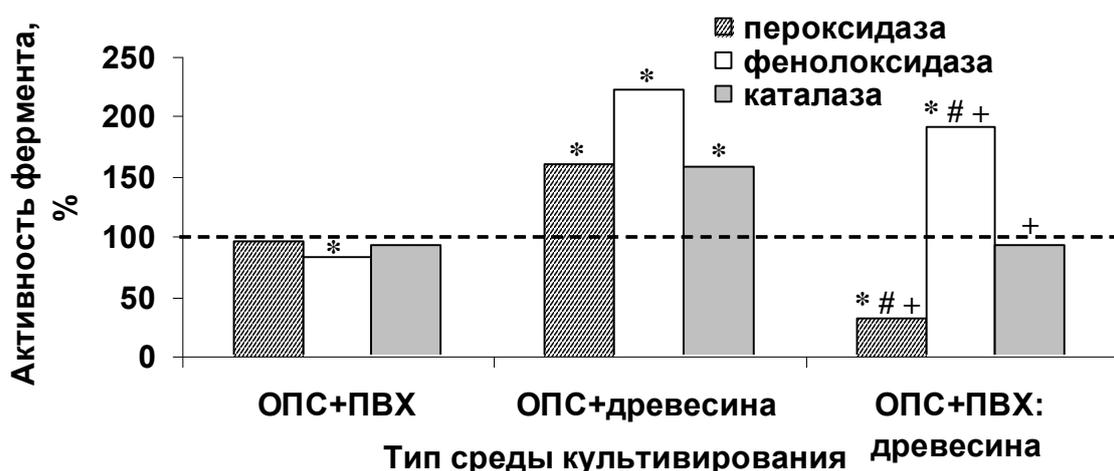


Рис. 4. Изменение пероксидазной, каталазной и фенолоксидазной активности *A. terreus* при росте на среде, включающей различные типы полимеров

* - статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$)

- статистически значимые отличия от варианта ОПС+ПВХ ($p < 0.05$)

+ - статистически значимые отличия от варианта ОПС+древесина ($p < 0.05$)

----- - уровень ферментативной активности в контроле (ОПС)

На следующем этапе работы изучалось изменение активности данных ферментов в присутствии композиции ПВХ:древесина (рис 4). Было установлено, что при росте на материале ПВХ: древесина уровень активности пероксидазы снижается, как относительно древесины, так и относительно ПВХ, уровень активности фенолоксидазы снижается по отношению к древесине и значительно повышается по отношению к ПВХ, активность каталазы при этом снижается, по отношению к древесине и существенно не изменяется по отношению к ПВХ.

Полученные результаты можно объяснить с позиций теории кометаболизма, в основе которой лежит положение о том, что за счет активной метаболизации легкоутилизируемого компонента (основного ростового субстрата), в нашем случае древесины, возможно разрушение труднодоступного компонента (косубстрата) – ПВХ. Протекание данного процесса возможно при условии, что продукты обмена, образующиеся в ходе утилизации основного субстрата, химически модифицируют косубстрат, изменяя степень его доступности для других ферментов. При росте гриба в присутствии исследуемого материала происходит активация фенолоксидазы под действием фенольных компонентов, входящих в состав лигнина. При окислении фенольных компонентов в качестве побочного продукта может образовываться супероксидный анион-радикал, который взаимодействует с молекулами ПВХ, что через ряд промежуточных реакций приводит к образованию гидроперекисей.

Известно, что присутствие в среде органических перекисей может приводить к ингибированию пероксидазной активности, но не влияет на каталазную (Pegeolet at al., 1990), что и наблюдается в наших экспериментах.

Следует отметить, что при росте гриба на материале ПВХ-хитозан, напротив, наблюдается увеличение пероксидазной и каталазной активности, что

также может быть связано с процессами кометаболической утилизации компонентов данной композиции.

3.4. Поиск путей регуляции экзооксидоредуктазной активности микроицетов-деструкторов

В связи с тем, что присутствие в среде исследуемых полимеров может оказывать на оксидоредуктазы грибов неоднозначное влияние, актуальным является поиск дополнительных путей регуляции активности исследуемых ферментов. В настоящее время для этих целей могут быть использованы как химические, так и физические факторы.

Химические вещества-регуляторы могут быть введены в состав полимеров и через понижение или повышение уровня ферментативной активности способствовать замедлению или ускорению деструктивного процесса. В качестве физического фактора, способного оказывать воздействие на метаболизм и продукцию внеклеточных ферментов грибами, может быть рассмотрено слабое импульсное магнитное поле. Слабые магнитные поля характеризуются отсутствием термального и механического эффектов в отношении промышленных материалов, вследствие чего не оказывают на них повреждающего действия. Кроме того, в настоящее время в литературе имеются сведения о влиянии данного фактора на различные физиолого-биохимические показатели про- и эукариот, однако результаты исследований в значительной мере различаются для разных групп организмов и часто нелинейно зависят от параметров поля (Pazur et al, 2007).

На данном этапе работы изучалась активность пероксидазы, фенолоксидазы и каталазы исследуемых грибов при их росте в присутствии сублетальных концентраций “Катона LXE”, “Экодеза” и CuSO_4 (рис.5), установленных нами предварительно, а также в условиях воздействия слабого импульсного магнитного (СИМП) поля (рис. 6).

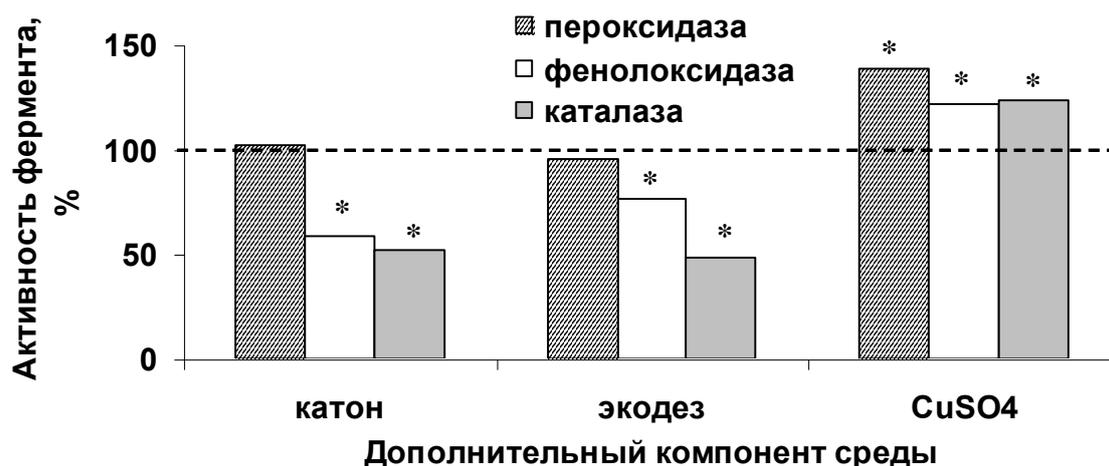


Рис. 5. Влияние различных химических соединений на активность экзооксидоредуктаз *A. terreus*

* - статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$)

----- - уровень ферментативной активности в контроле (ОПС)

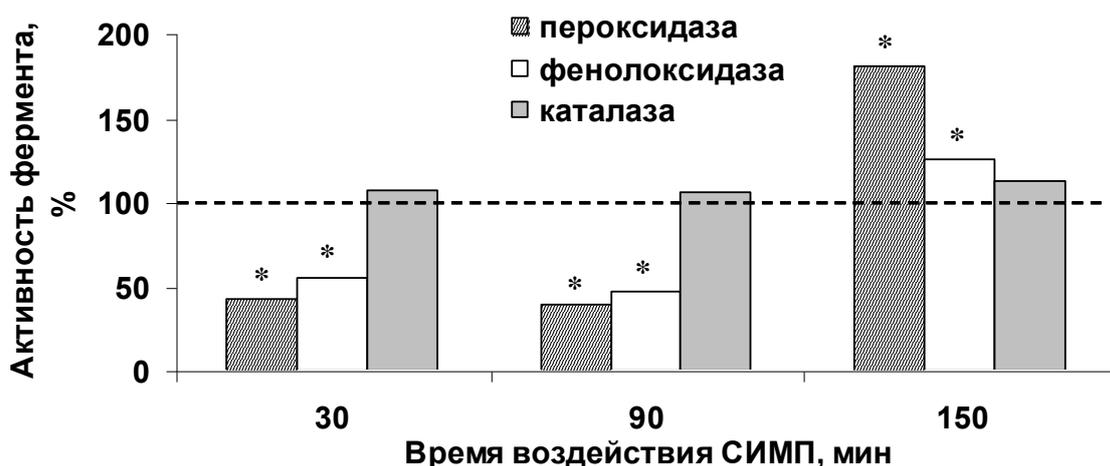


Рис. 6. Влияние СИМП на пероксидазную, фенолоксидазную и каталазную активность *T. viride*

* - статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$)

----- - уровень ферментативной активности в контроле (ОПС)

Было установлено, что под воздействием “Катона” и “Экодеза” снижается активность фенолоксидазы и каталазы *A. terreus*. Активность пероксидазы при этом сохраняется на уровне контроля. Из литературы известно, что действие данных фунгицидов на клетку выражается в нарушении протекания мембранных процессов, в том числе, образования АТФ (Williams, 2007), а соответственно и энергозависимого синтеза и выхода ферментов во внешнюю среду. Кроме того, имеются сведения о том, что в присутствии указанных соединений в биологических системах может возрасти уровень активных форм кислорода, в том числе и H_2O_2 (Du et al, 2002). В условиях дефицита энергии в клетках *A. terreus* снижается образование каталазы и фенолоксидазы, но поддерживается синтез пероксидазы как фермента способного с одной стороны участвовать в процессе питания гриба, а с другой стороны обладающего антиоксидантными свойствами.

Под воздействием сульфата меди (II) происходит повышение уровня активности всех исследуемых оксидоредуктаз. Ионы меди также способны нарушать окислительно-восстановительный баланс как в клетке, так и в ростовой среде гриба. С этим может быть связано возрастание активности каталазы и пероксидазы в присутствии данного соединения. Повышение активности фенолоксидазы под действием сульфата меди может происходить как на транскрипционном уровне, так и при непосредственном включении ионов этого металла в активный центр фермента (Thiele, 2005; Assavanig, 2006).

В результате исследования действия СИМП на метаболизм *T. viride* было установлено, что фенолоксидазная и пероксидазная активность данного гриба под воздействием СИМП меняется сходным образом. Характер изменений зависит от длительности экспозиции: 30 и 90-минутное воздействие снижает, а 150 минутное – повышает активность исследуемых ферментов. Активность внеклеточной каталазы в условиях действия СИМП существенно не изменяется.

В настоящее время не существует единой теории, объясняющей воздействие СИМП на метаболизм живых организмов. В литературе

обсуждаются различные пути влияния данного фактора, как на отдельные биологические молекулы, так и на различные клеточные структуры. Среди них воздействие на реакции с участием радикальных пар, воздействие на гидратные оболочки белков, влияние на ионы, как свободные, так и связанные с ключевыми регуляторными белками, влияние на цитоскелет и связанные с ним процессы выхода ферментов во внеклеточную среду (Бинги, Рубин, 2007; Pazur et al, 2007).

При этом большинство исследователей сходится во мнении, что воздействие даже слабых магнитных полей является для живых организмов стрессовым (Pazur et al, 2007). В связи с этим представлялось целесообразным исследовать действие СИМП на интенсивность перекисного окисления липидов, являющуюся общепринятым показателем степени стрессового воздействия на биологические системы. Нами было исследовано влияние поля на содержание первичных (ДК, ТК) и вторичных (МДА) продуктов перекисного окисления в мицелии исследуемого гриба, а также на активность мицелиальной каталазы, являющейся одним из основных ферментов антиоксидантной системы защиты (рис.7).

Было установлено, что воздействие СИМП в течение 30 и 90 минут приводило к статистически значимому снижению содержания ДК в мицелии. Для ТК наблюдаемые изменения были сходными. Экспозиция длительностью 150 мин вызывала значительное повышение содержания ДК по сравнению с контролем. Статистически значимого изменения концентрации МДА во всех исследуемых случаях зафиксировано не было. Достоверное снижение активности мицелиальной каталазы наблюдалось только после 150 минутного воздействия исследуемого фактора. Следует отметить, что снижение количества

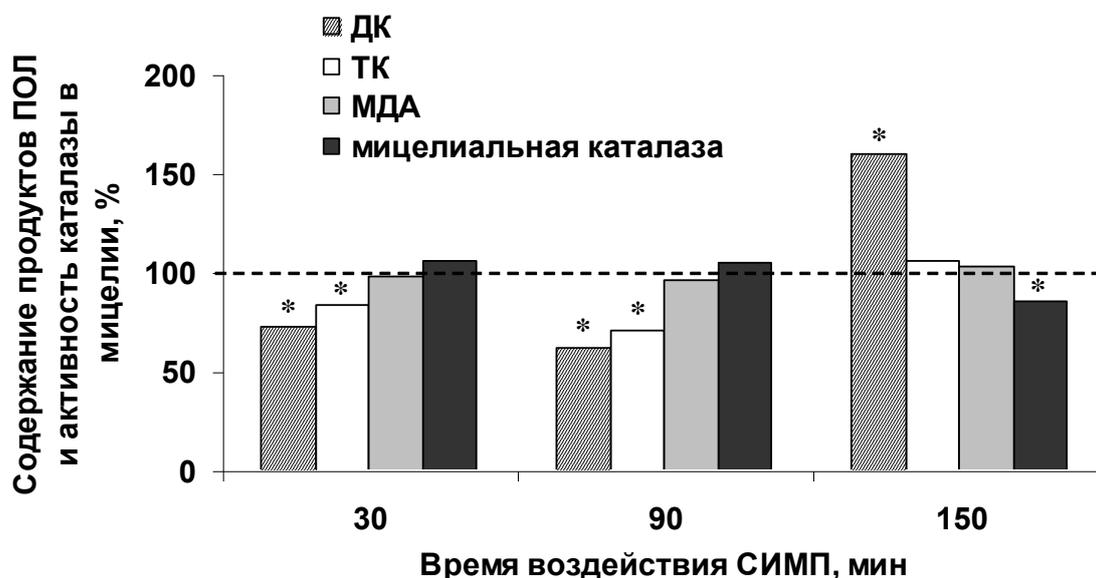


Рис. 7. Влияние СИМП на содержание первичных продуктов ПОЛ и активность мицелиальной каталазы *T. viride*

* - отличия от контроля являются статистически значимыми ($p < 0.05$)

----- - уровень контроля

ДК и ТК в мицелии сопровождалось снижением содержания общего белка, а возрастание количества данных продуктов – нормализацией содержания белка. В культуральной жидкости при этом количество белка постоянно находилось на повышенном уровне.

Полученные результаты могут быть связаны с нарушением метаболических, в том числе, биосинтетических и транспортных процессов исследуемого микромицета, предположительно происходящим при 30 и 90-минутном воздействии СИМП, а также изменением окислительно-восстановительного статуса клеток микромицета, проявляющемся в снижении по отношению к контролю содержания в клетке первичных продуктов перекисного окисления липидов. При воздействии поля в течение 150 минут рост повреждающего эффекта может вызывать запуск защитных механизмов, связанных с синтезом специфических белков, принимающих участие в адаптации гриба к действию исследуемого фактора.

Таким образом, воздействие СИМП на метаболизм микроскопических грибов в зависимости от длительности экспозиции может иметь различный характер. В связи с этим применение данного фактора для регуляции ферментативной активности микромицетов требует дальнейшего изучения, в то время как применение химических присадок, в частности сульфата меди, может быть рекомендовано для создания композиций с регулируемой биостойкостью.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что наиболее активными деструкторами эпоксидных компаундов, п-арамидного волокна, бутилкаучука, ДСП, композиций ПВХ:древесина и ПВХ:хитозан являются *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium ochro-chloron* и *Trichoderma viride*.
2. Установлено, что максимальная активность пероксидазы, фенолоксидазы и каталазы *Aspergillus terreus* и *Trichoderma viride* в большинстве случаев наблюдается на 10-13 сутки, а оптимальные для проявления активности ферментов значения рН среды находятся в диапазоне 7.2-8.2.
3. Отмечено повышение активности пероксидазы, фенолоксидазы и каталазы при культивировании *Aspergillus terreus* и *Trichoderma viride* на древесине, фенолоксидазы при культивировании *Aspergillus terreus* на материале ПВХ:древесина, пероксидазы и каталазы – на материале ПВХ:хитозан.
4. Выявлено, что активность фенолоксидазы и каталазы *Aspergillus terreus* снижается под действием сублетальных концентраций фунгицидов “Катон ЛХЕ” и “Экодез”, в то время как введение в среду сублетальных концентраций сульфата меди приводит к повышению активности всех исследуемых оксидоредуктаз .

5. Установлено, что действие слабого импульсного магнитного поля (1,5 мТл, 15Гц) приводит к нарушению окислительно-восстановительного статуса клеток, а также способствует изменению активности внеклеточных фенолоксидазы и пероксидазы *T. viride*: воздействие поля в течение 30 и 90 минут снижает, а 150 минут – повышает активность фенолоксидазы и пероксидазы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. Лазарева (Касатова) Е.С., Стручкова И.В., Смирнов В.Ф. Влияние компонентов среды культивирования на фенолоксидазную активность микромицетов *Trichoderma viride* и *Trichoderma lignorum* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2008. №1. С.77-80
2. Стручкова И.В., Лазарева (Касатова) Е.С., Смирнов В.Ф. Амилазная и оксидоредуктазная активность микодеструктора *A. terreus* при его росте на новых полимерных материалах // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010. №2(2). С. 591-595

Статьи, тезисы и материалы докладов региональных, всероссийских и международных конференций и семинаров:

1. Лазарева (Касатова) Е.С., Савельева А.В. Фрактальная размерность Df как показатель взаимосвязи между степенью ветвления микромицетов и их фенолоксидазной активностью // Сборник тезисов докладов XX межвузовской студенческой конференции “Актуальные проблемы естествознания”. 2008. С. 53
2. Лазарева (Касатова) Е.С., Регулирование активности грибных фенолоксидаз путем изменения состава среды культивирования // Сборник тезисов и докладов тринадцатой нижегородской сессии молодых ученых. 2008. С. 21-22
3. Лазарева (Касатова) Е.С., Макарова С.В. Динамика активности оксидоредуктаз *Trichoderma viride* – микромицета-биодеструктора промышленных материалов // Сборник тезисов докладов I Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Фундаментальные и прикладные исследования в биологии”. 2009. С.278-279
4. Лазарева (Касатова) Е.С. Роль экстрацеллюлярных оксидоредуктаз гриба *Trichoderma viride* в деструкции различных пород древесины // Сборник тезисов докладов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2009”. 2009. С. 151-152
5. Лазарева (Касатова) Е.С., Игнатова О.В. Участие экстрацеллюлярной фенолоксидазы микромицета *Trichoderma viride* в биодеструкции различных пород древесины // Сборник тезисов и докладов четырнадцатой нижегородской сессии молодых ученых. 2009. С. 135-136

6. Лазарева (**Касатова**) Е.С., Борисова И.В. Смирнов В.Ф. Действие слабого импульсного магнитного поля на процесс перекисного окисления липидов микромицета *Trichoderma viride* // Материалы V Международной научно-практической конференции “Динамика научных исследований-2009”. 2009. С 96-98
7. Лазарева (**Касатова**) Е.С., Смирнов В.Ф., Игнатова О.В. Изучение динамики активности оксидоредуктаз микромицета *Trichoderma viride* в связи с биодеструкцией различных пород древесины // Сборник статей Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи “Экотоксикология-2009. Современные биоаналитические системы, методы и технологии”. 2009. С.96-97
8. Лазарева (**Касатова**) Е.С., Смирнов В.Ф., Макарова С.А. Динамика активности оксидоредуктаз *Trichoderma viride* в связи с биодеструкцией материалов на основе древесины / Материалы Пятого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. 2009. Ч.2. С. 219-220.
9. Лазарева (**Касатова**) Е.С., Сеницына Ю.В., Стручкова И.В., Кряжев Д.И., Зотов К.А., Смирнов В.Ф. Исследование роли оксидоредуктаз и гидролаз микромицетов *Aspergillus terreus* и *Penicillium cyclopium* в деструкции композитных материалов, обладающих различной грибостойкостью // Материалы Московской Международной научно-практической конференции “Биотехнология: экология крупных городов”. 2010. С. 335-336.
10. Лазарева (**Касатова**) Е.С., Смирнов В.Ф. Участие оксидоредуктаз микромицетов *Aspergillus terreus* и *Penicillium cyclopium* в деструкции композитных материалов, обладающих различной грибостойкостью // Сборник тезисов докладов 14-ой Международной Пуцинской школы – конференции молодых ученых. “Биология – наука XXI века” 2010. С. 265
11. Лазарева (**Касатова**) Е.С., Борисова И.В., Игнатова О.В. Смирнов В.Ф. Влияние слабого импульсного магнитного поля на перекисный гомеостаз микромицета *Trichoderma viride* // Сборник тезисов 3-го Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов “Симбиоз-Россия- 2010” 2010. С.45-46.
12. **Касатова** Е.С., Стручкова И.В., Смирнов В.Ф. Оксидоредуктазы микромицетов-активных деструкторов древесины и материалов на ее основе Сборник статей 11-ой Международная научно-практической конференции “Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности” 2011. С. 290-291.
13. **Касатова** Е.С., Ватолина О.И., Макарова С.В., Смирнов В.Ф. Динамика каталазной, пероксидазной и фенолоксидазной активности гриба-биодеструктора *Aspergillus. terreus* // Материалы докладов VII Съезда Общества физиологов растений России “Физиология растений- фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий” Ч.1. 2011. С. 319-320.