

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.28: 581.14: 546.23

**ОБРАЗОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТАРНОГО СЕЛЕНА ПРИ РАСПАДЕ
МОЛЕКУЛЫ СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДАФС-25
ПОД ВЛИЯНИЕМ РАСТУЩЕГО МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ****П.А. Полубояринов*, В.А. Вихрева*, П.П. Лещенко*, А.В. Ариповский**, А.Н. Лихачев***(кафедра микологии и альгологии; e-mail: pashal@sura.ru)*

Проведенные исследования показали, что при инкубации культур грибов на питательной среде с внесенными в нее разными концентрациями селенорганического препарата ДАФС-25 происходит процесс распада молекулы препарата с выделением элементарного селена на мицелии грибов, а в питательной среде накапливается ацетофенон. In vitro подобная реакция с выделением элементарного селена и ацетофенона проходит между диацетофенонилселенидом и глутатионом, цистеином в щелочной среде.

Ключевые слова: *грибы, селен, глутатион, цистеин, ацетофенон.*

Селен относится к группе химических элементов, содержание которого в природных экосистемах крайне неравномерно. Биогеохимическая трансформация различных соединений селена в разных экосистемах конкретных регионов очень сложна и зависит от многих факторов: типа почв, температуры, рН, солености воды, содержания кислорода и т.д. (Ермаков, 1978; Сучков, 1981; Конова, 1993). Усвоение и аккумуляция соединений селена прокаротиотическими и эукаротиотическими организмами во многом определяется как биологическими особенностями самих видов из разных таксономических групп, так и его формами и их концентрацией в окружающей среде (Решетникова, 1997; Минюк, Дробецкая, 2000; Блинохватов, 2001; Вихрева и др., 2001; Зайцев и др., 2002; Shrift, 1961; Ulrich, Shrift, 1968; Price, Harrison, 1988; Calomme et al., 1995).

Являясь жизненно необходимым минорным микроэлементом для большинства организмов, обеспечивающим функциональное состояние клеток и метаболические процессы, а также обладающим антиоксидантным и иммуномодулирующим действием, селен определяет и распространенность гипозелемного состояния людей в разных странах, в том числе и некоторых регионах России (Кудрин, 1975). В последнем случае возникает необходимость профилактического обеспечения населения витаминно-минеральным комплексом эссенциальных микроэлементов, включая и селен, используя в рационе питания лечебно-профилактические продукты и биологически активные добавки.

Поступая в организмы, в том числе позвоночных, с пищей, усвояемость и трансформация орга-

нического и неорганического селена значительно различается (Levander, 1986). Относительно высокие его концентрации обладают токсическим действием на растительные и животные организмы, которое усиливается в водной среде в связи с растворимостью низкомолекулярных неорганических соединений селена и их проницаемостью через оболочки клеток. В водной среде в трансформации селена играет большую роль фитопланктон, после отмирания которого образуются “красные” осадки, содержащие органические соединения, минерализуемые в дальнейшем микроорганизмами до элементарного селена (Boisson, Romeo, 1996; Zhang, Moore, 1997).

Сведения о накоплении и трансформации селена грибами носят фрагментарный характер. Имеются данные, что аккумуляция селена в плодовых телах макромицетов во много раз превышает его содержание в сосудистых растениях, а также в почве (Watkinson, 1966). Однако функции селена и пути его трансформации исследованы только у отдельных представителей из царства грибов. Так, например, трансформация оксианиона селенита видами *Penicillium* в жидкой среде происходит с выделением летучих компонентов Se, сходных с диметилселенидами, на всех стадиях их развития. Восстановление селенита до аморфного элементарного Se наблюдается только в фазе подавления роста. При этом восстановление и аккумуляция Se коррелирует с накоплением биомассы (Brady et al., 1996).

Экспериментальные работы, проведенные на грибах, показали, что разные соединения селена и их концентрации избирательно влияют на развитие и

* Пензенская государственная сельскохозяйственная академия. 440014, г. Пенза, ул. Ботаническая, 30.

** Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142292, г. Оболensk Московской обл.

скорость роста, продуцирование биологически активных веществ, ингибируя или стимулируя течение этих процессов (Денисова, 1999; Ильин, 2001). Вероятно, сходство функций клеточных мембран на всех уровнях организации организмов и универсальность антиоксидантной защиты клеток, в которой важную роль играет селеносодержащий фермент глутатионпероксидаза, определяют степень влияния селенатов на метаболизм организмов (Price, Harrison, 1988). Органические формы селена менее токсичны по сравнению с неорганическими его солями, что снижает опасность передозировки при использовании биологически активных добавок (БАД), полученных биотехнологическим путем (Федеральный реестр..., 2001).

Способность к аккумуляции селена сосудистыми растениями, водорослями, грибами заслуживает особого внимания в связи с возможностью разработки биотехнологий получения добавок и покрытия его дефицита в рационе людей за счет использования БАД как вспомогательного средства при лечении ряда заболеваний (Мазо и др., 2003). Использование методов биотехнологии в грибоводстве, вероятно, может являться перспективным источником получения новых пищевых добавок, содержащих органические формы селена в мицелии или плодовых телах культивируемых видов базидиальных грибов (Денисова, 1999).

В большинстве экспериментов используют неорганические соединения — селениты и селенаты. Однако в литературе отсутствуют данные о действии селенорганических соединений, в состав которых входят неорганические и органические компоненты, как в препарате ДАФС-25. В связи с этим целью работы являлось исследование трансформации этого препарата мицелием грибов.

Материалы и методы

Для выявления влияния разных концентраций препарата ДАФС-25 от 10^{-2} до 10^{-4} г/л на развитие грибов в качестве тест-объектов были использованы представители из разных таксономических групп: *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma viride*. Культуры *Pleurotus ostreatus* выращивали на пшеничном агаре, микромицеты — на среде Чапека.

Опыты по установлению возможного распада молекулы селенорганического препарата ДАФС-25 на органическую и неорганическую части, а также по образованию элементарного селена под воздействием растущего мицелия, проводили с культурой *Aspergillus niger*. Препарат ДАФС-25 не растворим в воде, но хорошо растворяется в органических растворителях, жирах. ДАФС-25 растворяли в этаноле и добавляли в питательную среду при культивировании грибов.

Для подтверждения факта выделения элементарного селена под влиянием грибов проводили: 1) визуальную оценку появления розово-красного оттенка среды или окраски мицелия, 2) наличие специфической реакции на селен по Файглею и Весту (Назаренко, Ермаков, 1971). Эта реакция основана на каталитическом действии селена по восстановлению метиленового голубого сульфидом щелочных металлов до бесцветного лейкосоединения. Адсорбированный на мицелиальной пленке селен растворяли путем однократной обработки раствором сульфида натрия. Затем к объему экстракта и “холостому” опыту (не содержащему экстракт) добавляли раствор метиленового голубого.

Смыв элементарного селена с поверхности мицелия проводили с использованием н-гексана, а также смеси изопропилового спирта с хлороформом (соотношение 1:2). Полученный экстракт упаривали до полного удаления растворителей, обрабатывали оставшуюся часть сульфидом натрия и определяли наличие селена специфической реакцией с метиленовым голубым.

Для определения продуктов распада молекулы ДАФС-25 культуральную жидкость, на которой рос *A. niger*, двукратно экстрагировали н-гексаном, а затем экстракт исследовали методом газожидкостной хроматографии с режимом программирования температуры.

Результаты и их обсуждение

Изучение влияния препарата ДАФС-25 на рост чистых культур представителей из различных таксономических групп грибов позволило установить связь между скоростью роста мицелия колоний культур и их отзывчивостью на разные концентрации препарата. Как видно из данных табл. 1 и 2, ингибирующее действие препарата на все взятые культуры грибов происходит при повышении концентрации до 10^{-3} (г/л).

Таблица 1

Диаметр колоний *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. на пшеничном агаре с добавлением разных концентраций препарата ДАФС-25

Штамм	Контроль	Концентрация препарата ДАФС-25 (г/л)		
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
В-1	12,7 ± 0,66	6,0 ± 0,43	12,8 ± 0,33	14,7 ± 0,56
В-2	12,2 ± 0,21	6,1 ± 0,12	12,5 ± 0,34	13,9 ± 0,51
В3	10,3 ± 0,13	5,5 ± 0,33	10,6 ± 0,1	11,8 ± 0,17

Селенорганический препарат меняет ростовые характеристики мицелия вешенки устричной: при высокой концентрации (10^{-2} г/л) ингибирует скорость роста мицелия на 33—50%, при 10^{-4} г/л стимулирует его, превышая контроль на 13—16%.

Т а б л и ц а 2

Влияние концентраций препарата ДАФС-25 на рост колоний микромицетов (среда Чапека, +25°)

Вид гриба	Концентрация препарата				
	Контроль	ДАФС-25 (г/л)			
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
<i>Trichoderma viride</i>	d	35,3 ± 0,05	0,0	12,0 ± 0,02	14,5 ± 0,22
	R	0,0	100	66,0	58,9
<i>Chaetomium globosum</i>	d	38,0 ± 0,15	0,0	0,0	8,0 ± 0,12
	R	0,0	100	100	78,9
<i>Aspergillus niger</i>	d	22,3 ± 0,15	0,0	0,0	11,5 ± 0,12
	R	0,0	100	100	48,4

Примечание. R — подавление роста грибов (%); d — диаметр колонии гриба (мм).

При концентрации препарата 10⁻⁴ г/л проявляется избирательный эффект стимулирующего действия на рост колоний исследуемых видов микромицетов и пигментацию. В варианте с *Chaetomium globosum* введение в среду Чапека препарата ДАФС-25 вызывает интенсивное образование зеленовато-коричневого пигмента, диффундирующего в среду. Интенсивное образование пигмента у *Chaetomium globosum*, вероятно, является ответной реакцией гриба, сравнимой с воздействием ряда других факторов, таких как ультрафиолетовое облучение, ионы тяжелых металлов, некоторые фунгициды.

Инкубация культур на питательной среде с внесенными в нее разными концентрациями ДАФС-25 показали, что процесс выделения элементарного селена на мицелии при визуальной оценке его окраски происходил как при высоких концентрациях препарата 10⁻¹–10⁻² г/л, так и 10⁻³–10⁻⁴ г/л, где выделение селена при таком анализе практически незаметно. Особенно четко изменение окраски мицелия происходит у *Pleurotus ostreatus*, принимающего красный оттенок. Вероятно, что аккумуляция и повышение концентрации селена в мицелии, так же как и у спирулины, приводит к восстановлению селенитов до элементарного селена, сопровождающегося появлением данной окраски (Пронина и др., 2002).

Исследование химической активности селена с помощью аналитических реакций как у препарата аморфного селена, так и с активностью селена, выделившегося на мицелии, совпадают: оба с трудом и только при нагревании растворяются в растворе щелочи (NaOH). Намного легче селен, выделившийся на поверхности мицелия: как и препарат аморфного селена, он растворяется в избытке сульфида натрия (Na₂S) с образованием, по всей видимости, сульфид-селенидов: Se + Na–S–Na → Na–S–Se–Na.

Специфическая реакция на селен по Файглею и Весту также показала наличие элементарного селена: в опытном растворе, содержащем селен, окраска метиленового голубого исчезла практически сразу, а в “холостом” растворе через 20 с.

Результаты опытов дают основание полагать, что селенорганическое соединение ДАФС-25 распадается с выделением элементарного селена на мицелиальных структурах грибов. Для того чтобы определить, как прочно связан выделившийся селен с гифами грибов, нами был проведен опыт по смыву селена вместе с липидами клеточной стенки гриба *A. niger* с использованием органических растворителей. Опыт показал, что селен отсутствует во всех вариантах, т.е. не экстрагируется ни гексаном, ни смесью изопропилового спирта с хлороформом. Далее мицелиальную пленку обработали сульфидом натрия и также провели специфическую реакцию на наличие селена. В этом случае реакция на селен была положительная.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что селен прочно связан с гифами гриба *A. niger* и не смывается органическими растворителями, которые легко смывают липидную фракцию клеточных стенок грибов, но селен легко смывается сульфидом натрия и затем может быть легко обнаружен специфической реакцией.

Как показывают эксперименты, проведенные на водорослях, хроматографический анализ селеносодержащих липидов, выделенных из них и культивируемых в присутствии высоких концентраций Se (IV), селен присутствует во всех липидных фракциях за исключением насыщенных углеводородов. Максимальное содержание отмечено во фракции каротиноидных пигментов. Вероятно, он не связан с липидами ковалентно, а селеносодержащие липиды метаболически неактивны. При этом отмечено, что значительная часть селена сосредоточена в глутатионпероксидазе (Price, Harrison, 1988). Однако скорость поглощения органической и неорганической форм селенитов из среды является разной (Sandholm et al., 1973). На это указывают и наши данные, показывающие двойной эффект поведения ДАФС-25, вызванного распадом препарата на органическую и неорганическую составляющие и разную их аккумуляцию в структуре мицелия. О распаде молекулы ДАФС-25 свидетельствует появление в культуральной жидкости опытных вариантов отчетливого “ароматического” запаха, в то время как в контроле он отсутствует.

Весьма важно было выявить, на какие производные, кроме элементарного селена, распадается молекула диацетофенонилселенида. Для этого экстракт культуральной жидкости исследовали методом газожидкостной хроматографии. Исследование показало наличие ацетофенона в культуральной жидкости, других компонентов распада молекулы ДАФС-25 идентифицировано не было.

Назаренко И.И., Ермаков А.Н. 1971. Аналитическая химия селена и теллура. М. 248 с.

Пронина Н.А., Ковшова Ю.И., Попова В.В. и др. 2002. Влияние селенит-ионов на рост и накопление селена у *Spirulina platensis* // Физиол. раст. **49**. № 2. 264–271.

Решетникова И.А. 1997. Накопление селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. М. 197 с.

Сучков Б.П. 1981. Содержание подвижных форм селена и фтора в почвах Черновицкой области и некоторых минеральных удобрениях // Мат-лы науч. конф. “Селен в биологии”. Баку. С. 13–14.

Федеральный реестр биологически активных добавок к пище. 2001 / Ред. Т.Е. Пилат. М.

Boisson F., Romeo M. 1996. Selenium in plankton from the northwestern Mediterranean Sea // Water Res. **3**. N 11. 2593–2600.

Brady J.M., Tobin J.M., Gadd G.M. 1996. Volatilization of selenite in aqueous medium by a *Penicillium* species // Mycol. Res. **100**. N 8. 955–961.

Calomme M., Hu J., Van den Branden K., Van den Bergne D.A. 1995. Seleno-Lactobacillus an Organic Selenium Source // Biol. Trace Element Res. **47**. N 5. 379–383.

Engman L., Andersson C., Cotreace I.A., Anderson C.-M., Hallberg A. 1994. Evidence for

Common Selenolate Intermediate in the Glutathione Peroxidase-like Catalysis of γ -(Phenylselenyl) Ketones and Diphenyl Diselenide // Tetrahedron. **50**. N 9. 2929–2938.

Levander O.A. 1986. Selenium. Trace elements in human and animal nutrition // Ed. W. Mertz. Orlando; San Diego; N.Y.; Austin; Montreal; Sydney; Tokyo; Toronto. Vol. 2. P. 209–266.

Price N.M., Harrison P.J. 1988. Specific selenium-containing macromolecules in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* // Plant Physiol. **86**. N 1. 192–199.

Sanders R.W., Gilmour C.C. 1994. Accumulation of selenium in a model freshwater microbial food web // Appl. Environ. Microbiol. **60**. N 8. 2677–2683.

Sandholm M., Oksanen H.E., Pesonen L. 1973. Uptake of selenium by aquatic organisms // Limnol. Oceanogr. **18**. 496–499.

Shrift A. 1961. Metabolism of selenium by plant and microorganisms // Selenium compounds in nature and medicine. N.Y. 816 p.

Ulrich J.M., Shrift A. 1968. Selenium Absorption by excised *Astragalus* roots // Plant Physiol. **43**. 14–20.

Watkinson J.H. 1966. Analytical Chemistry. N.Y. 192 p.

Zhang Y., Moore J.N. 1997. Reduction potential of selenate in wetland sediment // J. Environ. Qual. **26**. N 3. 910–916.

Поступила в редакцию
19.02.09

FORMATION OF ELEMENTARY SELENIUM DECAY OF MOLECULES OF SELENIUM-ORGANIC PREPARATION DAFS-25 UNDER INFLUENCE OF GROWING MICELLA OF MUSHROOMS

P.A. Poluboyarinov, V.A. Vikhreva, P.P. Leshchenko, A.V. Aripovsky, A.N. Likhachev

The investigation showed that the molecules of the preparation break down with the secretion of elementary selenium on the mycelium of mushrooms in incubation of mushrooms on the nutritious medium when selenium-organic preparation DAFS-25 is introduced in different concentrations. And acetophenon is accumulated in the nutritious medium. In vitro the same reaction takes place between DAFS-25 and glutathione, cysteine in alkaline conditions with the secretion of elementary selenium and acetophenon.

Key words: *fungi, selenium, glutathione, cysteine, acetophenon.*

Сведения об авторах

Полубояринов Павел Аркадьевич — канд. с.-х. наук, ст. преподаватель кафедры химии ПГСХА (Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования — Пензенская государственная сельскохозяйственная академия. Тел. (8412) 62-83-54; e-mail: pashal@sura.ru

Вихрева Валерия Александровна — канд. биол. наук, доцент кафедры химии ПГСХА. Тел. 8-927-362-42-03.

Лещенко Петр Петрович — канд. хим. наук, доц. кафедры химии ПГСХА. Тел. 57-56-15; e-mail: pleshch@sura.ru

Ариповский Александр Викторович — канд. хим. наук, зав. сектором Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (г. Оболенск Московской обл.). Тел. 8-4967-73-61-34; e-mail: aripovsky@rambler.ru

Лихачев Александр Николаевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-50-57.