Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ / Кратасюк В.А.

«___» _____20___ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Сравнительный анализ люминесценции высших грибов

Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis

Направление 03.04.02 «Физика»

Магистерская программа 03.04.02.01 «Биофизика»

Научный руководитель _____ зав. лаб., д.б.н. В.С. Бондарь

Выпускник _____ К.С. Артеменко

Рецензент _____ зав. лаб., к.б.н. Е.С. Высоцкий

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Сравнительный анализ люминесценции высших грибов *Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis*» изложена на 61 странице, содержит 19 иллюстраций и 1 таблицу, список цитируемой литературы включает 74 источника.

СВЕТЯЩИЕСЯ ВЫСШИЕ ГРИБЫ, ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ГРИБНАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ СИСТЕМА, ЛЮЦИФЕРАЗА, ЛЮЦИФЕРИН, СИСТЕМА ЦИТОХРОМА Р450, АКТИВАТОР ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ.

Основной целью диссертационной работы являлся сравнительный анализ люминесценции светящихся высших грибов *Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis*.

Поставленная цель достигалась решением следующих задач:

1. Оптимизация условий и способов культивирования грибов *N. nambi* и *A. borealis* в лабораторных условиях для получения биомассы грибного мицелия с высоким уровнем свечения.

2. Выделение из биомассы светящегося мицелия изучаемых видов грибов люминесцентных систем, обладающих функциональной активность *in vitro*, и их свойства:

а. зависимость интенсивности свечения от pH;

б. стабильность при разных способах хранения;

в. эффекты разных химических веществ (НАД(Ф)Н, H_2O_2, флуконазол) на люминесцентную активность грибных излучающих систем.

3. Выделение из биомассы мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* активаторов люминесценции и исследование их некоторых свойств.

В ходе выполнения диссертации получены следующие основные данные. Из двух видов светящихся высших грибов получены экстракты, содержащие люминесцентные системы, обладающие функциональной активностью *in vitro*.

Показано, что системы представляют собой достаточно устойчивые комплексы, включающие белковые и небелковые компоненты, обеспечивающие свечение *in vitro*. Выделенные системы проявляют активность после длительного (до года и более) хранения в замороженном и лиофильно высушенном виде. Для двух люминесцентных систем показана активация НАД(Ф)Н и ингибирующий эффект флуконазола. Показана стимуляция системы из гриба *N. nambi* пероксидом водорода. На основании полученных данных высказана гипотеза об участии системы цитохрома P450 в механизме свечения грибов. Из мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* выделены низкомолекулярные активаторы свечения и определены их некоторые физико-химические свойства.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ 9

1. Литературный обзор 9

1.1 Свечение высших грибов 9

1.2 Культивирование светящихся грибов в искусственных условиях 11

1.3 Изучение применимости грибного свечения в аналитике 12

1.4 Исследования люминесцентной системы светящихся высших грибов .. 13

1.5 Представления о субстрате люминесцентной реакции высших грибов . 17

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 21

2. Материалы и методы 21

2.1 Объекты исследования и условия их культивирования 21

2.2 Оценка образцов мицелия *N. nambi* и *A. borealis* (внешний вид и световая эмиссия) при разных способах культивирования грибов 23

2.3 Выделение грибных люминесцентных систем из мицелия *N. nambi* и *A. borealis* 23

2.4 Измерение люминесценции экстрактов из мицелия *N. nambi* и *A. borealis*, содержащих светоизлучающие системы 25

2.5 Оценка активности люминесцентных систем из грибов *N. nambi* и *A. borealis* при разных значениях pH 26

2.6 Изучение активности люминесцентных систем *N. nambi* и *A. borealis* при добавках разных компонентов 26

2.7 Выделение активаторов люминесценции из мицелия *N. nambi* и *A. borealis* 28

2.8 Изучение некоторых свойств активаторов люминесценции, выделенных из мицелия *N. nambi* и *A. borealis* 29

3 Результаты и обсуждение 30

3.1 Рост и люминесценция мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* при разных режимах культивирования 30

3.2 Выделение грибных люминесцентных систем из мицелия *N. nambi* и *A. borealis* и их некоторые свойства 34

3.3 Стабильность люминесцентных систем из грибов *N. nambi* и *A. borealis* 38

3.4 Активность люминесцентных систем *N. nambi* и *A. borealis* в зависимости от pH 39

3.5 Гипотеза о механизме люминесценции высших грибов с участием системы цитохрома P-450 40

3.6 Активность люминесцентных систем в присутствии НАДФН и НАДН 42

3.7 Эффект флуконазола на активность люминесцентных систем 44

3.8 Выделение активаторов люминесценции из мицелия *N. nambi* и *A. borealis* 47

3.8.1 Активатор светоизлучения из гриба *N. nambi* – намбин и его некоторые физико-химические свойства 47

3.8.2 Активатор люминесценции из гриба *A. borealis* и его некоторые свойства 49

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 51

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 54

ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция (излучение видимого света живыми организмами) – достаточно широко распространенное явление в царстве грибов [1,2,4]. К настоящему времени известно более 80 видов высших грибов, обладающих биолюминесценцией [8]. Светящиеся грибы обнаружены в Северной и Южной Америке, Европе, Азии (включая Сибирь), Австралии, Африке. Этот список постоянно пополняется, поскольку обнаруживаются новые виды светящихся грибов, особенно в субтропической и тропической зонах Земного шара, где имеются наиболее благоприятные условия для их обитания. Так, в Бразилии недавно обнаружено семь новых видов светящихся грибов, которые отнесены к семейству *Mycena* [9].

Изучение грибной биолюминесценции проводится около 200 лет [1,2,4]. Однако природа этого феномена в царстве грибов остается не установленной, в отличие от свечения бактерий и животных, для многих видов которых механизм излучения расшифрован за последние десятилетия и явился основой новой отрасли – биолюминесцентной аналитики [4,38-45]. Структура и свойства люминесцентной системы грибов и механизм свечения этих живых организмов до сих пор не расшифрованы. Специалисты, работающие в данной области, до сих пор не пришли к единому мнению о структурно-функциональной организации грибной люминесцентной системы и механизме светоизлучения. Относительно механизмов грибного свечения в настоящее время есть два мнения: 1 - свечение определяется функционированием системы люцифераза - люциферин [15-19]; 2 - свечение связано с окислением органических субстратов оксидазами и происходит без участия специализированного фермента [20-24].

Приведенные выше факты позволяют сделать вывод, что изучение структуры и свойств люминесцентной системы высших грибов имеет не только фундаментальное значение для развития представлений о механизме свечения

этих живых объектов, но и практическую ценность для оценки возможности их применения для аналитики. Из этого следует, что получение новых знаний о люминесцентных системах высших грибов, представляющих разные таксоны, будет способствовать:

1 - установлению структурно-функциональной организации грибной люминесцентной системы и расшифровке механизма свечения;

2 - дополнению и развитию представлений о биолюминесценции, как природном явлении;

3 - оценке перспектив применения грибных светоизлучающих систем в биолюминесцентной аналитике.

На основании вышеизложенного, основная цель диссертационной работы была формулирована как «Проведение сравнительного анализа люминесценции высших грибов *Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis*».

Указанная цель достигалась решением следующих экспериментальных задач:

1. Оптимизация условий и способов культивирования грибов *N. nambi* и *A. borealis* в лабораторных условиях для получения биомассы грибного мицелия с высоким уровнем свечения.

2. Выделение из биомассы светящегося мицелия изучаемых видов грибов люминесцентных систем, обладающих функциональной активность *in vitro*, и их свойства:

а. зависимость интенсивности свечения от pH;

б. стабильность при разных способах хранения;

в. эффекты разных химических веществ (НАД(Ф)Н, H_2O_2, флуконазол) на люминесцентную активность грибных излучающих систем.

3. Выделение из биомассы мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* активаторов люминесценции и исследование их некоторых свойств.

Магистерская диссертация выполнена в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН в рамках программы изучения биолюминесценции высших грибов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Литературный обзор

1.1 Свечение высших грибов

Биолюминесценция высших грибов – способность излучать видимый свет известна человечеству с древних времен. Харвей отмечал, что это явление было описано еще Аристотелем в четвертом веке до нашей эры и Плинием Старшим в первом веке нашей эры в труде «Historia Naturalis» [1,2]. Описывая свечение гниющих деревьев, Аристотель назвал это явление «сияющим лесом» (shining wood) и «обманным огнем» (fox-fire), а Плиний Старший отмечал, что светящиеся белые грибы, имеющие сладковатый вкус и обладающие фармакологическим эффектом, могут быть найдены на трухлявых деревьях. Имеется ряд интересных исторических фактов, связанных со свечением высших грибов. Так, Г.Е. Румф писал в работе «Herbarium Amboiense», что жители Молуккских островов Индонезии (Moluccas, Indonesia) освещали свой путь в темном лесу, используя плодовые тела светящихся грибов. Харвей отмечал, что с одной стороны туземцы Микронезии (Micronesia) использовали светящие грибы как украшения для ритуальных танцев и раскраски лиц для устрашения врагов, с другой - светящиеся грибы часто уничтожались, поскольку их появление считалось дурным предзнаменованием [2].

Несмотря на труды Аристотеля и Плиния Старшего, а также сообщения ботаников о распространенности светящихся грибов, исследователи долгое время основное внимание уделяли свечению гниющих деревьев, а не самим грибам. Поэтому наиболее важные открытия, относящиеся непосредственно к биолюминесценции грибов, были сделаны исследователями гораздо позже - в первой половине XIX века. Наблюдения о свечении грибов были представлены в 1815 году Гейнрихом [3]. Хеллер одним из первых сопоставил свечение

гниющей древесины с наличием грибов, а наблюдения Дершау с соавторами позволили им сделать вывод, что свечение древесины связано с наличием грибного мицелия [1,2].

Исследования первой половины XIX века способствовали развитию дальнейшего изучения грибной биолюминесценции. Так, в 1855 году Фабр экспериментально установил основные параметры биолюминесценции грибов, а Молиш опубликовал в 1904 году монографию о светящихся растениях [3].

За последние два века было выявлено значительное количество светящихся грибов, большинство из которых принадлежит к классу базидиомицетов [4]. К настоящему времени светящиеся грибы обнаружены в Северной и Южной Америке, Европе, Азии (включая Сибирь), Австралии, Африке. Если в первой половине XX века А.А.Ячевский сообщал только о 28 видах известных к тому времени светящихся грибов [3], то к концу столетия их число возросло до 40 видов [5,6]. Использование современных методов идентификации биологических объектов позволило Д. Дисджардину и соавторам отнести к числу светящихся грибов уже около 70 видов базидиомицетов [7], а дальнейшее исследование грибной биолюминесценции позволило включить в этот список более 80 видов [8]. Недавно в Бразилии обнаружено еще семь новых видов светящихся грибов, которые были отнесены авторами к семейству *Mycena* [9].

Исследования биолюминесценции грибов проводятся давно, однако основное внимание ученых фокусируется на трех основных направлениях. Разработка способов культивирования светящихся грибов в искусственных условиях, изучение их физиологии и морфологии [10-14]. Изучение молекулярной организации люминесцентной системы и механизмов свечения грибов [4,5,15-26]. Исследование возможности применения грибного свечения в аналитике [8,11,13,27,28].

1.2 Культивирование светящихся грибов в искусственных условиях

Работы микробиологического характера, направленные на разработку и оптимизацию способов культивирования светящихся грибов в искусственных условиях имеют принципиальное значение для исследования грибной биолюминесценции. Получение в лабораторных условиях грибной биомассы (мицелий, плодовые тела), обладающей высоким и устойчивым уровнем свечения, открывает широкие возможности целого спектра исследований: изучение морфологических особенностей светящихся грибов; исследования структурно-функциональной организации грибных люминесцентных систем; изучение возможности практического применения грибной люминесценции в аналитике и т.д.

Известно, что биолюминесцентные грибы – это, как правило, сапрофиты (реже патогены) растений и большинство из них принадлежит к классу базидиомицетов [4]. Они излучают на разных стадиях их жизненного цикла зеленоватый свет с максимумом в области 520-530 нм [4,7,10,21,29-31]. Например, у представителей рода *Mycena* и *Omphalotus* могут одновременно светиться мицелий и плодовые тела, а у видов рода *Armillarea* светятся только мицелий и ризоморфы. Светящийся гриб излучает свет только в течение определенного периода (периодов) времени его жизненного цикла, и практически не светится до и после этого [4]. При этом авторами отмечается, что, в целом, люминесценция гораздо ярче у молодых плодовых тел и у молодого активно растущего мицелия по сравнению со зрелыми плодовыми телами и старым мицелием, хотя интенсивность их люминесценции широко варьирует в зависимости от вида и окружающих условий.

Наличие одинакового максимума световой эмиссии у светящихся грибов (см. выше) позволяет предполагать сходство, если не идентичность, их молекулярной основы. По крайней мере, такое предположение может быть сделано для тех грибов, спектр излучения которых был исследован. Однако,

возможно, сходны лишь терминальные эмиттеры люминесценции у разных видов грибов. Изучение этих вопросов требует дальнейших исследований.

Следует сказать, что достаточно подробно изучены условия роста и излучения света только для небольшого числа видов светящихся грибов: *Armillaria mellea*, *Panellus stipticus*, *Mycena citricolor*, *Omphalotus olearius*, *Gerronema viridilucens*, *Neonothopanus nambi* [11-14, 21, 32, 33]. Было показано [34], что у многих видов базидиомицетов регистрируется слабое свечение кусочков биомассы из плодовых тел. Однако отмечено, что более высоким уровнем свечения (видимой биолюминесценцией) обладают дереворазрушающие виды базидиомицетов. При этом известно, что интенсивность свечения этих видов грибов коррелирует с ростом активности ферментов вторичного метаболизма, участвующих в деструкции лигнина [35-37].

1.3 Изучение применимости грибного свечения в аналитике

Многие светящиеся организмы и их биолюминесцентные системы (например, бактерии, кишечнополостные, светляки), нашли широкое применение в разнообразных аналитических приложениях [4,38-45]. Исходя из этого, светящиеся грибы (и их люминесцентные системы) тоже представляют несомненный интерес в качестве люминесцентных биомаркеров и биодатчиков при создании методов люминесцентного микроанализа для биологии, биотехнологии и медицины. Длительное (от нескольких дней до нескольких недель) свечение грибов в широком ($4^{o}C$ - $50^{o}C$) температурном диапазоне, возможность культивирования в искусственных условиях и получения биомассы воздушного и глубинного мицелия, позволяют прогнозировать возможность их использования в создании новых биолюминесцентных биотестов. Однако в настоящее время, пока неизвестны структурно-функциональная организация люминесцентных систем грибов и механизмы их

светоизлучения, весьма затруднительно корректно оценить потенциал и перспективы использования грибной биолюминесценции в практических целях, например, в аналитике.

В то же время, уже сейчас несколько зарубежных исследовательских групп (в Германии, Англии, Бразилии) проводят проверку возможности применения светоизлучающих грибов как индикаторных объектов для биотестирования. Например, светящиеся грибы *Armillaria mellea*, *Micena citricolor* и *Gerronema viridilucens* были использованы в разработке тестов на токсичность [27,46,47]. В частности, с использованием светящихся грибов проводилось определение токсичности 3,5-дихлорфенола, пентахлорфенола и солей тяжелых металлов [46]. Был показан ингибирующий эффект этих соединений на свечение мицелия *Armillaria mellea* и *Mycena citricolor*, причем мицелий *A. mellea* оказался более резистентен к действию 3,5-дихлорфенола, чем мицелий *M. citricolor*. В работе [47] была показана возможность использования светящегося гриба *Gerronema viridilucens* в качестве биомаркера для определения ионов тяжелых металлов (Pb, Cd, Al). Светящийся глобулярный мицелий *A. mellea* и *Mycena citricolor* в качестве тест-объектов использовали британские и новозеландские исследователи [27,48]. При использовании биотестов на основе светящихся грибов для определения различных токсикантов авторы приведенных выше работ отмечали, что в целом величина EC_{50} для грибного свечения при действии токсикантов составляла тот же порядок, что и при использовании бактериальных биотестов [27,47,48].

1.4 Исследования люминесцентной системы светящихся высших грибов

Следует подчеркнуть, что наиболее сложное направление в изучении светящихся грибов связано с установлением структурно-функциональной организации их люминесцентной системы и расшифровкой механизма

излучения света. Несмотря на то, что разноплановые исследования светящихся грибов проводятся более ста лет, структура их люминесцентной системы и механизм светоизлучения до настоящего времени остаются не установленными. В настоящее время люминесцентные системы и механизмы свечения многих живых организмов хорошо изучены, из этих организмов выделены и охарактеризованы ферменты (люциферазы), катализирующие реакции излучения света и их субстраты (люциферины) [4]. В то же время, для светящихся высших грибов эта задача остается пока нерешенной. Молекулярная организация люминесцентной системы высших грибов до сих пор остается малопонятной. Прежде всего, остается неясным, какой фермент (или ферментный комплекс) выполняет в грибах функцию люциферазы и какова структура субстрата реакции свечения - люциферина. У специалистов, изучающих биолюминесценцию грибов, до сих пор нет единого мнения о молекулярно-клеточной организации их люминесцентной системы и механизме светоизлучения.

В настоящий момент в данной области существуем два мнения. Первое основывается на следующих экспериментальных фактах. В середине прошлого века в экспериментах *in vitro* с экстрактами грибов авторы работ [15,16,49,50] показали, что в реакции излучения участвуют два термолабильных белковых компонента - растворимая НАД(Ф)Н-зависимая редуктаза и люцифераза, представляющая собой нерастворимые частицы; термостабильный люциферин и НАД(Ф)Н. Затем, Аирт и Фоэрстер получили дополнительную информацию о люциферин-люциферазной реакции, используя препараты люциферина из гриба *Armillaria mellea* и люциферазы из гриба, идентифицированного ими как светящийся гриб *Collybia velutipes*, и предложили схему (рисунок 1) для описания люциферин-люциферазной реакции, которая обеспечивает люминесценцию грибов [16,50].

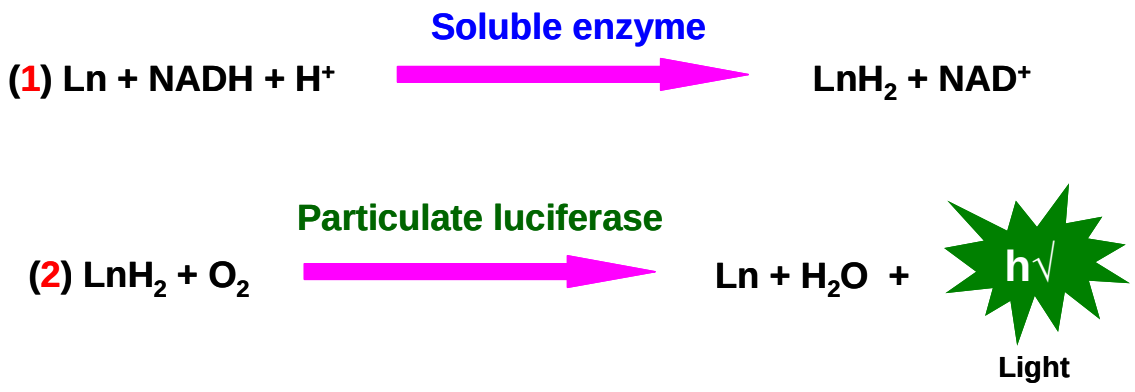

Рисунок 1 - Схема двухстадийной люциферин-люциферазной реакции в светоизлучающих грибах, предложенная Airth и Foerster [4]

Позднее этот результат был повторен двумя другими группами исследователей [17-19,51]. Однако следует подчеркнуть, что до настоящего времени структура и свойства люциферазы, НАД(Ф)Н-зависимой редуктазы и люциферина грибов неизвестны, поскольку эти компоненты до сих пор не получены в чистом виде. Более того, исследования люциферин-люциферазной природы свечения высших грибов в данных научных группах дальнейшего развития не получили. Об этом свидетельствует отсутствие более поздних публикаций авторов на эту тему. Вполне вероятно, что причина этого могла быть связана с неудачными попытками исследователей выделить грибную люциферазу и люциферин в чистом виде.

Надо отметить, что в своих исследованиях авторы приведенных выше работ использовали так называемую схему Дюбуа. Рафаэль Дюбуа во второй половине 19 века разработал схему, позволившую ему при изучении люминесцентных систем двустворчатого моллюска (bivalve mollusk) *Pholas dactylus* и Индийского жука-щелкуна (Indian click-beetle) *Pyrophorus sp*. продемонстрировать свечение in vitro [52,53]. Получая из биомассы этих светящихся организмов «горячие» и «холодные» экстракты и смешивая их между собой, ему удалось зарегистрировать люминесценцию. Эти данные позволили Дюбуа дать два важных определения - «люцифераза» и

«люциферин». Первое он дал некому белковому фактору, присутствующему в холодном экстракте и катализирующему реакцию излучения света, второе – термостабильному компоненту, присутствующему в горячем экстракте и являющемуся субстратом реакции.

Иное мнение относительно люминесценции высших грибов состоит в следующем. Ранее высказывалась идея об участии активных форм кислорода и ферментов с оксидазной функцией в механизме люминесценции высших грибов [4,26]. Результаты исследований светящихся грибов, проводимых в ИБФ СО РАН, также свидетельствуют в пользу участия активных форм кислорода и оксидазных ферментов в механизме грибного свечения [21,23]. Полученные в этих работах данные указывают на взаимосвязь грибной люминесцентной системы с мембранными структурами [21,23,54,55], что хорошо согласуется с результатами других авторов, показавших, что люцифераза грибов представляет собой нерастворимые частицы [15,16,49,50]. Совокупность полученных данных позволила сделать предположение, что в светоизлучении грибов могут участвовать следующие ферментные системы, ассоциированные с мембранными структурами: оксидазы (в частности, пероксидазы) лигнинразрушающего комплекса, система цитохрома P450, ферменты дыхательной цепи митохондрий [23,54]. Все указанные ферментные системы могут продуцировать активные формы кислорода, а две из них (оксидазы лигнинолитического комплекса и система цитохрома P450) - катализировать окисление органических субстратов (включая люциферин) с участием активных форм кислорода. В пользу такой версии могут свидетельствовать и предположения, высказанные в работах предыдущих авторов. Так, в работе [16] высказывалось предположение, что нерастворимые частицы грибной люциферазы похожи на митохондрии. В работе [17] делалось предположение, что в процесс грибного свечения может вовлекаться система цитохрома P450.

1.5 Представления о субстрате люминесцентной реакции высших грибов

Многие исследователи предпринимали попытки выделить люциферин из светящихся грибов. Кувабара и Вассинк экстрагировали люциферин из 15 килограммов мицелия *Omphalia flauida* (гриб, растущий в Пуэрто-Рико на листьях табака) и получили его в кристаллическом виде [56]. Авторы показали, что выделенный люциферин обладал хемилюминесценцией в присутствии H_2O_2 и излучал свет с максимумом λ_{max} = 524 нм в присутствие препарата люциферазы, полученной по технологии Аирта (Airth's Iuciferase). Однако в этой работе никакой дополнительной информации о химической природе выделенного люциферина не было приведено. Эндо и соавторы выделили из плодовых тел гриба *Lampteromyces japonicus* несколько соединений, похожих на люциферин, полученный Кувабарой и Вассинком, и вещество (ergosta-4,6,8(14),22-en-3-one), которое обладало флуоресценцией с максимумом эмиссии λ_{max} = 530 нм, практически совпадающей с максимумом биолюминесценции различных грибов [10]. Из того же гриба Исобе и соавторы выделили два соединения - рибофлавин и лампторофлавин (lampteroflavin), которые имели спектры флуоресценции с максимумом эмиссии λ_{max} = 524 нм практически идентичные с биолюминесценцией гриба [57,58]. Однако О'Канэ и соавторы исключили рибофлавин, как эмиттер биолюминесценции гриба, на основании их спектральных исследований [59]. По нашему мнению, спектры флуоресценции не могут служить достаточным доводом в пользу того, что выделенное из биомассы гриба соединение (соединения) является эмиттером грибной биолюминесценции. Вполне вероятно, что светящиеся грибы могут содержать большое количество флуоресцентных соединений и спектры излучения некоторых из них могут совпадать со спектрами излучения светящихся грибов [4]. Поэтому для более обоснованного вывода важно

показать, что выделенное из грибной биомассы соединение на самом деле стимулирует грибное свечение и участвует в реакции светоизлучения.

Грибным люциферином, впервые полученным в чистом виде был паналь (panal). Паналь (рисунок 2) выделен из светящегося гриба *Panellus stipticus*, структурные особенности и свойства этого соединения и его прекурсоров были достаточно полно исследованы [20,60-62]. В дальнейшем в чистом виде был выделен люциферин из светящегося гриба *Mycena citricolor* (рисунок 2), после чего достаточно полно были исследованы его свойства и свойства его прекурсоров [4].

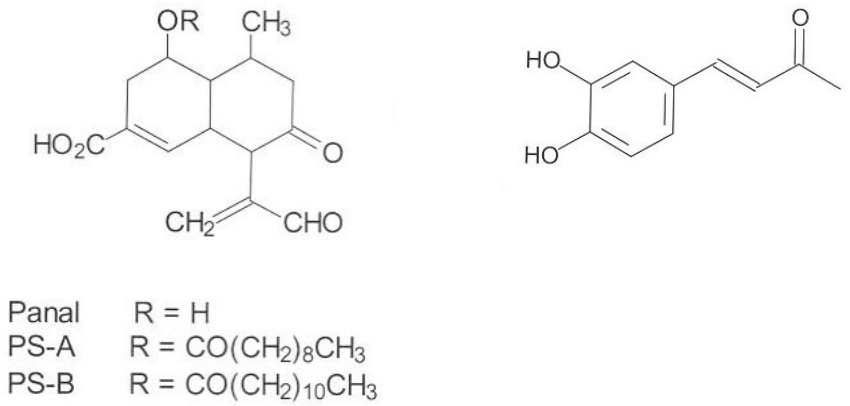

Рисунок 2 - Структура люциферинов из светящихся грибов: слева - паналь (и его прекурсоры – PS-A и PS-B) из *Panellus stipticus*; справа - прекурсор люциферина из *Mycena citricolor* [4]

Недавно в экстрактах из мицелия светоизлучающего гриба *Neonothopanus nambi* был обнаружен низкомолекулярный, термоустойчивый компонент, который активировал свечение гриба [21,54]. Обнаруженный активатор выявляется в подмембранной фракции после ультрафильтрации экстрактов через мембрану с пределом исключения 10 kDa; сохраняет стимулирующий эффект после кипячения при 100°C в течение нескольких минут и после длительного концентрирования при температурах 45°C и 60°C; стимулирует

свечение гриба, а при добавках перекиси водорода увеличивает его на порядки (рисунок 3).

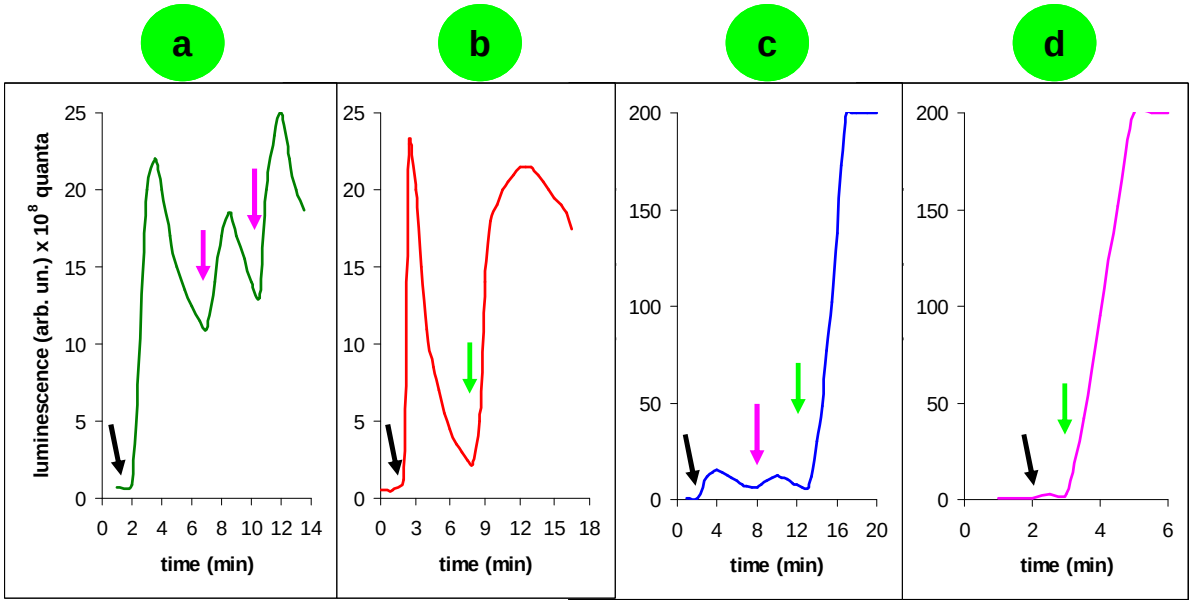

Рисунок 3 - Стимуляция свечения мицелия *N. nambi* добавками разных компонентов: a – последовательные добавки экстракта, содержащего активатор; b – однократная добавка перекиси водорода; c - последовательные добавки сначала экстракта и затем перекиси водорода; d - последовательные добавки сначала перекиси водорода и затем экстракта. Стрелками показаны моменты внесения глобул в измерительную кювету и последующих добавок компонентов [54]

Авторы упомянутой выше работы установили, что экстракты, содержащие активатор, обладают флуоресценцией в видимой области спектра (диапазон длин волн 480 – 630 нм) с максимумом 520 – 537 нм, что хорошо согласуется с данными спектра люминесценции мицелия этого гриба *in vivo* [21]. Это позволило сделать предположение, что в экстрактах содержится эмиттер люминесцентной системы гриба *N. nambi*, для которого было предложено название намбин (nambin). Авторы отметили, что выделение намбина в чистом виде и установление его структуры и физико-химических свойств является приоритетной задачей дальнейших исследований.

Резюме

Таким образом, из приведенных в обзоре литературы фактов следует, что в настоящее время обнаружено достаточно большое количество светящихся видов грибов и исследования их биолюминесценции проводятся почти два столетия. Однако структура люминесцентной системы этих живых организмов и механизм реакции светоизлучения до настоящего времени остается загадкой, в отличие от биолюминесцентных систем бактерий и многих видов животных (жгутиковые, кишечнополостные, черви, насекомые, ракообразные, моллюски, рыбы), которые расшифрованы за последние десятилетия [4]. У специалистов, работающих в области грибной биолюминесценции, до сих пор нет единого мнения о молекулярно-клеточной организации люминесцентной системы высших грибов. В настоящий момент в этой области можно считать устоявшимися два мнения. Согласно первому, свечение грибов определяется функционированием фермент-субстратной системы люцифераза – люциферин [15-19,51]. Согласно второму, свечение грибов связано с окислением органических субстратов оксидазами в присутствие активных форм кислорода и происходит без участия специализированного фермента [4,20-24]. Это позволяет сделать вывод о том, что исследование структурно-функциональной организации люминесцентной системы высших грибов представляет не только фундаментальное значение для развития представлений о механизме свечения этих живых объектов, но и имеет практическую ценность для оценки перспектив использования грибного свечения в аналитических целях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2. Материалы и методы

2.1 Объекты исследования и условия их культивирования

Основными объектами исследований являлись два вида светящихся базидиомицетов, произрастающих в разных регионах и климатических зонах Земного шара и культуры которых находятся в Коллекции микроорганизмов ИБСО Института биофизики СО РАН:

Armillaria borealis (культура ИБСО 2310) – гриб данного вида обнаружен Пашеновой Н.В. (ИЛ СО РАН) в окрестностях г. Красноярска в 2007 году.

Neonothopanus nambi (культура ИБСО 2391) - (Speg.) R.H. Petersen et Krisai, данный вид обнаружен сотрудниками БИН РАН во Вьетнаме в Национальном парке «Cat Tien» в 2014 году. Культура гриба (БИН 3293) предоставлена Псурцевой Н.В. (БИН РАН, С.-Петербург, Россия)

В экспериментах использовали биомассу пленочного и глобулярного мицелия, которую получали при стационарном (на жидких питательных средах в чашках Петри) и глубинном (в погруженных условиях жидкой питательной среды при постоянном перемешивании) режимах культивирования грибов.

Для выращивания мицелия гриба *N. nambi* использовали жидкую питательную среду сусло с дрожжевым экстрактом (YM) (Hi Media Laboratories Pvt., Индия) следующего состава: 10 г глюкозы, 5 г пептона, 3 г дрожжевой экстракт, 3 г солодовый экстракт в 1 литре дистиллированной воды. В дополнительных экспериментах для выращивания мицелия использовали также жидкую питательную среду сусло с глюкозой и пептоном (M) (Hi Media Laboratories Pvt., Индия) следующего состава: 2 г глюкозы, 20 г мальт (солодовый) экстракт, 1 г пептона в 1 л дистиллированной воды. В ряде случаев выращивание мицелия проводили на твердых питательных средах YM и M, для

чего в жидкие среды добавляли агар-агар из расчета 20 г на 1 л среды. Культивирование проводили в двух вариантах. При стационарном режиме мицелий выращивали в чашках Петри диаметром 90 мм при температуре 27°С в течение 10 суток. Культивирование гриба проводили в термостатах ТСО-1/80 и СПУ (Россия). При глубинном выращивании мицелия культивирование гриба проводили в колбах, содержащих жидкую питательную среду (YM или M). Инокулятом являлась суспензия измельченного мицелия, предварительно выращенного в чашках Петри при указанных выше условиях. Для этого биомассу выращенного пленочного мицелия при стерильных условиях ламинара (Purifier® Biological Safety Cabinet, Labconco®, США) протирали через сито и полученную суспензию засевали в жидкую питательную среду. Объем посевного материала составлял 2 - 5% от объема питательной среды. Культивирование проводили в течение 4 - 5 суток при температуре 28°С и постоянном перемешивании со скоростью 160 - 180 об/мин в инкубаторе - Environmental Shaker-Incubator ES-20 (BIOSAN, Латвия).

При выращивании мицелия гриба *A. borealis* использовали жидкую питательную картофельно-декстрозную среду PDB (Potato Dextrose Broth) (Hi Media Laboratories Pvt., Индия) следующего состава: 200 г картофельного экстракта, 20 г декстрозы в 1 л дистиллированной воды. Выращивание мицелия также проводили в двух режимах – при стационарном (в чашках Петри) и глубинном культивировании гриба. На чашках Петри мицелий выращивали при 24°С (термостаты ТСО-1/80 и СПУ) в течении 14 - 20 суток. При глубинном способе выращивания культивирование проводили в колбах, содержащих жидкую питательную PDB среду, в течение 10 - 16 суток при температуре 24°С и постоянном перемешивании со скоростью 160 - 180 об/мин на шейкере-инкубаторе ES-20 (BIOSAN, Латвия). Инокулят для глубинного культивирования гриба *A. borealis* готовили таким же образом, как это указано выше при подготовке инокулята *N. nambi*. Объем вносимого посевного материала составлял 2 - 5% от объема питательной среды.

2.2 Оценка образцов мицелия *N. nambi* и *A. borealis* (внешний вид и световая эмиссия) при разных способах культивирования грибов

Изображения внешнего вида и люминесценции образцов пленочного и глобулярного мицелия, выращиваемых при разных способах культивирования изучаемых видов грибов, получали с помощью системы видеодокументации GelDoc XR Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Для этого образцы (чашки Петри или колбы с мицелием) помещали в камеру Universal Hood II. При включенном свете дневных ламп получали изображение образцов в видимом свете, при выключенных лампах регистрировали области свечения образцов. Система Universal Hood II позволяет регистрировать световые сигналы низкой интенсивности. При этом регистрация люминесцентного сигнала при фиксированных условиях (время накопления сигнала, размер диафрагмы) позволяет осуществлять наблюдение за его динамикой и проводить сравнительный анализ интенсивностей световой эмиссии, полученных от разных образцов мицелия. В работе были использованы следующие условия регистрации: диафрагма – максимально открыта; время накопления сигнала – от 30 до 300 секунд. В случае необходимости, изображение могло быть усилено с помощью программного обеспечения прибора при использовании функции Transform: режим 1 - gamma 4.00 low 0.0; режим 2 - gamma 4.00, low 60021.

2.3 Выделение грибных люминесцентных систем из мицелия *N. nambi* и *A. borealis*

Схема выделения люминесцентной системы из мицелия гриба *N. nambi* включала следующие стадии, которые проводили при температуре 0 - 4°C. Выращенный при стационарном способе культивирования пленочный мицелий извлекали из чашек Петри и промывали деионизованной водой для удаления остатков компонентов питательной среды и экзометаболитов. Деионизованную

воду получали с помощью системы деионизации воды Milli-Q system (Millipore, США). Отмытый мицелий помещали в большой объем деионизованной воды и инкубировали в течение 24 часов при комнатной температуре с двукратной сменой объема воды. Известно [54,63], что длительная отмывка биомассы светящихся грибов водой сопровождается значительным увеличением их свечения. Проинкубированный мицелий извлекали из воды, а ее остатки из биомассы удаляли с помощью фильтровальной бумаги. После этого мицелий механически измельчали в холодной чашке и переносили в стакан, помещенный в ледяную баню. К биомассе добавляли охлажденный 0.1М фосфатный буфер (pH 7.0), содержащий 1% БСА (Serva, Германия), в соотношении 1 : 5 (вес сырой биомассы : объем буфера). Биомассу обрабатывали ультразвуком, используя ультразвуковой дезинтегратор «Волна» - модель УЗТА 0.63/22-ОМ (ООО Центр ультразвуковых технологий, Россия). Ультразвуковую обработку проводили при мощности 200 Вт три раза по 5 секунд с интервалами 1 минута. Полученный гомогенат переносили в охлажденные пробирки и центрифугировали при 45000 g в течение 30 минут на центрифуге Avanti® J-E (Beckman-Coulter, США). Осадок отбрасывали, а супернатант (экстракт), использовали для исследований, сохраняя его при 4°C. При длительном хранении экстрактов использовали два варианта. В первом случае, экстракты замораживали при -20°C и хранили в замороженном виде при этой температуре. Во втором - экстракты замораживали при температуре -80°C в кельвинаторе -86°C Ultralow Freezer (NuAire, Inc., США) и лиофилизировали с помощью сушилки лиофильной ЛС-500 (Россия), после чего хранили сухие препараты при -20°C. Для оценки функциональной активности люминесцентной системы при длительном хранении через определенные интервалы времени часть хранящихся образцов извлекали и либо размораживали при первом варианте хранения, либо растворяли в деионизованной воде препараты, хранившиеся в сухом виде.

Для выделения люминесцентной системы из мицелия *A. borealis* подготовку биомассы проводили следующим образом. Глобулы мицелия, полученные при выращивании гриба глубинным способом, извлекали из питательной среды и промывали в деионизованной воде для удаления остатков питательной среды и экзометаболитов. Затем глобулы переносили в большой объем деионизованной воды и инкубировали в течение 24 часов при постоянном барботаже воздухом для повышения эффективности отмывки биомассы. В течение этого времени проводили двукратную замену объема воды. Отмытые деионизованной водой глобулы мицелия переносили в чашку Петри, помещенную на лед, и механически измельчали. Последующие стадии выделения экстрактов, содержащих люминесцентную систему гриба *A. borealis*, а также условия хранения полученных экстрактов были такими же, как и при выделении люминесцентной системы из мицелия гриба *N. nambi*, изложенные в предыдущем разделе.

2.4 Измерение люминесценции экстрактов из мицелия *N. nambi* и *A. borealis*, содержащих светоизлучающие системы

Измерение люминесценции экстрактов, выделенных из биомассы мицелия, проводили с помощью люминометров БЛМ8801 (СКТБ «Наука», Красноярск) и GloMax 20/20 Luminometer (Promega, США), калиброванных по радиоактивному стандарту Гастингса-Вебера [64] - одна люминесцентная единица составляет 10^8 и $2.7 \cdot 10^3$ фотонов в 1 секунду, соответственно. В случае проведения измерений люминесценции на люминометре БЛМ8801 световые сигналы регистрировали с помощью самописца 2210 (LKB, Швеция). При использовании люминометра GloMax 20/20 уровень световой эмиссии и кинетику люминесценции отслеживали в течение периодов времени от 60 - 900 секунд до нескольких часов с регистрацией сигнала каждую секунду.

2.5 Оценка активности люминесцентных систем из грибов *N. nambi* и *A. borealis* при разных значениях pH

Изучение функциональной активности выделенных люминесцентных систем в зависимости от pH среды проводили следующим образом. Лиофильно высушенный препарат экстракта, содержащего соответствующую люминесцентную систему (из мицелия *N. nambi* или *A. borealis*), растворяли в деионизованной воде. Из полученного раствора отбирали равные аликвоты (по 50 мкл) и вносили в 950 мкл буфера с соответствующим значением pH (исследования проведены с использованием серии 0.1М фосфатных буферов, содержащих 0.1% БСА и имеющих значения pH в диапазоне 6.5 - 9.0). После этого пробы перемешивали и регистрировали уровень их световой эмиссии на люминометре GloMax 20/20.

2.6 Изучение активности люминесцентных систем *N. nambi* и *A. borealis* при добавках разных компонентов

Подготовку образцов для исследований проводили следующим образом. Сухой препарат, полученный после лиофильного высушивания экстракта (из мицелия *N. nambi* или *A. borealis*), содержащего люминесцентную систему, растворяли в 1.5 мл деионизованной воды. После полного растворения из образца отбирали аликвоты по 100 мкл и регистрировали на люминометре GloMax 20/20 начальный уровень их световой эмиссии в течение 5 минут, фиксируя динамику уровня люминесцентного сигнала. После этого в образец добавляли раствор изучаемого вещества и вновь регистрировали интенсивность люминесцентного сигнала.

В качестве веществ, которые стимулируют световую эмиссию грибных люминесцентных систем, использовали: для системы из гриба *N. nambi* - растворы НАДФН и НАДН (Serva, Германия) - финальная концентрация в

пробе 0.3 мМ, раствор H_2O_2 (Галено Фарм™, Россия) - финальная концентрация в пробе 8.8 мМ; для системы из гриба *A. borealis* - растворы НАДФН и НАДН (Serva, Германия) - финальная концентрация в пробе 0.3 мМ, водный экстракт, полученный из глобулярного мицелия этого гриба и содержащий субстрат (см. ниже) реакции свечения. Изучаемые компоненты вносили в пробы последовательно в следующих объемах: по 10 мкл НАДФН (или НАДН), 5 мкл пероксида водорода, 20 мкл водного экстракта из глобулярного мицелия *A. borealis*. Концентрацию НАДФН и НАДН в пробах варьировали при изучении зависимости люминесцентной активности систем.

Для экстракции субстрата люминесцентной системы гриба *A. borealis* биомассу глобулярного мицелия данного гриба, отмытую деионизованной водой, помещали в охлажденную керамическую чашку и механически измельчали. Разрушенную биомассу переносили в стеклянный термостойкий стакан. К биомассе добавляли деионизованную воду в соотношении 1 : 4 (объем воды : объем сырой биомассы), образец помещали в СВЧ печь model MW 712BR (Samsung, Малайзия) и при мощности 800 Вт нагревали до закипания воды. После этого образец охлаждали на льду, жидкую часть переносили в пробирки и центрифугировали при 16000 g в течение 30 минут при температуре 4°C на центрифуге 5415R (Eppendorf, Германия). Осадок отбрасывали, а супернатант замораживали при -20°C и хранили при этой температуре до момента использования.

В качестве потенциального ингибитора светоизлучающих систем использовали препарат флуконазола, производимый фирмой Dr. Reddis, Laboratory Ltd. (Hyderabad, Индия) и поставляемый в виде раствора с концентрацией этого соединения - 2 мг/мл. Измерение начального уровня световой эмиссии пробы и его изменения при последовательных добавках НАДФН и пероксида водорода при работе с системой из гриба *N. nambi*, или экстракта из глобул мицелия *A. borealis* при работе с системой из этого гриба, проводили так, как это изложено выше. Полученные данные использовали в

качестве контроля активности люминесцентной системы. При оценке эффекта флуконазола в опытные пробы вносили по 100 мкл препарата системы, люминесцентную активность которой регистрировали в течение 1 минуты. После этого в пробу вносили разные количества флуконазола (5 - 30 мкл исходного раствора препарата) и вновь регистрировали уровень люминесценции в течение 4 минут. После этого в образцы последовательно вносили НАДФН и пероксид водорода (или экстракт из глобул мицелия *A. borealis*), каждый раз регистрируя интенсивность и кинетику люминесцентного сигнала. При добавках больших объемов флуконазола (20 - 30 мкл) для сохранения буферной емкости и pH в измеряемом образце, содержащем люминесцентную систему, в исходный раствор флуконазола предварительно добавляли раствор 2 М фосфатный буфер (pH 7.0) до финальной концентрации 0.1 М.

2.7 Выделение активаторов люминесценции из мицелия *N. nambi* и *A. borealis*

Активаторы люминесценции из грибов *N. nambi* и *A. borealis* в обоих случаях экстрагировали из предварительно отмытой деионизованной водой биомассы глобулярного мицелия посредством ее замораживания при -20°C с последующим оттаиванием и отделением жидкой части, содержащей активатор, фильтрованием. Полученные экстракты обрабатывали частицами модифицированных наноалмазов (МНА), используемых в качестве адсорбента для удаления из экстрактов возможных микропримесей пептидных компонентов. Известно, что МНА проявляют высокую избирательность к соединениям пептидной природы и, в частности, используются для эффективного выделения и очистки белков из сложных смесей [65]. После обработки МНА и удаления наночастиц центрифугированием при 16000 g в течение 20 минут при 4°C, экстракты концентрировали с использованием

роторного концентратора Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия), после чего замораживали при -20°C и хранили при этой температуре до момента использования.

2.8 Изучение некоторых свойств активаторов люминесценции, выделенных из мицелия *N. nambi* и *A. borealis*

В ходе экспериментов изучали следующие физико-химические свойства активаторов, выделенных из изучаемых видов грибов. Термостабильность активаторов исследовали посредством термообработки экстрактов при 100°C кипячением на водяной бане Water bath type 356 (Unipan, Польша) в течение 1 - 5 минут. Предварительную оценку молекулярной массы активаторов проводили с помощью ультрафильтрации экстрактов через мембрану с пределом исключения 10 кДа, используя систему Amicon (США). Спектры поглощения экстрактов, содержащих активатор из мицелия *N. nambi*, изучали с помощью спектрофотометров UV/VIS-spectrophotometer UVIKON 943 (Kontron Instruments, Италия) и UV-1800 (Shimadzu, Япония). Для исследований флуоресцентных свойств активатора из гриба *N. nambi* использовали спектрофлуориметр Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter (Agilent Technologies, США).

3 Результаты и обсуждение

3.1 Рост и люминесценция мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* при разных режимах культивирования

В ходе исследований установлено, что при стационарном способе культивирования изучаемых видов светящихся базидиомицетов на жидких питательных средах в чашках Петри большей активностью роста обладает мицелий гриба *N. nambi*, по сравнению с ростом мицелия *A. borealis*. Заметный равномерный рост колоний пленочного мицелия *N. nambi* отмечается уже на 3 - 4 день после посева, и колонии достигают максимального размера (полное заполнение мицелием всей поверхности чашки Петри) на 8 - 10 день (рисунок 4). Тем не менее, наблюдения показывают, что скорости роста мицелия *N. nambi* на средах YM и M несколько различаются – на YM среде рост мицелия идет активнее, чем на среде M.

Было показано, что при аналогичном способе культивирования на жидкой питательной среде PDB рост колоний пленочного мицелия *A. borealis* идет значительно медленнее, при этом наблюдается рост плотных колонией мицелия с четкими краями (рисунок 4). Колонии мицелия не достигают максимального размера (полное заполнение чашки Петри мицелием) даже на 15 - 20 сутки культивирования. Показано, что при стационарном способе культивирования наблюдается регистрируемое свечение растущего пленочного мицелия обоих видов грибов (рисунок 4).

Как показали исследования, технология глубинного культивирования в объеме жидкой питательной среды позволяет осуществлять более быстрое выращивание грибной биомассы *N. nambi* и *A. borealis* и получать мицелий в виде глобул шарообразной формы (рисунок 4). Получаемые при глубинном выращивании мицелярные глобулы *N. nambi* и *A. borealis* имеют выраженную шероховатую поверхность за счет большого количества выростов - гиф. При

этом отмечено, что глобулы мицелия *A. borealis*, как правило, имеют меньшее количество поверхностных выростов, по сравнению с глобулами *N. nambi*. При данном способе культивирования диаметр получаемых мицелярных глобул, как правило, варьирует в диапазоне 2 - 7 мм. Получаемые таким способом культивирования глобулы мицелия обоих видов изучаемых грибов обладают регистрируемым свечением (рисунок 4).

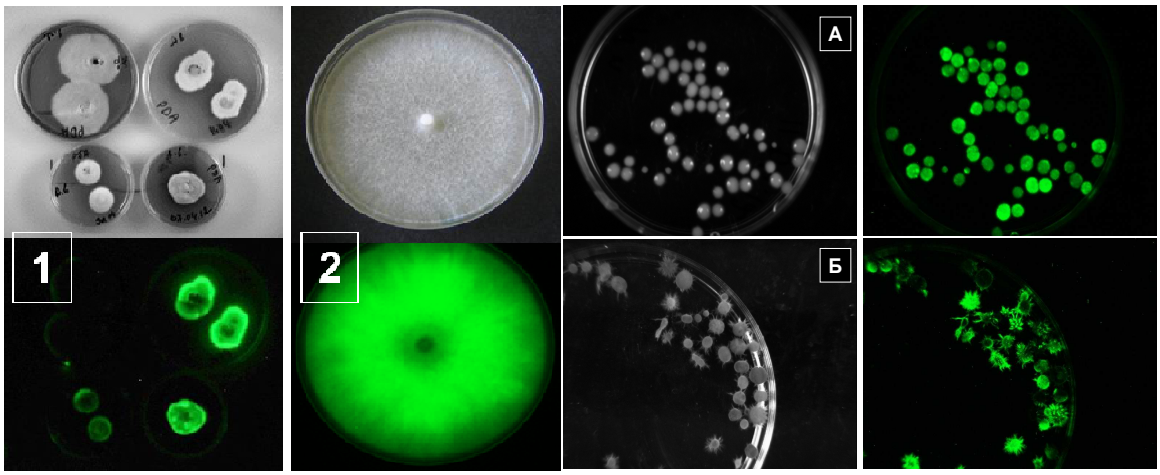

Рисунок 4 - Слева - внешний вид и свечение пленочного мицелия *A. borealis* (1) и *N. nambi* (2), полученного при выращивании в чашках Петри.

Справа - внешний вид и свечение глобулярного мицелия *N. nambi* (А) и *A. borealis* (Б), полученного при выращивании в глубинной культуре.

Изображения получены с помощью Universal Hood II system (Bio-Rad, США)

Результаты культивирования изучаемых видов грибов, представленные в этом разделе, позволили определить оптимальные способы получения биомассы мицелия *N. nambi* и *A. borealis* для последующего выделения экстрактов, содержащих люминесцентные системы грибов. Для выделения люминесцентной системы из гриба *A. borealis* выращивали и использовали биомассу его глобулярного мицелия, полученную при глубинном режиме культивировании в колбах (рисунок 5). Для выделения люминесцентной системы из гриба *N. nambi* использовали пленочный мицелий, полученный при выращивании гриба на чашках Петри (рисунок 6).

При выполнении этого раздела работы было установлено, что инкубация мицелия обоих видов грибов в деионизованной воде приводит к значительному увеличению световой эмиссии биомассы (рисунки 5 и 6). Этот экспериментальный факт является важным обстоятельством для последующих стадий исследования, поскольку демонстрирует, что перед проведением экстракции люминесцентных систем грибов требуется предварительная и длительная инкубация грибной биомассы в деионизованной воде.

Так, было показано (рисунок 5), что глобулы мицелия гриба *A. borealis* обладали достаточно ярким регистрируемым свечением уже в питательной среде. В то же время, видно, что длительное (в течение 12 часов) инкубирование глобул мицелия в деионизованной воде с постоянным барботажем воздухом сопровождается значительным увеличением интенсивности их световой эмиссии.

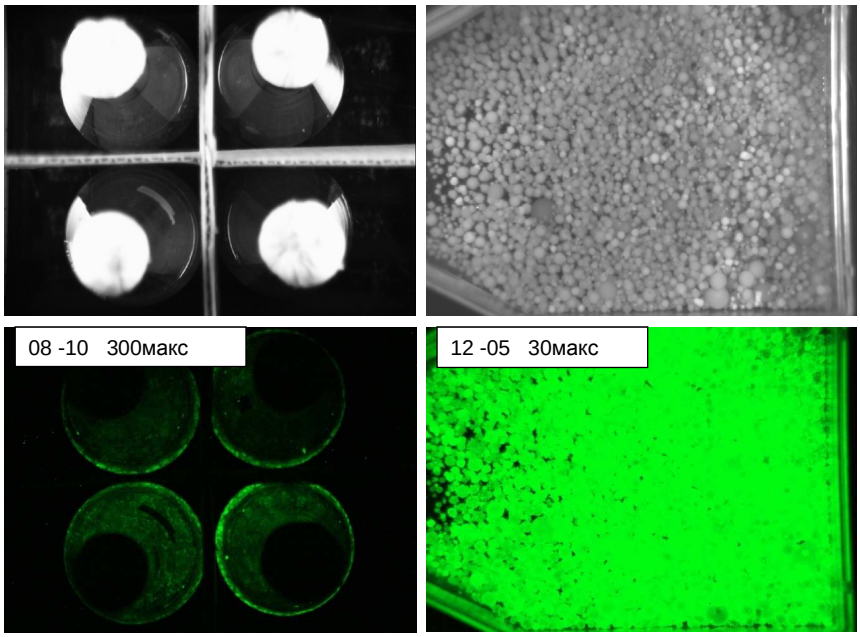

Рисунок 5 – Внешний вид (вверху) и люминесценция (внизу) глобул мицелия гриба *A. borealis* при глубинном способе его культивирования в колбах (слева) и после инкубации в воде с постоянным барботажем воздухом (справа).

Время экспозиции исходных образцов глобул (слева) - 300 сек, после их обработки (справа) - 30 сек. Изображения получены с помощью Universal Hood II system (Bio-Rad, США)

Аналогичные изменения интенсивности свечения наблюдались и в исследованиях с пленочным мицелием гриба *N. nambi*. В данном случае экспериментально было показано, что пленочный мицелий этого вида гриба, выращенный в чашках Петри на жидкой питательной среде, обладал низким начальным уровнем люминесценции. Однако было установлено (рисунок 6), что отмывка мицелия деионизованной водой от компонентов питательной среды и экзометаболитов, которые могут накапливаться в грибе в процессе его роста, и последующая длительная (12 часов) инкубация в воде приводили к очень значительному (на 2 - 3 порядка и более) увеличению интенсивности его люминесценции. Более того, было показано, что высокий уровень свечения мицелия сохранялся и при последующем его механическом измельчении (рисунок 6).

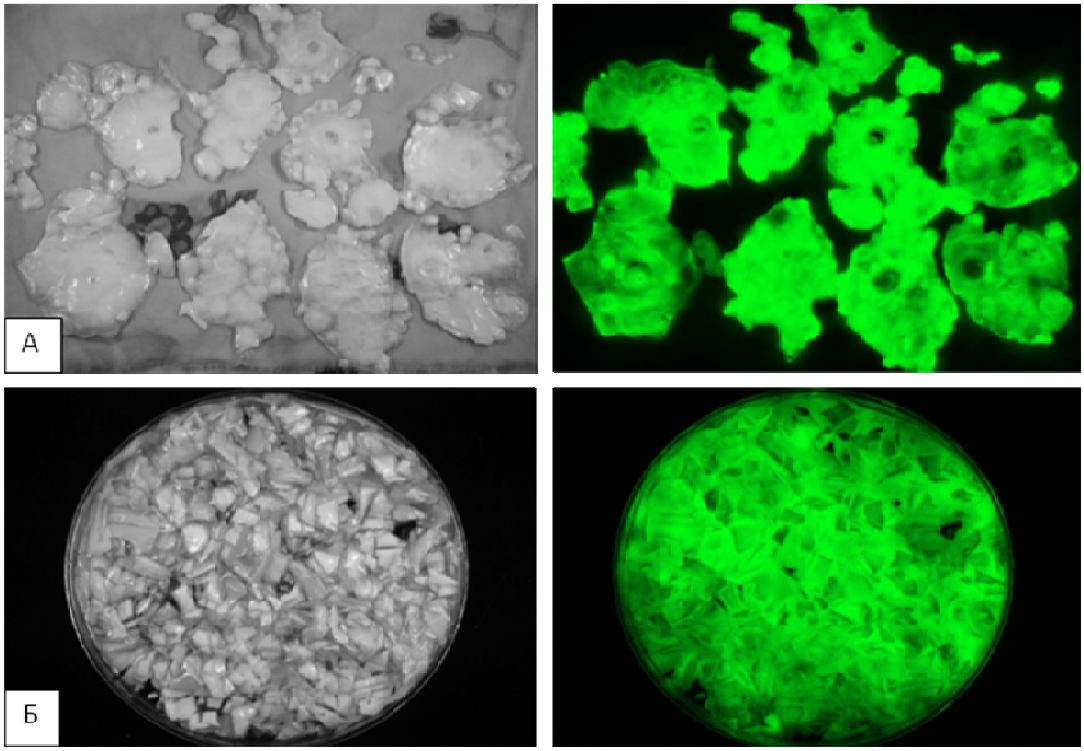

Рисунок 6 - Внешний вид (слева) и свечение (справа) исходного цельного (А) и измельченного (Б) пленочного мицелия гриба *N. nambi*. Время экспозиции – 100 сек. Изображения получены с помощью Universal Hood II system (Bio-Rad, США)

Таким образом, в результате исследований, выполненных в данном разделе работы, были определены и оптимизированы условия выращивания биомассы мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* при разных режимах культивирования - в чашках Петри и в глубинной культуре. Указанные способы культивирования позволяют получать образцы пленочного и глобулярного мицелия, обладающие продолжительным и устойчивым свечением. В ходе экспериментов установлено, что инкубация мицелия обоих видов грибов в деионизованной воде сопровождается значительным увеличением его световой эмиссии, что имеет важное практическое значение при последующем выделении из биомассы грибных светоизлучающих систем. В целом, представленные данные согласуются с результатами наших предыдущих базовых исследований [33], полученных при изучении роста и люминесценции мицелия разных видов светящихся базидиомицетов при разных условиях их культивирования.

3.2 Выделение грибных люминесцентных систем из мицелия *N. nambi* и *A. borealis* и их некоторые свойства

В работе установлено, что экстракты, полученные из мицелия светящихся грибов *A. borealis* и *N. nambi* разработанным и изложенным выше способом (см. раздел Методическая часть), обладают регистрируемым и продолжительным свечением (рисунок 7). Это позволяет говорить, что из данных видов грибов впервые выделены экстракты, содержащие люминесцентные системы, которые включают все необходимые белковые и небелковые компоненты, обеспечивающие свечение *in vitro*. Ранее, многие авторы при изучении светящихся высших грибов [15-17] демонстрировали свечение *in vitro* только при смешивании «холодных» и «горячих» экстрактов, полученных из грибной биомассы и содержащих ферменты и субстраты люминесцентной реакции, и

только в том случае, когда в смесь дополнительно добавлялся экзогенный НАД(Ф)Н.

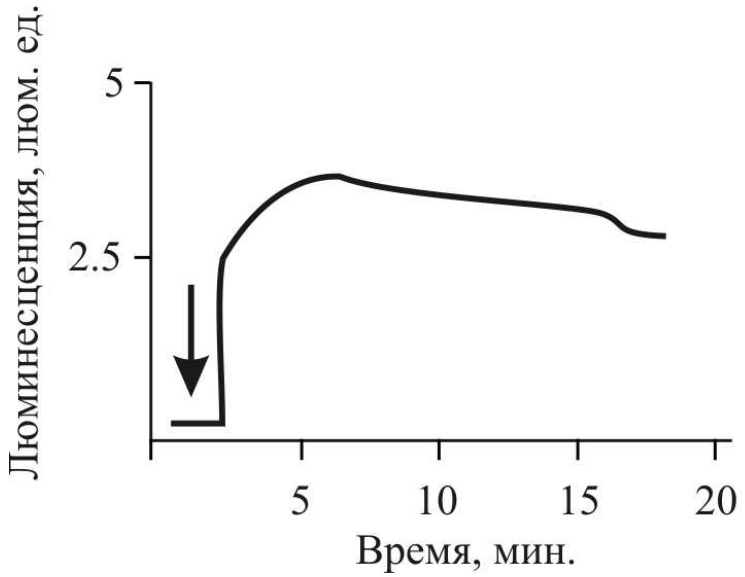

Рисунок 7 – Типичная динамика свечения *in vitro*, регистрируемая от экстрактов, выделенных из разных образцов мицелия *N. nambi* и содержащих люминесцентную систему гриба

В экспериментах было установлено, что обе люминесцентные системы, выделенные из изучаемых видов грибов, активируются добавками НАДФН и НАДН (рисунок 8), являющимися необходимыми компонентами люминесцентной реакции. Эти данные хорошо согласуются с результатами работ предыдущих авторов, исследовавших люминесцентные системы иных видов светящихся высших грибов с использованием схемы Дюбуа [16,17,50,51], в которых было показано, что для реакции светоизлучения *in vitro* необходима добавка НАДФН (или НАДН).

Установлено, что добавка пероксида водорода к люминесцентной системе из гриба *N. nambi*, предварительно активированной НАД(Ф)Н, увеличивает интенсивность световой эмиссии от нескольких раз до порядков (рисунок 8). Эти данные согласуются с результатами наших исследований [21,54], в которых был обнаружен эффект стимуляции свечения мицелия *N. nambi*

добавками H_2O_2. В то же время, в параллельных экспериментах с люминесцентной системой из гриба *A. borealis* мы не наблюдали стимулирующего эффекта пероксида водорода. Вероятно, наблюдаемые различия могут быть связаны с разным содержанием в экстрактах ферментов, обладающих антиоксидантной активностью, в частности, каталазы, активно метаболизирущей H_2O_2. Недавно было показано, что в экстрактах из мицелия *A. borealis* активность каталазы более чем на два порядка выше, по сравнению с активностью в экстрактах из мицелия *N. nambi* [66].

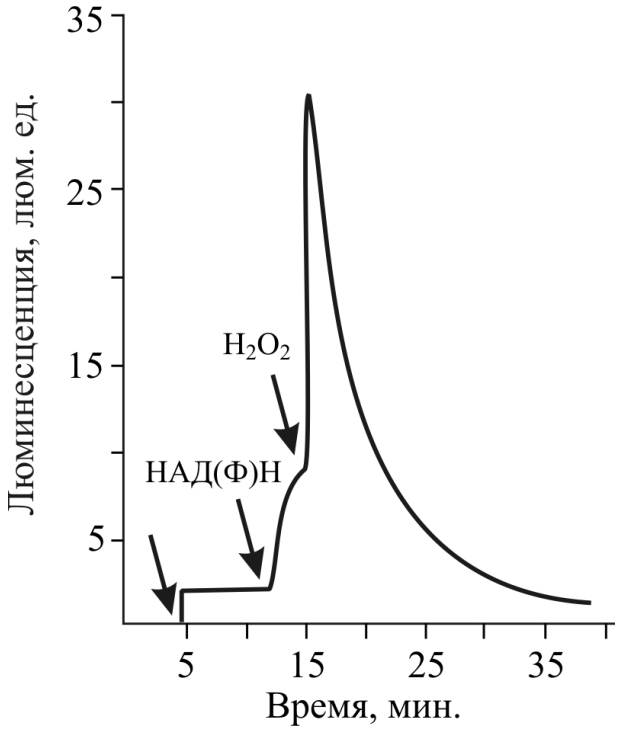

Рисунок 8 - Стимуляция свечения люминесцентной системы из гриба *N. nambi* добавками НАД(Ф)Н и перекиси водорода

Однако было показано, что уровень световой эмиссии люминесцентной системы из гриба *A. borealis*, активированной НАД(Ф)Н, может значительно (в 2 – 3 раза) возрастать при добавлении экстрактов, выделенных из глобулярного мицелия этого гриба и содержащих субстрат люминесцентной реакции (рисунок 9).

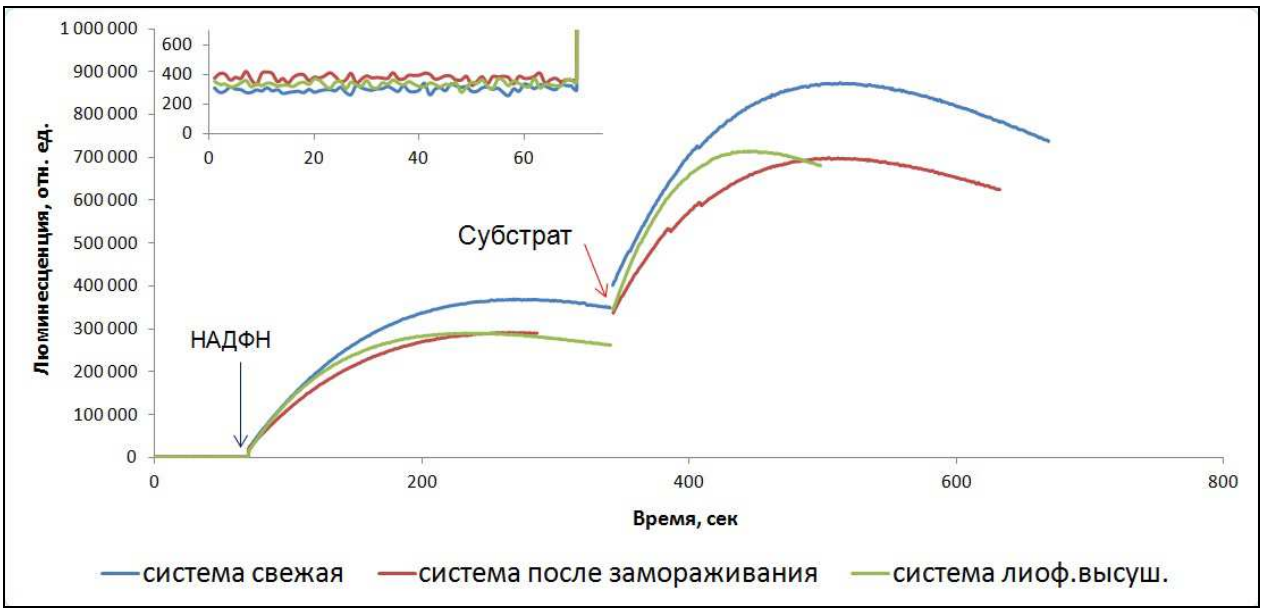

Рисунок 9 - Активность люминесцентной системы из гриба *A. borealis* при последовательных добавках НАДФН и субстрата. Представлены данные, полученные при использовании свежевыделенной системы, после ее хранения в замороженном виде при -70°С, после лиофилизации системы, хранения сухого препарата и последующего его растворения

Совокупность приведенных выше данных свидетельствует, что уровень световой эмиссии полученных люминесцентных систем, выделенных из мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* и обеспечивающих свечение *in vitro*, может быть существенно (на порядки) увеличен за счет дополнительной добавки необходимых для люминесцентной реакции компонентов – НАД(Ф)Н, пероксида водорода и субстрата. При этом интенсивность излучения систем может быть столь велика, что видна в темноте невооруженным глазом (рисунок 10).

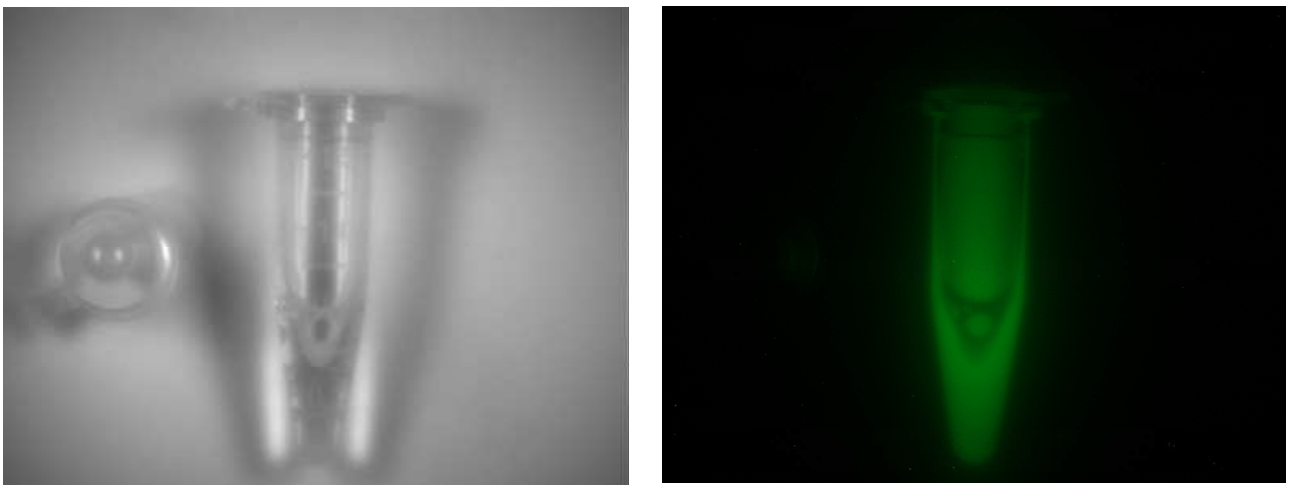

Рисунок 10 - Внешний вид (слева) и люминесценция (справа) экстракта, содержащего светоизлучающую систему из гриба *N. nambi*, активированную добавками НАДФН и H_2O_2. Изображения получены с помощью Universal Hood II system (Bio-Rad, США)

3.3 Стабильность люминесцентных систем из грибов *N. nambi* и *A. borealis*

Было установлено, что люминесцентная система из гриба *A. borealis* обладает достаточно высокой стабильностью. Так, было показано (рисунок 9), что после замораживания экстрактов при -70°С и последующего оттаивания при комнатной температуре их люминесцентная активность практически полностью сохраняется по сравнению с уровнем свечения свежевыделенных экстрактов. Аналогичные результаты были получены после лиофилизации экстрактов и последующего разведения сухих препаратов деионизованной водой (рисунок 9). Длительное хранение экстрактов при указанных выше условиях (замораживание при -70°С и лиофилизация) также не приводит к существенному изменению их люминесцентной активности. По крайней мере, этого не наблюдается после трех месяцев хранения образцов. В то же время, обработка супернатантов при 100°С в течение 1 минуты приводит к полной инактивации систем и невозможности восстановления их люминесцентной

активности добавками НАД(Ф)Н и субстрата. Эти данные хорошо согласуются с результатами исследований других авторов, изучавших люминесцентные системы из иных видов грибов с использованием схемы Дюбуа (см. раздел Лит. обзор), и свидетельствуют в пользу участия фермента (ферментов) в механизме свечения.

В сравнительных исследованиях стабильности люминесцентной системы из гриба *N. nambi* были получены аналогичные результаты. Было показано, что экстракты из мицелия данного гриба после замораживания и хранения в замороженном виде при -30°С в течение не менее одного года обладают люминесцентной активностью после размораживания. По нашим наблюдениям, после лиофилизации экстрактов и хранения сухих препаратов в течение около 2 лет при -30°С последующее их разведение деионизованной водой позволяет регистрировать свечение полученного раствора.

3.4 Активность люминесцентных систем *N. nambi* и *A. borealis* в зависимости от pH

В исследованиях было показано, что оптимумы pH функционирования люминесцентных систем выделенных из изучаемых видов базидиомицетов несколько различаются. Из результатов сравнительных экспериментов видно (рисунок 11), что оптимум функционирования люминесцентной системы из гриба *N. nambi* наблюдается в диапазоне, близком к нейтральным значениям pH (7.2 - 7.5), при которых регистрируется наибольший уровень свечения. В то же время, оптимум функционирования люминесцентной системы из гриба *A. borealis* несколько смещен в область слабощелочных значений и наибольший уровень световой эмиссии регистрируется при значениях pH 7.5 - 8.0. В обоих случаях при смещении pH в кислую, или щелочную сторону от оптимума наблюдается заметное снижение люминесценции экстрактов.

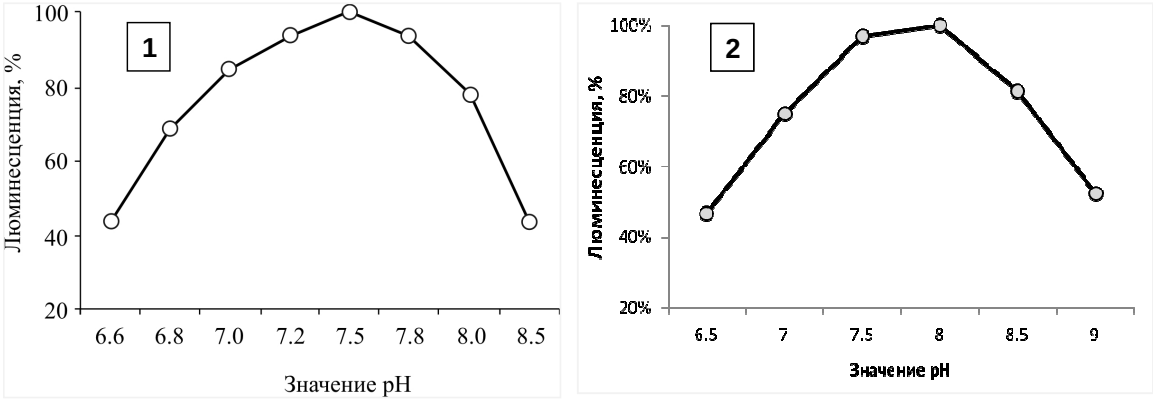

Рисунок 11 - Активность люминесцентных систем из грибов *N. nambi* (1) и *A. borealis* (2) и в зависимости от pH среды

3.5 Гипотеза о механизме люминесценции высших грибов с участием системы цитохрома P-450

В ходе экспериментов с экстрактами из мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* были получены важные результаты, свидетельствующие в пользу того, что выделенные люминесцентные системы являются сложноорганизованными комплексами. Так, после фильтрации экстрактов через мембрану с пределом исключения 10 кДа на системе Millipore (США) с помощью центрифугирования при ускорении 2000 g и 4°C люминесцентная активность регистрировалась в надмембранной фракции. При обессоливании экстрактов хроматографией на колонке (8 × 50 мм) с Bio-Gel P4 (Bio-Rad, США) выход люминесцентной активности наблюдался в свободном объеме колонки. И, наконец, обработка экстрактов сульфатом аммония при насыщении 30 - 40% и последующее центрифугирование при 16000 g в течение 10 минут при 4°C позволили получить видимый белковый осадок. После растворения осадка исходным буфером в нем была зарегистрирована люминесцентная активность. Совокупность приведенных данных позволила сделать вывод о том, что выделенные люминесцентные системы включают все необходимые для реакции излучения компоненты, которые, вероятно, образуют сложный и

достаточно устойчивый комплекс. Важным обстоятельством является то, что низкомолекулярные компоненты люминесцентной реакции (основные субстраты) тоже входят в состав комплекса и прочно в нем удерживаются, поскольку не теряются при фильтрации и обессоливании экстрактов, а также при их обработке сульфатом аммония.

Анализ условий получения экстрактов предложенным в работе способом, содержащих люминесцентные системы (ультразвуковая обработка биомассы и центрифугирование гомогенатов при 45000 g в течение 30 минут), позволяют говорить, что они содержат мембранные структуры. Хорошо известно [67,68], что разрушение биомассы ультразвуком используется для получения микросом, а центрифугирование гомогенатов при ускорениях более 15000 g позволяет удалять крупные обломки клеточных мембран, ядра и митохондрии. Положительный эффект Тиндаля, который наблюдается в экстрактах, свидетельствует об их неоднородности и присутствии нерастворимых частиц. Основываясь на этих фактах, было высказано предположение, что выделенные люминесцентные системы (или их основные компоненты) ассоциированы с мембранными структурами эндоплазматического ретикулума (целыми микросомами или их фрагментами), присутствующими в экстракте. В этом случае можно предполагать, что в реакцию излучения могут вовлекаться электронно-транспортные ферментные системы этих структур: НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома Р-450 - цитохром Р-450 и НАДН-зависмая редуктаза цитохрома b_5 - цитохром b_5 (рисунок 12).

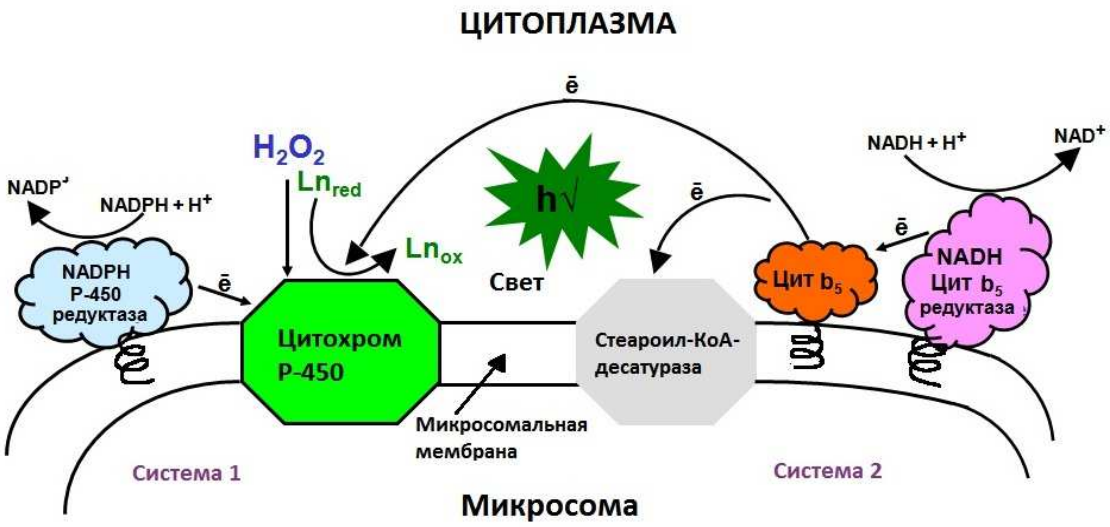

Рисунок 12 - Гипотетический механизм люминесценции высших грибов. Адаптировано из: Андрианова Л.Е., Силуянова С.Н. [69]

Исходя из высказанной выше гипотезы, можно объяснить наблюдаемые эффекты стимуляции люминесцентных систем добавками НАДФН и НАДН. Результаты многочисленных исследований [70-72] показывают взаимосвязь НАДФН- и НАДН-зависимых электронно-транспортных ферментных систем эндоплазматического ретикулума, при функционировании которых осуществляется передача электронов на цитохром Р-450, выполняющий свою оксидазную функцию.

3.6 Активность люминесцентных систем в присутствии НАДФН и НАДН

Для проверки высказанной гипотезы об участии системы цитохрома Р-450 в механизме свечения высших грибов были проведены сравнительные исследования активности люминесцентных систем в зависимости от концентрации НАДФН и НАДН. В экспериментах было показано (рисунок 13), что люминесцентные системы, выделенные из разных видов грибов (*N. nambi* и *A. borealis*), активируются добавками НАДФН и НАДН и величина

наблюдаемых эффектов зависит от концентрации восстановленных нуклеотидов, добавляемых в реакционную смесь. Тем не менее, приведенные данные показывают, что в ответ на одинаковые добавки НАДФН и НАДН больший прирост световой эмиссии наблюдается в случае НАДФН. Это позволяет говорить, что НАДФН обладает большим активирующим эффектом на люминесцентные системы по сравнению с НАДН. В пользу этого свидетельствуют также расчеты кинетических параметров V_{max} и $К_м$ (таблица 1), проведенные на основании полученных данных.

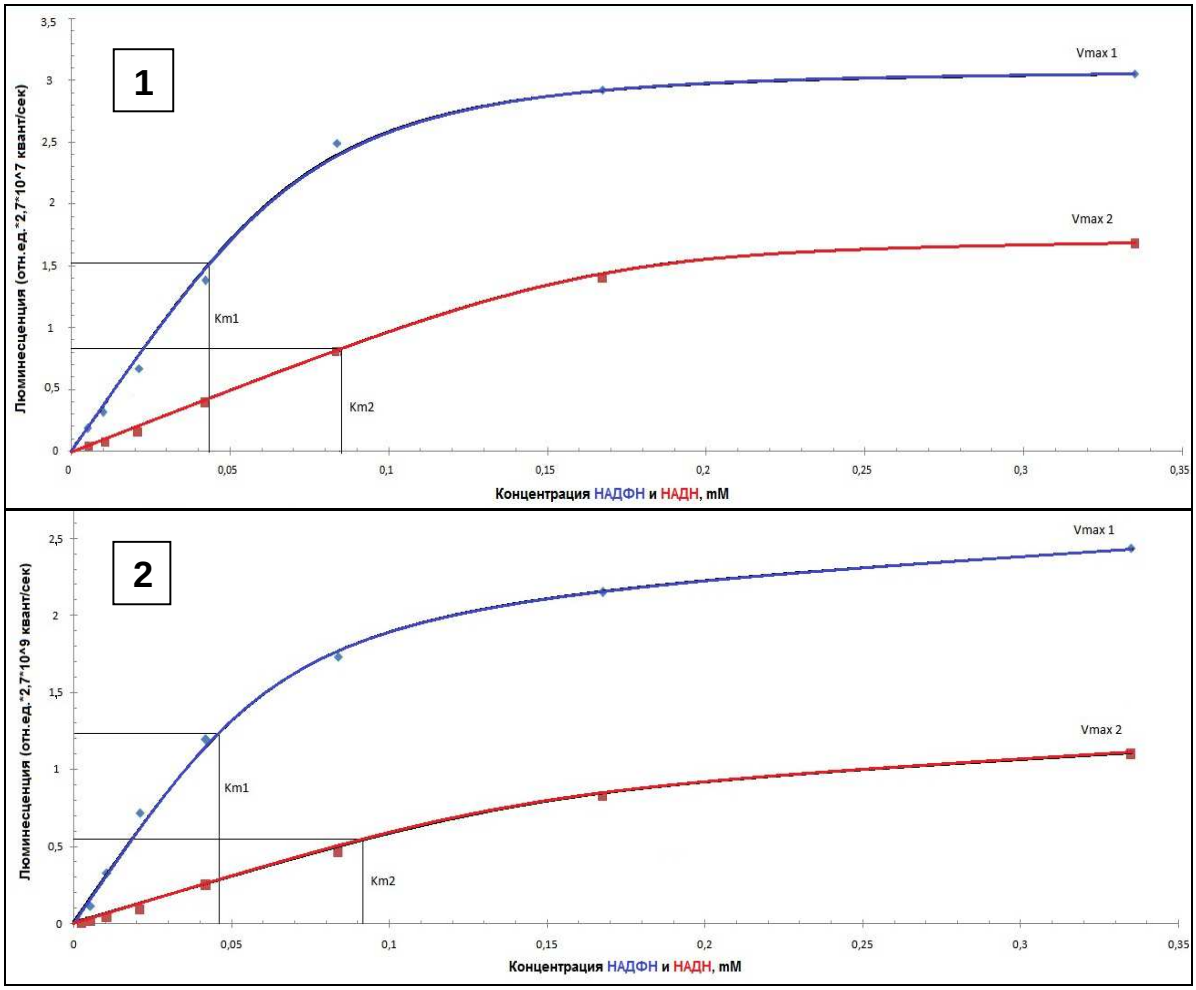

Рисунок 13 - Зависимости активности люминесцентных систем из двух видов светящихся базидиомицетов от концентрации НАДФН и НАДН. Данные представлены с приведенными константами Михаэлиса-Ментен для систем: *N. nambi* (1) и *A. borealis* (2)

Таблица 1 – Значения V_{max} и $К_м$, рассчитанные из зависимостей активности люминесцентных систем от концентрации НАДФН и НАДН

Система	КМ1 (НАДФН), mM*10⁻ ²	КМ2 (НАДН), mM*10⁻ ²	КМ2/ КМ1	Vmax 1 (НАДФН)	Vmax 2 (НАДН)	Vmax1/ Vmax2
N. nambi	4,3	8,5	1,97	30 505	16 731	1,82
A. borealis	4,6	9,2	2	2 438 413	1 098 898	2,22

Из данных таблицы 1 следует, что в обоих случаях (при исследовании люминесцентных систем *N. nambi* и *A. borealis*) константы Михаэлиса-Ментен для НАДФН имеют существенно (примерно в 1.5-2 раза) меньшие значения, по сравнению с этими показателями для НАДН. В то же время величины V_{max} люминесценции для НАДФН имеют значительно (практически в 2 раза) большие значения, чем для НАДН.

3.7 Эффект флуконазола на активность люминесцентных систем

Дополнительным фактором в пользу участия системы цитохрома Р-450 в свечении высших грибов могут являться исследования, направленные на ингибирование его функции. К ингибиторам семейства цитохромов Р-450 относятся азольные соединения - широко известные синтетические противогрибковые препараты гетероциклической природы [73,74]. Как полагают [74], азольные соединения взаимодействуют с активным центром цитохрома Р-450 и, тем самым, блокируют его взаимодействие с субстратом. Флуконазол (рисунок 14) - один из распространенных синтетических противогрибковых препаратов группы триазолов, используемых для лечения и профилактики кандидоза и некоторых других микозов.

Являясь высокоизбирательным ингибитором для цитохрома Р-450 грибов, флуконазол практически не угнетает эти ферменты в организме человека (в сравнении с итраконазолом, клотримазолом, эконазолом и кетоконазолом в

меньшей степени подавляет зависимые от цитохрома P-450 окислительные процессы в микросомах печени человека) [74].

Основываясь на изложенных выше фактах, было исследовано влияние флуконазола на люминесцентную активность выделенных систем из грибов *N. nambi* и *A. borealis*. В ходе экспериментов изучалось действие ингибитора, как на исходную люминесцентную активность, так и на уровень световой эмиссии при активации систем добавками НАДФН, пероксида водорода (в случае системы из гриба *N. nambi*) и субстрата (в случае системы из гриба *A. borealis*). Как показали исследования (рисунок 15) флуконазол оказывал ингибирующее действие не только на исходную активность люминесцентной системы *A. borealis*, но и проявлял более выраженный ингибирующий эффект при добавках в реакцию НАДФН и субстрата. Во всех указанных случаях уровень световой эмиссии в присутствии флуконазола значительно снижался.

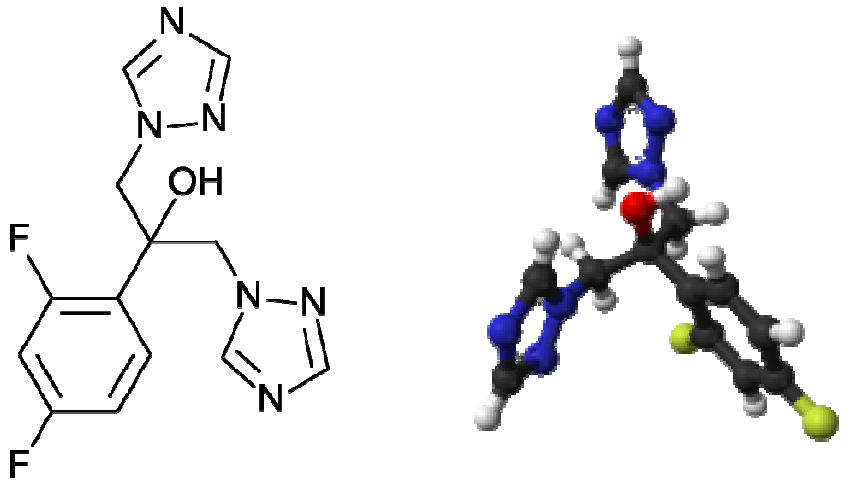

Рисунок 14 - Химическая и пространственная структуры молекулы флуконазола [2-(2,4-дифторфенил)-1,3-бис(1H-1,2,4-триазол-1-ил)-2-пропанол]

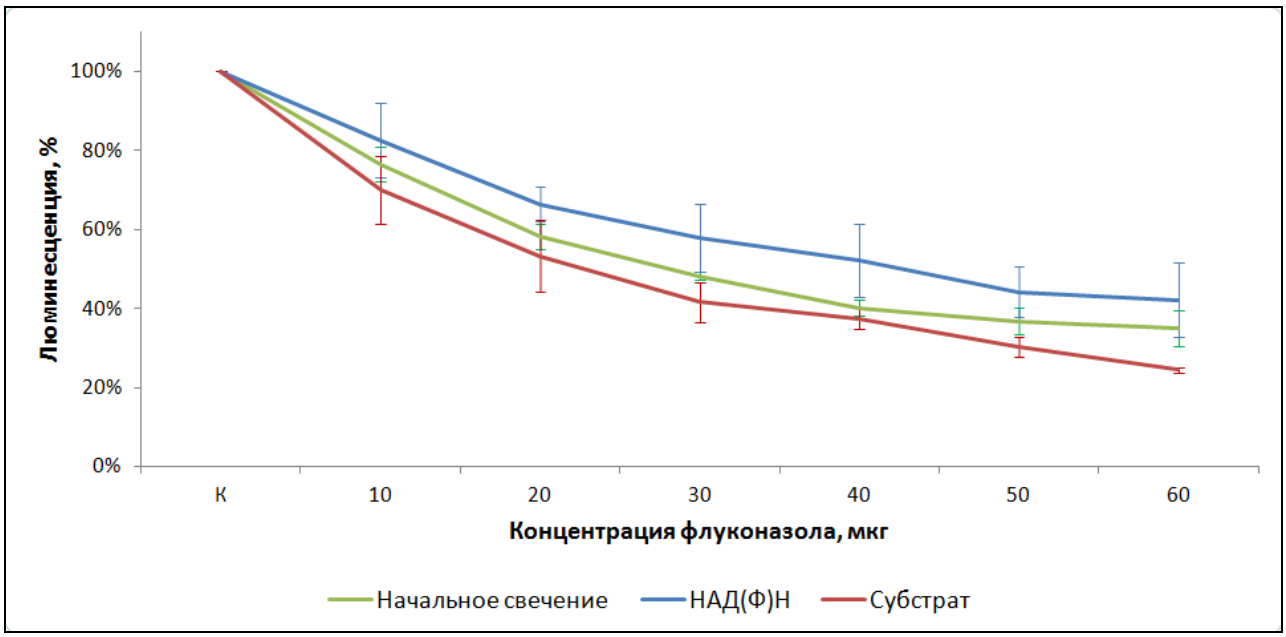

Рисунок 15 - Активность люминесцентной системы из гриба *A. borealis* без (контроль – К) и в присутствии флуконазола: собственное свечение системы (зеленая кривая), свечение системы, активированной последовательными добавками НАД(Ф)Н (синяя кривая) и субстрата (красная кривая). Показания в рядах нормированы на величины люминесцентной активности в контрольных пробах

Следует сказать, что аналогичный ингибирующий эффект флуконазола наблюдался и при исследованиях люминесцентной системы из гриба *N. nambi*. Было показано, что добавки флуконазола к люминесцентной системе в количествах 2.5 и 5 мкг (финальное содержание вещества в измеряемой пробе) вызывало ингибирование свечения на 40-50 и 60-75%, соответственно. При этом наблюдалось ингибирование не только собственного свечения системы, но и ингибирование световой эмиссии при последующих, последовательных добавках НАДФН и пероксида водорода.

3.8 Выделение активаторов люминесценции из мицелия *N. nambi* и *A. borealis*

3.8.1 Активатор светоизлучения из гриба *N. nambi* – намбин и его некоторые физико-химические свойства

В ходе экспериментов из биомассы глобулярного мицелия гриба *N. nambi* были получены экстракты, в которых был обнаружен неизвестный компонент, который стимулировал свечение глобул мицелия, а при добавках пероксида водорода увеличивающий этот эффект на порядки (рисунок 16). Обнаруженный компонент получил название намбин.

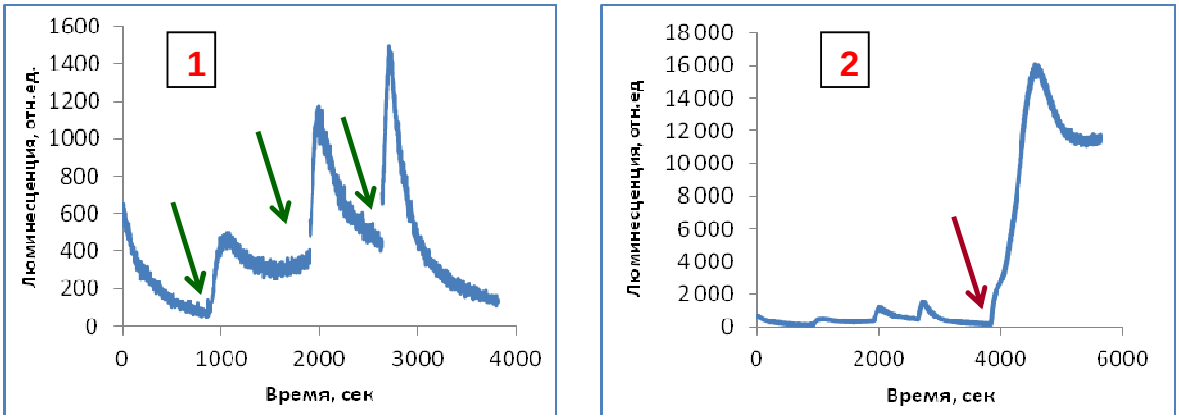

Рисунок 16 - Стимуляция свечения мицелия *N. nambi* экстрактом, содержащим активатор люминесценции:

1 – последовательные добавки экстракта (зеленые стрелки);

2 – добавка пероксида водорода (коричневая стрелка) на фоне предварительных последовательных добавок экстракта

В исследованиях физико-химических свойств обнаруженного в экстрактах неизвестного активатора люминесценции было установлено, что активатор выявляется в подмембранной фракции при ультрафильтрации экстрактов через мембрану с пределом исключения 10 кДа. Стимулирующий

эффект активатора сохраняется после кипячения экстрактов при 100°С в течение 1 - 5 минут и после концентрирования экстрактов при температурах 45°С и 60°С в течение 2 и 1.5 часов, соответственно. Эти данные свидетельствую в пользу того, что активирующий люминесценцию компонент является низкомолекулярным, термоустойчивым соединением.

При спектральных исследования экстракта, содержащего активатор, было показано наличие двух основных пиков в коротковолновой области при 220 нм и 260 нм (рисунок 17). Как видно из представленных данных спектрального анализа, обработка экстрактов частицами МНА для связывания и удаления возможных микропримесей соединений пептидной природы не влияла на характер спектра, хотя и наблюдалось некоторое понижение в максимумах пиков поглощения: в меньшей степени при 220 нм, в большей - при 260 нм.

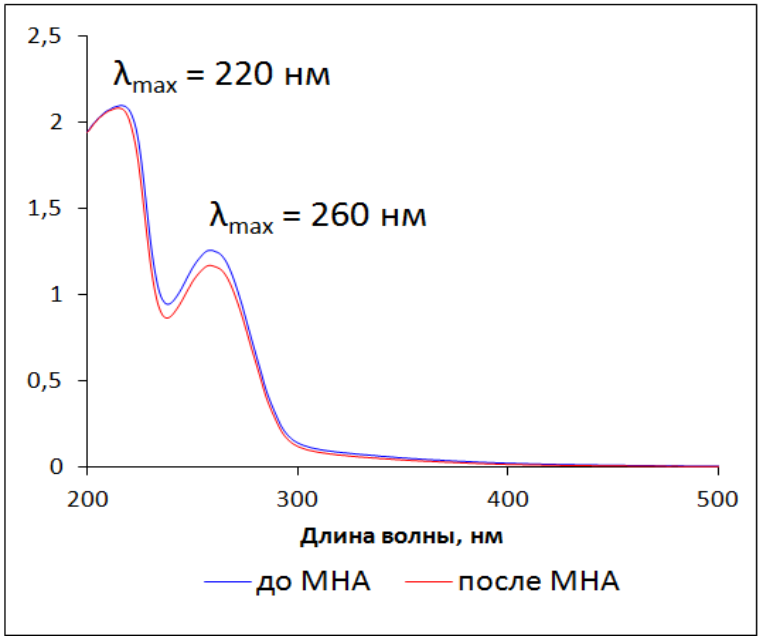

Рисунок 17 - Спектры поглощения экстракта, содержащего активатор люминесценции мицелия *N. nambi* до и после его обработки частицами МНА

Было установлено, что экстракт из гриба *N. nambi*, содержащий активатор люминесценции, обладает флуоресценцией в видимой области спектра в диапазоне длин волн 500 – 650 нм с максимумом при 520 – 540 нм (рисунок 18),

что согласуется с данными спектра люминесценции мицелия *N. nambi in vivo* [21]. Как видно из представленных данных, общий вид спектра и положение его максимума не меняются после обработки концентрированного экстракта частицами МНА и разведения деионизованной водой. При разведении водой наблюдается только снижение амплитуды максимума. В целом, полученные данные позволяют сделать предположение, что в экстракте может содержаться один из компонентов люминесцентной системы гриба *N. nambi* (возможно, эмиттер реакции излучения). Выделение намбина в чистом виде и установление его структуры и физико-химических свойств будет являться одной из приоритетных задач дальнейших исследований.

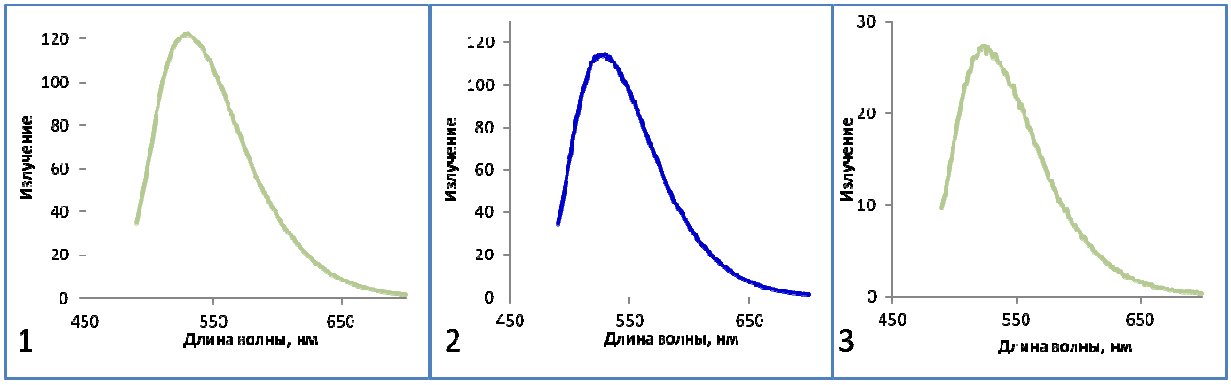

Рисунок 18 - Спектры флуоресценции экстракта из гриба *N. nambi*, содержащего активатор люминесценции: 1 - после концентрирования, 2 - после обработки частицами МНА, 3 - после разведения концентрированного экстракта деионизованной водой

3.8.2 Активатор люминесценции из гриба *A. borealis* и его некоторые свойства

В сравнительных исследованиях из биомассы глобулярного мицелия гриба *A. borealis* также были получены экстракты, добавки которых к люминесцентной системе из этого вида гриба, активированной НАД(Ф)Н, значительно повышали уровень ее световой эмиссии. Исходя из этого, было

высказано предположение, что экстракты содержат активатор люминесцентной системы гриба *A. borealis*.

В ходе изучения свойств обнаруженного в экстрактах активатора люминесценции было установлено, что он является низкомолекулярным соединением, поскольку при ультрафильтрации экстрактов через мембрану с пределом исключения 10 кДа выявляется в подмембранной фракции. Обнаруженный активатор является термостабильным соединением, так как сохраняет стимулирующий свечение эффект (рисунок 19) после кипячения экстрактов при 100°С в течение 1 - 5 минут. Планируется, что дальнейшие исследования будет направлены на получение неизвестного активатора в чистом виде для установления его структуры и физико-химических свойств.

Рисунок 19 - Многократная стимуляция световой эмиссии люминесцентной системы из мицелия *A. borealis*, активированной НАД(Ф)Н, последовательными добавками экстракта (показано стрелками), содержащего термостабильный активатор свечения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате сравнительных исследований люминесценции двух видов светящихся высших грибов (*Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis*) в работе были получены результаты принципиального характера, которые дополняют и развивают преставления о молекулярной организации люминесцентной системы грибов и механизме их свечения. К наиболее важным из них следует отнести: выделение из изучаемых видов грибов люминесцентных систем, функционально активных *in vitro*; получение экспериментальных фактов в пользу того, что данные системы представляют собой устойчивые комплексы, включающие все (белковые и небелковые) компоненты, обеспечивающие свечение. Это позволило высказать гипотезу о возможном участии системы цитохрома Р-450 в излучении высших грибов. Не менее важным является обнаружение в экстрактах изучаемых грибов низкомолекулярных компонентов, активирующих люминесцентные системы. В целом, совокупность полученных экспериментальных данных открывает перспективы для дальнейшего изучения структуры и свойств отдельных компонентов излучающих систем и активаторов люминесценции.

Результаты проведенных при выполнении магистерской диссертации исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Оптимизированы условия и способы стационарного и глубинного культивирования светящихся высших грибов *Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis*, позволяющие в лабораторных условиях осуществлять наработку биомассы пленочного и глобулярного мицелия, обладающей продолжительным и устойчивым свечением.

2. Из двух видов светящихся высших грибов (*N. nambi* и *A. borealis*) впервые получены экстракты, содержащие люминесцентные системы, проявляющие функциональную активность *in vitro*, что обеспечивает продолжительное свечение экстрактов. Установлено, что выделенные системы

представляют собой устойчивые комплексы, включающие необходимые белковые и небелковые компоненты, обеспечивающие световую эмиссию.

3. Установлено, что выделенные люминесцентные системы проявляют функциональную активность после длительного (до года и более) хранения в замороженном и лиофильно высушенном виде. Выявлено, что оптимум активности систем из грибов *N. nambi* и *A. borealis* наблюдается в диапазонах значений pH 7.2 - 7.5 и 7.5 - 8.0, соответственно Показано, что обе системы активируются НАДФН и НАДН, причем больший уровень световой эмиссии наблюдается при добавлении НАДФН. Установлено ингибирование активности систем флуконазолом.

4. На основании совокупности полученных данных высказана гипотеза об участии системы цитохрома P450 в механизме свечения высших грибов.

5. Из мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* выделены экстракты, содержащие активаторы свечения. Уставлено, что оба активатора являются низкомолекулярными, термоустойчивыми соединениями, стимулирующими излучение. Показано, что содержащий активатор экстракт из гриба *N. nambi* имеет в спектре поглощения два пика в коротковолновой области - 220 нм и 260 нм. Установлено, что экстракт из данного вида гриба обладает флуоресценцией в видимой области с максимумом световой эмиссии при 520 - 540 нм.

Апробация работы:

Материалы исследований автора, включая результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, докладывались: на Международном научном семинаре «Биолюминесцентные биотехнологии» (Красноярск, 2012); на 3rd Annual World Congress of Microbes-2013, Molecular & Cell Biology of Fungi (Wuhan, China, 2013); на V Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015).

По результатам магистерской диссертации опубликованы работы:

1. Medvedeva S.E., **Artemenko K.S.**, Krivosheenko A.A., Rusinova A.G., Rodicheva E.K., Puzyr A.P., Bondar V.S. Growth and light emission of luminous basidiomycetes cultivated on solid media and in submerged culture // Mycosphere, 2014, Vol.5, No.4, pp.565-577. (**Doi:** 10.5943/mycosphere/5/4/9).

2. Бондарь В.С., Пузырь А.П., Медведева С.Е., **Артеменко К.С.**, Тяглик А.Б., Родичева Э.К., Гительзон И.И. О возможном участии системы цитохрома P450 в свечении высших грибов // Материалы докладов V Съезда биофизиков России. Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета, 2015, т.2, с.135.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Harvey, E.N. Bioluminescence / E.N. Harvey // Academic Press, New York, - 1952.
2. Harvey E.N. A History of Luminescence from Ancient Times to 1900. J.H. Furst Company, Baltimore, EUA. 1957.
3. Ячевский, А.А. Основы микологии / А.А Ячевский // Москва-Ленинград: Сельхозгиз. - 1933. - С. 1036.
4. Shimomura, O. Bioluminescence : chemical principles and methods / O. Shimomura, - Singapore: World Scientific Publishing, 2006. - P. 266-300.
5. Wassink, E.C. Luminescence in fungi / E.C. Wassink. - In: Herring P.J. (ed.) Bioluminescence in action. London: Academic Press. - 1978. - P.171-197.
6. Herring, P.J. Luminous fungi / P.J. Herring // Mycologist. - 1994. - V.8. - P.181-183.
7. Desjardin, D.E. Fungi bioluminescence revisited / D.E. Desjardin, A.G. Oliveira, C.V. Stevani // Photochem. Photobiol. Sci. - 2008. - V.7. - P.170-182.
8. Выдрякова, Г.А. Светящиеся грибы и перспективы их использования / Г.А. Выдрякова, Н.В. Псурцева, Н.В. Белова, Н.В. Пашенова, И.И. Гительзон // Микология и фитопатология. - 2009. - Т.43, №5. - С. 369-376.
9. Desjardin, D.E. Luminescent *Mycena*: new and noteworthy species / D.E. Desjardin, B.A. Perry, D.J. Lodge, C.V. Stevani, E. Nagasawa // Mycologia. - 2010. - V.102. - P.459-477.
10. Endo, M. Fluorescent constituents and cultivation of *Lampteromyces japonicus* / M. Endo, M. Kajiwara, K. Nakanishi // Chem. Commun. - 1970. - P.309-310.
11. Bermudes, D. Effects of culture conditions on mycelial growth and luminescence in *Panellus stipticus* / D. Bermudes, V.L. Gerlach, K.H. Nealson // Mycologia. - 1990. - V.82. - P.295-305.

12. Weitz, H.J. The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi / H.J. Weitz, A.L. Ballard, C.D. Campbell, K. Killham // FEMS Microbiol. Lett. - 2001. - V.202. - P.165-170.

13. Mendes, L.F. Influence of culture conditions on mycelial growth and bioluminescence of *Gerronema viridilucens* / L.F. Mendes, E.L. Bastos, D.E. Desjardin, C.V. Stevani // FEMS Microbiol. Lett. - 2008. - V.282. - P.132-139.

14. Дао, Т.В. Культивирование светящегося гриба *Omphalotus aff. illudent* (*Neonothopanus nambi*) / Т.В. Дао // Биотехнология. - 2009. - N6. - С.74-78.

15. Airth, R.L. Light emission from extracts of luminous fungi / R.L. Airth, W.D. McElroy // J. Bacteriol. - 1959. - V.77. - P.249-250.

16. Airth, R.L. Some aspects of fungal bioluminescence / R.L. Airth, G.E. Foerster // Cell. Comp. Physiol. - 1960. - V.56. - P.173-182

17. Камзолкина, О.В. К вопросу о природе люциферазы из биолюминесцентного гриба *Armillariella mellea* / О.В. Камзолкина, В.С. Данилов, Н.С. Егоров // Доклады Академии наук СССР. - 1983. - Т.271. - С.750-752.

18. Oliveira, A.G., The enzymatic nature of fungal bioluminescence / A.G. Oliveira, C.V. Stevani // Photochem. Photobiol. Sci. - 2009. - V.8. - P.1416-1421.

19. Oliveira, A.G. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages / A.G. Oliveira, D.E. Desjardin, B.A. Perry, C.V. Stevani // Photochem. Photobiol. Sci. - 2012. - V.11. - P.848-852.

20. Shimomura, O. Chemiluminescence of panal (a sesquiterpene) isolated from the luminous fungus *Panellus stipticus* / O. Shimomura // Photochem. Photobiol. - 1989. - V.49. - P.355-360.

21. Бондарь, В.С. О люминесцентной системе светящегося гриба *Neonothopanus nambi* / В.С. Бондарь, А.П. Пузырь, К.В. Пуртов, С.Е. Медведева, Э.К. Родичева, И.И. Гительзон // ДАН. - 2011. - Т.438. - С.705-707.

22. Гительзон, И.И. Хемилюминесцентное свечение тканей плодовых тел высших грибов / И.И. Гительзон, В.С. Бондарь, С.Е. Медведева, Э.К. Родичева, Г.А. Выдрякова // ДАН. - 2012. - Т.443. - С.624-627.

23. Bondar, V.S. A study of *Neonothopanus nambi* luminescent system / V.S. Bondar, A.P. Puzyr, K.V. Purtov, S.E. Medvedeva, E.K. Rodicheva, G.S. Kalacheva, J.I. Gitelson // Luminescence. - 2012. - V.27. - P.101-102.

24. Gitelson, J. I. Chemiluminescence of higher fungi / J.I. Gitelson, V.S. Bondar, S.E. Medvedeva, E.K. Rodicheva, G. A. Vydryakova // Luminescence. - 2012. - V.27. - P.118.

25. Kawamura, S. Studies on the luminous fungi *Pleurotus japonicus sp. nov.* / S. Kawamura // J. Coll. Sci. Tokyo. - 1915. - V.35. - P.1-29.

26. Shimomura, O. The role of superoxide dismutase in regulating the light emission of luminescent fungi / O. Shimomura // Exp. Botany. - 1992. - V.43. - P.1519-1525.

27. Horswell, J. Impact of heavy metal amended sewage sludge on forest soils as assessed by bacterial and fungal biosensors / J. Horswell, H.J. Weitz, H.J. Percival, T.W. Speir // Biol. Fertil. Soils. - 2005. - V.42. - P.569-576.

28. Brock, M. Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a new tool for drug efficiency testing and in vivo monitoring of invasive aspergillosis / M. Brock, G. Jouvion, S. Droin-Bergère, O. Dussurget, M.A. Nicola, O. Ibrahim-Granet // Appl. Environ. Microbiol. - 2008. - V.74. - P.7023-7035.

29. Van der Burg, A. Spektrale onderzoekingen over chemo- en bioluminescentie / Van der Burg A. // Thesis, University of Utrecht, Rijks-Universiteit te Utrecht.- 1943.

30. Lavelle, F. Luminescence des champignons lumineux / Lavelle M.M.F., Durosay P., Michelson A.M. // C. R. Acad. Sci. Paris. 275(Serie D): 1227-1230. – 1972.

31. O'Kane, D. J. Spectral analysis of bioluminescence of Panellus stypticus / O'Kane D.J., Lingle W.L., Porter D., Wampler J.E. // Mycologia. – 1990- V 82. – P. 607-616.

32. Vydryakova, G.A. Intergenomic and intragenomic ITS sequence heterogeneity in Neonothopanus nambi (Agaricales) from Vietnam / Vydryakova G.A., Van Dao T., Shoukouhi P., Psurtseva N.V., Bissett J. // Mycology. – 2011. – V.3. – P.89-99.

33. Medvedeva, S. E. Growth and light emission of luminous basidiomycetes cultivated on solid media and in submerged culture / Medvedeva S.E., Artemenko K.S., Krivosheenko A.A., Rusinova A.G., Rodicheva E.K., Puzyr A.P., Bondar V.S. //Mycosphere. – 2014. – V. 5(4). – P. 565-577.

34. Mihail, J.D. Bioluminescense ia wildespread within the Kingdom of fung / J.D. Mihail, J.N. Bruhn // Opera Mycologica. - 2007. - V.1. - P.28-33.

35. Bermudes, D. Low-level bioluminescence detected in *Mycena haematopus Basidiocarps* / D. Bermudes., R.H. Petersen, K.H. Nealson // Mycologia. - 1992. - V.84. - P.799-802.

36. Lingle, W.L. Effects of veratryl alcohol on growth and bioluminescence of *Panellus stipticus* / W.L. Lingle // Mycol. Soc. Am. Newslett. - 1989. - V.40. - P.36.

37. Lingle, W.L. Bioluminescence and ligninolysis during secondary metabolism in the fungus *Panellus* / W.L. Lingle // J. Biolum. Chemilum. - 1993. - V.8. - P.100.

38. Morin, J.G. Coelenterate bioluminescence / J.G. Morin // In: Coelenterate Biology: Reviews and Perspectives. // Muscatine L. and Lanhoff H.M. (eds.). New York: Academic Press. - 1974. - P.397-438.

39. Blinks, J.R. Photoproteins as biological calcium indicators / J.R. Blinks, F.G. Prendergast, D.G. Allen // Pharmacol. Rev. - 1976. - V.28. - P.1-93.

40. Blinks, J.R. Measurements of Ca^{2+} concentrations in living cells / J.R. Blinks, W.G. Wier, P. Hess, F.G. Prendergast // Prog. Biophys. Molec. Biol. - 1982. - V.40. - P.1-114.

41. Угарова, Н.Н. Биолюминесцентные методы анализа в микробиологии / Н.Н. Угарова, Л.Ю. Бровко, И.А. Трдатян, Е.И. Райнина // Прикладная биохимия микробиология. - 1987. - Т.23. - С. 14-24.

42. Гительзон, И.И. Светящиеся бактерии (Кондратьева Е.Н. ред.) / И.И. Гительзон, Э.К. Родичева, С.Е. Медведева и др. // Наука. Новосибирск. - 1984. - С. 277с.

43. Кратасюк, В.А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе / В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон // Успехи микробиологии. - 1987. -Т.21. - С.3-30.

44. Угарова, Н.Н. Биолюминесценция и биолюминесцентный анализ / Н.Н. Угарова, Л.Ю. Бровко, Г.Д. Кутузова // Биохимия. - 1993. - Т.53. - С.1351-1364.

45. Illarionov, B.A. Recombinant obelin: cloning and expression of cDNA, purification and characterization as a calcium indicator / B.A. Illarionov, Frank L.A., V.A. Illarionova V.S. Bondar., E.S. Vysotski., J.R. Blinks // Methods in Enzymology. - 2000. - V.305. - P.223-249.

46. Weitz, H. J., Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing / Weitz H.J. Colin D., Campbell C.D., Killham K. // Environmental microbiology. – 2002. – V. 4. – №. 7. – P. 422-429.

47. Mendes, L. F., Evaluation of metal toxicity by a modified method based on the fungus Gerronema viridilucens bioluminescence in agar medium / Mendes L.F., Stevani C.V. // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2010. – V. 29. – №. 2. – P. 320-326.

48. Hollis, R. P. Construction and application of a luminescent eukaryotic biosensor / Hollis R. P. // PhD Thesis, University of Aberdeen. - 1999.

49. Airth, R.L. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence / R.L. Airth, G.E. Foerster // Arch. Biochem. Biophys. - 1962. - V.97. - P.567-573

50. Airth, R.L. Enzymes associated with bioluminescence of *Panus stipticus luminescens* and *Panus stipticus nonluminescens* / R.L. Airth, G.E. Foerster // J. Bacteriol. - 1964. - V.88. - P.1372-1379

51. Камзолкина, О.В., Получение системы люциферин – люцифераза из гриба *Armillariella mellea* / О.В. Камзолкина, З.Э. Беккер, Н.С. Егоров // Биологические науки. - 1984. - № 1. - С.73-77.

52. Dubois, R. Note sur la physiologic des pyrophores / R. Dubois. // C. R. Séanc. Soc. Biol. Fr. - 1885. - V.37. – P. 559-562

53. Dubois, R. Note sur la fonction photog´enique chez la Pholas dactylus / R. Dubois // C. R. Soc. Biol. - 1887. - V.39. - P. 564-566

54. Бондарь, В. С. О механизме свечения гриба *Neonothopanus nambi* / В. С. Бондарь, Э. К. Родичева, С. Е. Медведева, Н. А. Тюлькова, А. Б. Тяглик, Б. А. Шпак, И. И. Гительзон // Доклады академии наук. - 2013. - Т. 449. № 2. - С. 223–227.

55. Puzyr, A.P. Source of light emission in a luminous mycelium of the fungus Panellus stipticus / A.P. Puzyr, A.E Burov, V.S. Bondar / Journal of Research in Biology. – 2013. - № 3. - С. 900–905.

56. Kuwabara, S. Purification and properties of the active substance of fungal luminescence / S. Kuwabara, E.C. Wassink // In: Bioluminescence in Progress. Johnson F.H. and Haneda Y. (eds) Princeton, USA: Princeton University Press. - 1966. - P.233-245.

57. Isobe, M. *Lampteromyces* bioluminescence. I. Identification of riboflavin as the light emitter in mushroom *Lampteromyces japonicus* / M. Isobe, D. Uyakul, T. Goto / J. Biolum. Chemilum. - 1987. - V.1. - P.181-188.

58. Isobe, M. *Lampteromyces* bioluminescence. 2. Lampteroflavin, a light emitter in the luminous mushroom *Lampteromyces japonicus* / M. Isobe, D. Uyakul, T. Goto // Tetrahedron Lett. - 1988. - V.44. - P.1169-1172.

59. O'Kane, D.J. Spectral studies of fungal bioluminescence. In: Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects (Campbell A.K., et al. (eds.)) / D.J. O'Kane, B. Fuhrer, W.I. Lingle // Chichester: John Wiley & Sons. - 1994. - P.552-555.

60. Nakamura, H. Panal: a possible precursor of fungal luciferin / H. Nakamura, Y. Kishi, O. Shimomura // Tetrahedron. - 1988. - V.44. - P.1597-1602.

61. Shimomura, O. Superoxlde-triggered chemiluminescence of the extract of luminous mushroom *Panellus stipticus* after treatment with methylamine / O. Shimomura // J. Exp. Bot. - 1991. - V.42. - P.555-560.

62. Shimomura, O. The role of superoxide anion in bioluminescence / O. Shimomura // In: Frontiers of Photobiology (Shima A. et al. (eds.)). Amsterdam: Elsevier Science Publishers. - 1993. - P. 249-254.

63. Mori, K. Bioluminescence characteristics of the fruiting body of *Mycena chlorophos* / Mori K., Kojima S., Maki S., Hirano T., Niwa H. // Luminescence. – 2011. – V. 26:604-10. – №. 6. – P. 604-610.

64. Hastings, J.W. Total quantum flux of isotropic sources / J.W. Hastings, G. Weber // J Opt Soc Am. – 1963. - V.53. – P. 1410-1415.

65. Bondar, V.S. Applications of nanodiamonds for separation and purification of proteins / Bondar, V.S., Pozdnyakova I.O., Puzyr A.P. // Physics of the Solid State. – 2004. –V. 46:758-760. – №. 4. – P. 758-760.

66. Могильная, О.А Общая пероксидазная и каталазная активности светящихся базидиомицетов *Armillaria borealis* и *Neonothopanus nambi* в сравнении с уровнем световой эмиссии / Могильная О.А., Ронжин Н.О., Медведева С.Е., Бондарь В.С. // Прикладная биохимия и микробиология . – 2015. – Т. 51. – №. 4. – С. 395-401.

67. Maddy, A.H. Biochemical analysis of membranes / A.H. Maddy (Ed.) // London: Chapman and Hall Ltd. - 1976. – P. 460.

68. Северин, С.Е. Митохондрии: биохимия и ультраструктура / С.Е. Северин, (редактор) // М.: Наука - 1973. – С. 174.

69. Андрианова, Л.Е. Обезвреживание токсических веществ в организме / Л.Е. Андрианова, С.Н. Силуянова // Биохимия: Учеб. для вузов, Под ред. Е.С. Северина.. М: ГЭОТАР-МЕДИА. - 2003. - С.616-628.

70. Yamada, M. Dynamic interactions of rabbit liver cytochromes P450IA2 and P450IIB4 with cytochrome b5 and NADPH-cytochrome P450 reductase in proteoliposomes / M. Yamada, Y. Ohta, G.I. Bachmanova, Y. Nishimoto, A.I. Archakov, S. Kawato // Biochemistry. - 1995. - V.34. – P. 10113-10119.

71. Schenkman, J.B. Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b5 / J.B. Schenkman, I. Jansson // Drug Metab. Rev. - 1999. V.31. – P. 351-364.

72. Lamb, D. C. Molecular diversity of sterol 14α-demethylase substrates in plants, fungi and humans / Lamb D.C., Kelly D.E., Kelly S.L. // FEBS letters. – 1998. – V. 425. – №. 2. – P. 263-265.

73. Jackson, C. J. Conservation and cloning of CYP51: a sterol 14α-demethylase from Mycobacterium smegmatis / Jackson C.J, Lamb D.C., Marczylo T.H., Parker J., Manning N.L., Kelly D.E., Kelly S.L. // Biochemical and biophysical research communications. – 2003. – V. 301. – №. 2. – P. 558-563.

74. Скворцов, В.С. Азольные ингибиторы цитохрома P450 51A / В.С. Скворцов, И.И. Карузина, А.С. Иванов, А.И. Арчаков // (MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS): Моделирование комплексов и предсказание параметров связывания // http://www.ivtn.ru