

✓
АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

На правах рукописи

А-22716.

С.П. ДЯХ

МЕЛАНОПИГМЕНТ АНТАРКТИЧЕСКИХ ЧЁРНЫХ ДРОЖЕЙ
NADSONIELLA NIGRA VAR. NESUBULICA
И ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ

(микробиология - 096)

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата Биологических наук

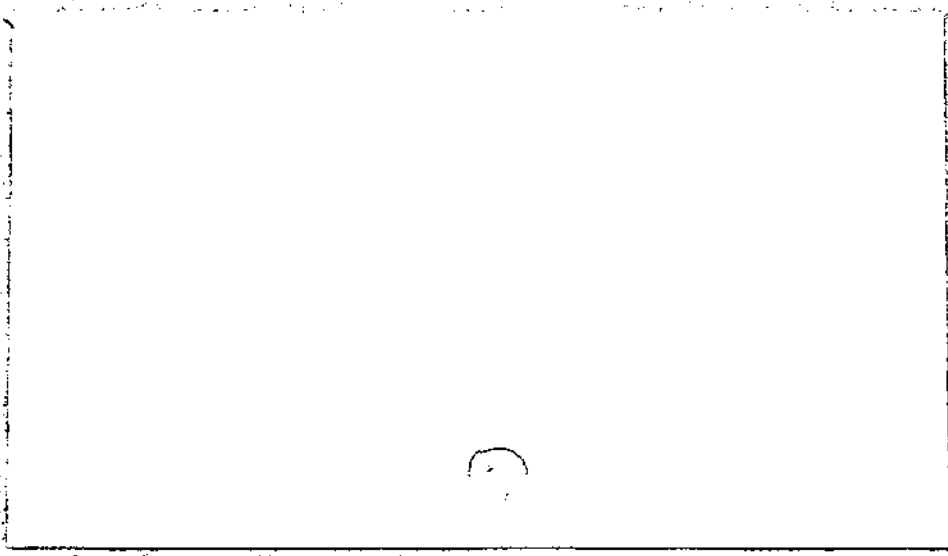
Научный руководитель:

доктор Биологических наук
Е.Л.РУБАН

Москва - 1970

Provenca.

1



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

На правах рукописи

С.П. ЛЯХ

МЕЛАНОПИГМЕНТ АНТАРКТИЧЕСКИХ ЧЁРНЫХ ДРОЖДЕЙ:
NADSONIELLA NIGRA VAR. NESUELICA
И ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ

(микробиология - 096)

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Е.Л.РУБАН

Центральная Научная Библиотека
Московской орд. Ленина Сельхоз.
Академии им. К. А. Тимирязева
№ А-22716

Москва - 1970

Работа выполнена в Институте микробиологии АН СССР

Научный руководитель : доктор Биологических наук

Е.Л.Рубан

Официальные оппоненты: чл.-кор. АН СССР Н.Н.Мейсель

д-р Биол.наук П.А.Агапов

Автореферат разослан 9 февраля 1976 г.

Защита диссертации состоится 11 с.в. 1976 г.

на заседании Ученого совета Института микробиологии АН СССР,
г.Москва В-133, Профсоюзная, 7 корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
микробиологии АН СССР.

Ученый секретарь Института
микробиологии АН СССР

канд.биол.наук

/Л.К.Осницкая/

ВВЕДЕНИЕ

Меланины — чёрные и коричневые пигменты — занимают совершенно особое положение среди природных соединений по способу синтеза, структуре, свойствам и месту в эволюции предбиологических и биологических структур. Химическое строение природных меланинов до сих пор окончательно не установлено вследствие их чрезвычайно сложной полимерной структуры и большого разнообразия.

Меланиногенез — явление общебиологическое. Меланины часто встречаются в живых организмах всех эволюционных ступеней, но современные представления об этих пигментах основываются почти исключительно на данных, полученных в экспериментах с меланинами животных, а также с модельными меланиногенными системами и с синтетическими пигментами. Возникшая в последние годы концепция о том, что тип меланинопигмента организма определяется его филогенетическим уровнем /"индолные" меланины характерны для животных, "пирокатехиновые" присущи растениям /, была сформулирована на основании исследования соединений животного и растительного происхождения. Пигменты микроорганизмов в эту систему не вошли, хотя именно микробный меланиногенез должен вызывать особый интерес с эволюционной точки зрения, так как в нем, по-видимому, представлены все основные типы механизмов образования пигментов. Однако эта группа пигментов микроорганизмов оказывается наименее изученной. Полученные данные разрозненны и часто противоречивы.

Такое положение можно объяснить, по-видимому, только тем, что до сих пор эти вещества не находили какого-либо практического применения, а у синтезирующих их микроорганизмов до последнего времени не были обнаружены повышенная устойчивость к различным видам электромагнитного излучения (УФ свету, рентгеновской и гамма-радиации), а также противоопухолевая активность некоторых изолированных микробных пигментов. Установление этих фактов должно послужить стимулом к широким исследованиям этой группы веществ в направлении определения их химических и физических

свойств, состава и структуры, а также механизмов, приводящих к их появлению в микробной клетке. Возможность получения пигментов в больших количествах при культивировании специальных организмов - продуцентов позволят провести их испытание в качестве противолучевых и антираковых агентов в опытах с животными и на культурах тканей. Микробный синтез меланинов не лимитируется исходным материалом в отличие от меланинов животного происхождения или синтетических, получаемых из дорогостоящих реактивов (например, из ДОФА).

Вопрос о необходимости изучения микробных меланопигментов имеет еще одно чрезвычайно важное практическое обоснование. Образование клеточных и в особенности внеклеточных меланиновых пигментов многими микроорганизмами представляет собой первичный гумусообразовательный процесс, значение которого в природе огромно, а изучение весьма далеко от завершения. Не возможное участие меланинов микроорганизмов в образовании почвенного гумуса указывали уже Бейерик, Смелянский и Виноградский.

Обзор литературы по микробному меланиногенезу представляет собой сводку, отсутствовавшую до сих пор в мировой литературе. Вследствие большого объема (свыше 350 стр.) его содержание не может быть изложено в автореферате. Можно лишь упомянуть, что помимо обобщенных данных по меланиногенезу у различных групп микроорганизмов в нем представлены некоторые сведения общего характера о меланинах в тирозиназной активности, необходимые для понимания меланиногенеза у микробных форм жизни и дающие возможность внести некоторую ясность в этот малоизученный вопрос. Приводятся также материалы по способам выделения, определения свойств и состава, структуры и физико-химического состояния микробных меланинов в сравнении с другими природными меланопигментами и обзор данных по методам определения тирозиназной активности микроорганизмов, которые могут служить для практического применения при проведении исследований микробных меланинов в качестве ориентировочного методичес-

кого руководства.

Что же касается экспериментальной части работы, то мы предлагаем следующее ее обоснование. Поскольку вопрос о физиологических функциях чёрных микробных пигментов (меланинов) все еще остается открытым, а существующие мнения недостаточно хорошо аргументированы, чтобы считаться бесспорными, любые исследования, приведенные в этом направлении, могут внести определенный вклад в решение данной проблемы, которая теперь приобретает особую важность в связи со складывающимися представлениями о меланинах микроскопических грибов, как о выработанном эволюционно приспособлении к жизни в условиях воздействия повышенной солнечной радиации, действующей в природе как жесткий экологический фактор отбора, когда обладающий особыми свойствами пигмент, защищает содержание его структуры от УФ света и от проникающих излучений. Помимо этого функционально-экологического значения микробного пигмента, этот вопрос имеет и другой, с практической точки зрения несравненно более важный аспект, - радиобиологический. Поэтому исследования, связанные с обнаружением микроорганизмов, успешно сопротивляющихся губительному действию разного вида излучений, и выяснением механизмов защиты могут послужить частичному решению проблемы радиозащиты. Одним из таких объектов представляются нам некоторые меланинсинтезирующие формы микроорганизмов.

Но если мысль о радиозащитной роли пигмента кожи человека (особенно в том, что касается противодействия повреждению световой энергией) была высказана давно и сейчас довольно хорошо, хотя и неокончательно, аргументирована, то при переходе к фото- и радиозащитной функции микробных меланинов мы вступаем в область по преимуществу констатации двух категорий фактов: во-первых, преобладания микроорганизмов с темноокрашенными (меланизированными) структурами в местах обитания, подверженных интенсивной инсоляции или воздействию естественной радиоактивности, что было обнаружено экологами и, во-вторых, их повышенной резистентности к УФ свету и ионизирующей радиации,

что было установлено в специальных экспериментах по искусственному облучению этих организмов. Что же касается всестороннего выяснения механизма этого явления первоначально хотя бы на основании проведения аналогий с другими меланинами, у которых он изучен в большей степени, при условии выявления тех некоторых общих свойств у пигментов, которые имеют принципиальное значение с этой точки зрения, то таких работ, во всяком случае в виде комплексного подхода и решению данной проблемы, фактически нет.

Объектом настоящего исследования служил антарктический чёрный дрожжеподобный организм (штамм 365), выделенный в 1957г Е.Л.Рубан из образца примитивной почвы острова Хесуэлл ($63^{\circ}23'$ ю.ш. $95^{\circ}00'$ в.д.). Выбор объекта определился предполагаемой меланиновой природой его пигмента и специфической экологических условий места его обитания в природе. Чрезвычайно высокая летняя инсоляция (с активной ультрафиолетовой частью спектра) и естественная радиоактивность породы, подстилающей почву, в которой он был найден, позволяла предполагать существование связи между ними и угольно-чёрной пигментацией организма.

Задачами экспериментальной части работы было поставлено:

1. Описать штамм 365 и попытаться его идентифицировать.
2. Установить степень его устойчивости к действию коротковолновых электромагнитных излучений.
3. Выяснить вопрос о локализации пигмента в клетке, получить пигментные мутанты исходной формы, определить характер изменения их пигментогенеза и использовать их в сравнительных исследованиях.
4. Выделить и охарактеризовать чёрные пигменты штамма 365 и его мутантов по комплексу тестов, предложенных для идентификации меланинов и получить доказательства их антилучевой функции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение морфологических и культурально-физиологических характеристик штамма 365 при описании и идентификация организма проводили по стандартным схемам и стандартным методам.

Ультратонкие срезы клеток для электронного микроскопа - рования получали на микротоме после фиксации материала растворами $KMnO_4$ и O_2O_4 .

В качестве мутагенных факторов использовали УФ свет, рентгеновские и гамма-лучи.

Для определения радиоустойчивости облучали суспензии клеток (двухсуточные культуры) с определенной концентрацией. Гомогенность достигалась фильтрованием через ватные тампоны. Источником УФ света являлись две бактерицидные лампы БУВ-15 с резонансным монохроматическим излучением 2537 Å, суммарная интенсивность действия которых составляла 100 эрг/см² сек. Гамма - облучение проводили на установке ГУЛОС с мощностью дозы 700 р/мин. Опыты с рентгеновскими лучами осуществляли с помощью аппарата РУН - 200-20-5 при интенсивности излучения, равной 2800 р/мин. В опытах с УФ светом во избежание фотореактивации (ФР) были предприняты необходимые меры предосторожности. Критерием радиоустойчивости организма считалась его выживаемость при разных дозах облучения. Этот показатель учитывался по стандартной методике подсчета макроколоний, выросших на полноценной питательной среде после нескольких дней инкубации. Опыты ставились с пятикратным повторением каждого варианта и неоднократно; средний % выживающих клеток вычисляли при том условии, если не менее, чем в 3 повторностях наблюдалось близкое совпадение в числе колоний на чашках в каждом разведении.

При проведении экспериментов по защите клеток от УФ лучей суспензии, приготовленные путем десятикратного разведения исходной суспензии (10-15 млн клеток в 1 мл) в дистиллированной воде или в водных растворах внеклеточного пигмента мутанта I-365, представленных тремя концентрациями - 0,15, 0,015

и 0,0015 %, облучали венгерской бактерицидной лампой в течение 5, 10 и 15 сек. Расстояние от лампы до суспензии составляло 85 см. Критерием защитной активности пигмента служило изменение чувствительности *Candida utilis* к УФ облучению.

Выделение микробных пигментов для проведения анализов осуществляли следующим способом. Биомассу автоклавировали при 0,5 атм. с 0,5 н NaOH (со сменой щелочи) до полного извлечения пигмента из клеток, которые затем осаждали центрифугированием. Подкислением темнокоричневого центрифугата концентрированной HCl до pH 2 добивались выпадения пигмента в осадок в виде чёрных хлопьев. Его отделяли центрифугированием при 5 тыс. об/мин, промывали последовательно дистиллированной водой, спиртом и ацетоном, затем вновь растворяли в холодной 0,5 н NaOH и процедуру осаждения повторяли. Внеточный пигмент штамма I-365 осаждали из культуральной жидкости концентрированной HCl, а затем промывали и переосаждали так же, как и внутриклеточные пигменты. Полученные пигменты высушивали и хранили над P₂O₅. Гидролиз пигмента штамма 365 проводили в условиях автоклавирования при 1 атм с 20 %-ной HCl два раза по 1,5 часа. После центрифугирования пигмент многократно промывали водой, спиртом, ацетоном и высушивали.

Для получения растворимых в воде препаратов меланинов вещества растворяли в 0,5 н NaOH и проводили диализ в дистиллированной воде через полупроницаемую пленку для гемодиализатора до нейтральной реакции воды и содержимого гильзы. Полученный раствор высушивали при 70°.

Идентификация пигментов проводилась по описанным для других меланинов тестам. Необходимость применения целого комплекса тестов объясняется отсутствием высоко специфических методов определения меланиновой природы чёрных и коричневых природных пигментов. Для сравнительных исследований были взяты те синтетические меланины, которые в определенных отношениях являются модельными для животных (меланин из 3,4-диоксибензиламина)

или некоторых растительных пигментов (меланин из пирокатехина)

Ультрафиолетовые (225-400 мкм) спектры поглощения раст -
воров меланинов (в 0,5 н NaOH и в H₂O при pH 7 и pH 3)
снимали на спектрофотометре СФ-4 через интервалы 5 мкм. Спектры
поглощения в видимой области (400-700 мкм) записывались на ре-
гистрирующем спектрофотометре СФ-10. В этом случае образцы были
представлены в виде растворов в 0,5 н NaOH .

ИК-спектры меланинов (2 мг), опрессованных с KBr
(150 мг) в таблетки, снимали в области от 700 до 1200 см⁻¹ на
спектрофотометре ЛД - 10 фирмы Zeiss .

Рентгенограммы получали на дифрактометре УРС-50-И-М. Излу-
чение Cu_K , 30 кв., 10 ма, фильтр Ni).

Спектры ЭПР снимали на радиоспектрометре типа ЭПР-2 ИХФ
при комнатной температуре, поместив материал в стеклянные ампу-
лы. Сигнал ЭПР (в виде первой производной) записывали между ли-
ниями поглощения внутреннего стандарта (ионы Mn²⁺ в кристалле

K₂SO₄) на самописце ЭПР-09. Для оценки интенсивности сиг-
нала ЭПР применялась относительные единицы, получаемые при срав-
нении интенсивности спектра изучаемых образцов с интенсивностью
сигнала внутреннего стандарта. Кроме того, в некоторых случаях
концентрацию парамагнитных частиц в пигментах вычисляли путем
сравнения спектров со стандартными образцами дифенилпикрил -
гидразила (ДФПГ). Применение высушивания дрожжевой массы на воз-
духе вместо обычных способов подготовки биологического материала
к исследованию методов ЭПР (лиофильной сушки или замораживание в
жидком азоте) позволило "снять" ("потушить") сигнал ЭПР, исходя-
щий от активно метаболизирующих клеточных структур, и наблюдать
только свободные радикалы меланинов.

Каталазная активность intactных клеток устанавливалась
титриметрическим методом Баха и Оперина (1962). При определении
устойчивости дрожжей и H₂O₂ клетки двухсуточных культур на
сусло-агере суспендировали в дистиллированной воде до концент -
рации около 2 млн клеток в 1 мл. Исходную суспензию разводили
0,1 %-ной H₂O₂ (или H₂O - для контрольных высево) в соотношении

9:1, выдерживали в течение часа при комнатной температуре в условиях затемнения, а затем высевали на чашки с СА.

Испытания действия веществ, известных как ингибиторы меланиногенеза и тирозиназной активности, а также как индукторы синтеза этого энзима, проводили на природном штамме *Nadsoniella nigra* - 365 и на его мутантах с замедленным и ослабленным синтезом пигмента. На штамме I-365 выясняли главным образом вопрос о влиянии ингибиторов на накопление внеклеточного пигмента. Испытывались: 8 - оксихинолин, мочеви́на, диметилмочевина, тиомочевина, дифенилтиомочевина, сульфосалициловая кислота, азид натрия, цистеин, глутатион, *p*-, *m*- и *o*-бензойные кислоты, молибдат натрия, аминофенолы, аскорбиновая кислота, тирозин, фенилаланин, *N*-хлорацетил-DL-тирозин, DL-фторфенилаланин и *N*-хлорацетил-DL-аланин. Их концентрация в средах для культивирования составляла от 10^{-4} до 10^{-1} М.

I. ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА 365 И ЕГО ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Природный штамм (365) до момента описания и определения подерживался в течение 10 лет на агаризованном сусле путем пересевов и сохранялся при 4° . Из всех грибов, синтезирующих черные пигменты, *Nadsoniella nigra* Исаченко ближе всего подходит к штамму 365 по морфологическим и проверенным физиологическим характеристикам, хотя и не повторяет его полностью. Поэтому мы считаем возможным называть штамм 365 *N. nigra*, но предлагаем считать его разновидностью - *hemelic*. Сходство этих организмов замечательно само по себе с той точки зрения, что оба обнаружены в полярных областях - один на Севере, другой на Юге - и нет сведений о нахождении подобных организмов в средних районах земного шара. Отождествление (точнее, сближение) штамма 365 с *N. nigra* не сняло вопроса о его таксономическом положении. Описав организм, Б.Д. Исаченко его не идентифицировал и штамм не вошел ни в один из определителей. Поскольку работа со штаммом 365 была задумана как физиологическая, ограниченная кругом вопросов, связанных с его пигментацией, мы не предполагали уделять большого внимания его

таксономическим исследованием. Так как штамм 365 несравненно больше похож на дрожжи чёрного цвета, чем классические "чёрные дрожжи" типа *Pullularia pullulana*, то при изложении экспериментального материала мы будем иногда употреблять это последнее выражение в прямом смысле.

2. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПИГМЕНТА В КЛЕТКАХ *NADSONIELLA* *NIGRA* VAR. *HESEUELICA* ТИПЫ ЕЕ ПИГМЕНТНЫХ МУТАНТОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАДИОМУТАГЕНОВ

На примере *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica* впервые определена локализация меланина в клетках чёрных дрожжеподобных организмов и прослежена динамика и изменения пигментации у природного штамма и его мутантов.

Как показало изучение электронных микрофотографий ультратонких срезов клеток штамма 365, пигмент локализуется в клеточной стенке, составляя ее наружный довольно плотный слой. При почковании дочерняя клетка уже имеет четко выраженный и вполне сформировавшийся пигментный покров, и поэтому молодые клетки и почки существенно не отличаются по интенсивности пигментации от более старых. В перегородках на стадии их образования меланина, как правило, нет, однако к моменту деления клеток он появляется. Пигмент полностью сосредоточен в поверхностном слое клетки, никаких следов его образования и транспорта из цитоплазмы обнаружить не удалось. Расположенный в наружном слое клеточной стенки чёрных дрожжей *Nadsoniella nigra* пигмент, по-видимому, может служить прекрасным экраном, препятствующим проникновению УФ света внутрь клетки. Он же в какой-то степени может защищать и от ионизирующей радиации. Дикая пигментный фенотип очень устойчив и проявлялся неизменно из разных сред и в разных условиях культивирования.

Были получены мутанты неск. ько типов, некоторые из них ранее не описывались в литературе как формы генетического изменения пигментации у меланофорных организмов. Их можно разбить на три группы: I - мутанты с замедленным и ослабленным пигментогенезом, II - мутанты с внеклеточным накоплением меланина и

II - мутанты, потерявшие способность к его синтезу в обычных ("стандартных") условиях культивирования. Мутанты с измененной пигментацией по другим морфологическим и основным ферментным физиологическим характеристикам практически не отличались от исходной формы.

Мутанты первого типа (I) оказались самыми многочисленными, но и самыми нестойкими. Большинство из них ревертировалось в первые три-четыре месяца после выделения. В молодых клетках пигментный слой представлен отдельными гранулами; позднее клетки более интенсивно синтезируют пигмент, однако не в такой степени, как исходная форма. В оболочке вполне сформировавшихся и готовых отделиться почек пигментных зерен мало. Замедленное пигментообразование, выраженное в постепенном потемнении культуры (белая - серая - черная), или задержка пигментации на "серой стадии" связаны, по всей вероятности, с генетически детерминированным появлением лаг-периода в синтезе ответственного за пигментацию гена или мелагена, а также с отставанием интенсивности этого синтеза от роста культуры.

Апигментные мутанты (III) появлялись значительно реже других и к исходному типу никогда не возвращались. Один из них был получен при повторном облучении мутанта с замедленным пигментогенезом, т.е. очевидно, в результате двойной мутации. Для объяснения природы этих мутаций могут быть выдвинуты две основные гипотезы: или утрачена способность к синтезу меланогенного вещества или же выбита какая-то ступень в синтезе его субстрата. Возможно, что у разных мутантов этой группы имеют место разные повреждения. На ультратонких срезах эти клетки выглядят как типичные "белые" дрожжевые клетки.

Культуры мутантов типа (II) всегда оставались интенсивно окрашенными. Одни штаммы этой группы при пересеве сразу же начинали выделять пигмент, тогда как другие - только по прошествии некоторого времени. Частота появления подобного рода мутантов довольно высока, однако среди них удалось обнаружить только один организм (I-365), выделяющий пигмент в чрезвычайно больших количествах. На ультратонких срезах четко выделяется клеточный пигментный слой и многочисленные хорошо оформленные

внеклеточные гранулы, как бы "адукцивавшиеся" с него. Обращают на себя внимание заметно более рыхлая упаковка гранул в клеточной стенке сравнительно с исходной формой и истончение ее пограничного слоя. Данный мутантный фенотип может быть легко "превращен" в исходный путем выращивания культур в присутствии некоторых органических кислот (лимонной, янтарной, яблочной, сульфосалициловой). Замена кислот их солями (Na^+ и NH_4^+) снимает этот эффект. Культура мутанта I-365, коричневая в "стандартных" условиях, в этом случае выглядит такой же угольно-чёрной, как и культура дикого типа. Возможно, что этот фенотип обусловлен мутацией, вызвавшей какие-то изменения в проницаемости клеточной стенки для меланинов. Возможно также, что из клетки выходит продукт менее полимерные, чем пигмент дикого штамма. При этой среде в интервале значений pH, близких к нейтральным или слабо щелочным, выступают в роли "насосов", активно извлекающего меланина из клеток с поврежденной оболочкой. Их подкисление или каким-то образом меняет собственно проницаемость клеточной стенки так, что пигмент не может уже выйти из клетки, или же меланин, который, как известно, в кислых средах не растворяется, не может экстрагироваться и поэтому накапливается в оболочке клетки. Экспериментальное получение подробных этому мутанту форм микроорганизмов с приобретенной способностью накапливать в среде в больших количествах меланиновые пигменты становится в настоящее время необходимо в связи с перспективами использования меланинов в качестве противолучевых и антираковых агентов.

Устойчиво измененные по пигментации формы *Nadsoniella nigra* были получены почти исключительно под действием больших доз рентгеновской радиации (200-250 крад). Ультрафиолетовый монохроматический свет с длиной волны 2537 Å даже в большой дозе - 50 тыс. эрг/мм² - почти не обладал мутагенным действием в отношении индукции пигментных мутантов. Единственный выявленный при первичном отборе тип мутантов - организмы с несколько задержанным и ослабленным пигментобразованием - довольно быстро возвращался к исходному состоянию. По всей веро-

ятности, интенсивная меланиновая пигментация *Nadsoniella nigra*, явившаяся очень удачным приспособлением к жизни в условиях чрезвычайно активной ультрафиолетовой инсоляции, и при искусственном УФ облучении вещичает генетически значимые клеточные структуры, препятствуя индукции не только летальных мутаций, но и глубоких изменений характера пигментогенеза.

3. МЕЛАНОПИГМЕНТЫ *NADSONIELLA NIGRA* VAR.
HEBUELICA И ЕЕ МУТАНТА I-365

(Выделение и некоторые физико-химические свойства)

Чёрные пигменты, синтезируемые *Nadsoniella nigra* при культивировании на среде, не содержащей ни белков, ни пептидов, ни хромогенных винокислот, могут быть отнесены к группе меланинов на основании особенностей растворимости, обесцвечивания и спектральных характеристик препаратов этих пигментов, выделенных в истом виде:

а) Тест растворимости: положительный для щелочей и этилендиолгидрина ("типичных" растворителей меланинов) и отрицательный для кислот, обычных органических растворителей и тетрагидрофурана (растворителя меланоидинов);

б) Тест обесцвечивания: положительный для H_2O_2 , бромной воды, Cl_2 , $NaOCl$, $KaHSO_3$, $Na_2S_2O_5$

в) Спектральные тесты: снижение уровня поглощения света к длинноволновому концу спектра при отсутствии максимумов поглощения в УФ и видимой областях; пика поглощения при 3 и 6 мк в ИК-спектре пигмента исходного штамма (365), обнаруженные и у некоторых других природных и синтетических меланинов.

г) Характер структуры (по данным рентгеноструктурного анализа): аморфное вещество.

д) Свободно-радикальный тест: положительный.

Пигменты мутантного штамма отличаются от меланина исходного типа, в частности, во одержанию азота и по концентрации несвязанных электронов, и все они не обнаруживают полного сход -

стве на о одном из взятых для сравнения синтетических меланинов.

Меланин исходно штамма прочно связан с другими компонентами клеточной стенки и извлекается из них только в жестких условиях автоклавирования (со щелочью).

После полного извлечения пигмента оставалась клеточная масса светло-серая у штамма 365 и слегка желтоватая, почти белая у штамма I-365. Необходимая для этого продолжительность процедуры составляла для исходного штамма около 24 час. при I атм. или 36 час. при 0,5 атм. Для клеток мутантного штамма оказалось достаточным двух-трех при I атм. и шести часов при 0,5 атм. Для быстрого осаждения пигментов из них растворов в NaOH требовалось очень сильное подкисление или быстрое добавление спирта в превосходящем объеме. Экспигмент штамма I-365 присутствовал в культуральной жидкости в двух формах: в растворенной и в виде гранул; имеющих различные коэффициенты седиментации. Все три пигмента ("365 к" - клеточный штамм 365, "I-365 к" - тоже клеточный, но мутанта, и "I-365 вк" - его внеклеточный), выделенные в виде осадка из щелочного экстракта или культуральной жидкости обрабатывались далее (очищались и фракционировались) дистиллированной водой, спиртом и ацетоном (см.методы).

Наличие фракций клеточных пигментов, растворимых в спирте и ацетоне, возможно, связано с частичным разрушением (деполимеризацией?) пигмента при щелочном гидролизе. С другой стороны, нельзя утверждать, что их нет и в "нативном" пигменте, в особенности у мутантов с нарушенным пигментогенезом, что подтверждается экспериментами о пигмент "I-365 вк". Способы выделения микробных меланинов из клеток и культу- ральной жидкости могут быть разными, причем приемы извлечения влияют на некоторые свойства этих пигментов.

Растворимые в воде препараты были получены нами для всех исследованных пигментов. Мы предполагаем, что раст- воримость в воде обусловлена тем, что эти вещества являются

натриевыми солями - фенолятами, что кажется весьма вероятным, если принять полифенольную природу меланинов. Подтверждением включения ионов натрия в молекулу пигмента при получении растворимых в воде препаратов из нерастворимых в ней могут служить данные элементарного анализа: разница в их зольности очень значительна - 21 % против 1 % (для I-365 вк"). Получение таких препаратов имеет несомненное практическое значение, поскольку они удобны для исследований радиопротекторной и противоопухолевой активности этих пигментов, а также их метаболизма в организме животного. В наших опытах с одним из таких водорастворимых пигментов ("I-365 вк") уже была обнаружена ярко выраженная способность этого вещества защищать клетки радиочувствительного штамма дрожжей *S. utilis* от летального действия ультрафиолетовой радиации (гл. 6).

4. ИСПЫТАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВ, ИЗВЕСТНЫХ КАК ИНГИБИТОРЫ МЕЛАНИНОГЕНЕЗА И ТИРОЗИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ, А ТАКЖЕ КАК ИНДУКТОРЫ СИНТЕЗА ЭНЗИМА, НА РОСТ И БИОСИНТЕЗ ПИГМЕНТОВ У *NADSONIRILLA NIGRA* VAR. *NEBULICA* И ЕЕ МУТАНТОВ

Задача настоящего раздела исследования заключалась в достижении избирательного торможения меланиногенеза у *N. nigra* без подавления функции роста. Поиски подходящих ингибиторов были вызваны необходимостью подойти к выяснению вопроса о физиологической роли меланизации у данного организма - нужны были пигментные культуры для сравнительных исследований.

Предполагая, что пигментогенез, возможно, обусловлен активностью тирозиназы, мы попытались прежде всего соединения, известные в качестве ингибиторов этого фермента.

Тиомочевина, дифенилтиомочевина, 8-оксихинолин, сульфосалициловая кислота, азид натрия, цистеин и глутатион испытывались как соединения, блокирующие тирозиназу за счет образования слабодиссоциирующего комплекса с медью энанима (относительно механизма действия цистеина и глутатиона существует и

другое мнение). Ряд мочевины-диметилмочевина-тиомочевина-дифенилтиомочевина был взят, чтобы проверить, будут ли эти вещества выступать в качестве ингибиторов и подтверждаются ли полученные на картофельной тирозиназе сведения о том, что наличие ароматического кольца усиливает ингибирующее действие соединения. Парааминобензойная кислота также известна в качестве ингибитора тирозиназы. Она рассматривается или как вещество, образующее комплексы с медью, или же ее действие определяют как конкурентное. Бензойная кислота действует на активный центр тирозиназы. Молибдат натрия испытывали на ингибирующее действие у *N. alga*, поскольку ранее (на тирозиназо млекопитающих) было установлено, что это вещество ингибирует меланиногенез соединяясь с о-диоксигруппами субстратов. Эффект наблюдается и *in vivo*. Аскорбиновая кислота также часто описывается как ингибитор меланиногенеза. Считается, что она может воздействовать как непосредственно на энзимы, так и на хиноны, т.е. на энзиматическом и неэнзиматическом этапах. Ароматические аминокислоты и их аналоги (тирозин, фенилаланин, *N*-хлорацетил - DL -тирозин, DL -фторфенилаланин), а также *N*-хлорацетил - DL - аланин были взяты, чтобы проследить, оказывают ли они какое-нибудь влияние на пигментогенез у *N. alga* как субстраты, ингибиторы или индукторы меланиногенеза, т.к. известно, что у микроорганизмов указанные соединения (или им подобные) могут действовать по этим трем направлениям.

Из всех испытанных соединений единственным веществом, подавляющем внутриклеточный меланиногенез как у исходного штамма, так и у мутантов, оказалась аскорбиновая кислота. Материалы о ее действии вынесены в отдельный раздел (9), где этот вопрос рассматривается подробно.

Что же касается внеклеточного накопления пигмента у мутанта I-365, то цвет культуральной жидкости приблизительно соответствовал количеству присутствующей биомассы и только в двух случаях был получен резко выраженный эффект ингибирования. В присутствии $10^{-2}M$ *p*-аминобензойной кислоты рост

был приблизительно таким же, как и в контроле, тогда как пигмента в культуральной жидкости почти не было. Аналогичная картина наблюдалась и в присутствии сульфосалициловой кислоты (0,1 %), когда рост был интенсивнее, чем в контроле, а экзопигмента не было совершенно. Интересное влияние на мутанты 1-365 и 2-365 оказывала мочевины (10^{-2} М). В культуре первого появлялось большое количество красновато-коричневого пигмента, через 10 дней после засева агар становился совершенно чёрным. Цвет второго штамма в 6-дневных культурах с мочевиной был ярче коричневатого-красным вместо тёмно-серого с коричневым оттенком в контроле. С ароматическими аминокислотами и их аналогами определенных результатов получить не удалось. Заметное усиление роста штамма 365 было обнаружено при добавлении к минеральной среде тирозина и фенилаланина в концентрации 10^{-3} М (10^{-2} М оказывали ингибирующее действие). "Тирозиназная реакция" в присутствии тирозина отмечено не было. У мутанта 1-365 обе эти аминокислоты (10^{-3} М) также стимулировали рост и накопление экзопигмента, в особенности фенилаланина. И у мутанта 2-365 рост был лучше, чем в контроле, но пигментогенез оставался таким же. На сусло-агаре это влияние на рост было выражено слабее (у всех штаммов), а на мясо-пептонном агаре оно отсутствовало (в некоторых случаях при концентрации 10^{-3} М пигментация оказывалась даже сниженной). Ни одно из испытанных веществ не индуцировало синтеза меланина в клетках пигментного мутанта 5-365.

Стимулирующее действие на рост *N. nigra* фенилаланина и тирозина, отмеченное на минеральной среде, вероятно, связано с ее бедностью органическими веществами. По-видимому, то же самое объяснение может быть выдвинуто и для цистеина и глутатиона. Введение в среду этих веществ позволило полное удовлетворить потребности организма в питательных веществах. Косвенным подтверждением этого является слабая эффективность этих соединений на органических средах. Отсутствие ингибирования синтеза меланинов у *N. nigra* веществами, известными в качестве ингибиторов тирозиназ других организмов, вряд ли

может рассматриваться как прямое указание на отсутствие этой системы у данного организма. Как известно, далеко не всегда ингибитор, активно действующий на изолированную систему, подавляет энзим *in vivo*. Кроме того, некоторые из испытаний соединений показали себя сильными ингибиторами роста. Если клеточную пигментацию у *N.nigra* удалось снять (без подавления функции роста) только с помощью аскорбиновой кислоты, то внеклеточное накопление пигмента у мутанта I-365 и хромогенная реакция у остальных штаммов оказались довольно чувствительными к присутствию в среде ряда веществ. Все они являлись кислотами. Возможно, активная кислотность среды является тем неспецифическим фактором, который обуславливает это ингибирование.

5. УСТОЙЧИВОСТЬ *KADSONIELLA NIGRA* VAR. *NEBUELLICA*,
ШТАММ 365 К ДЕЙСТВИЮ КОРСТКОВОЛНОВЫХ
ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Данные опытов, сведенные в таблице 1 и 2, позволяют сделать заключение о значительной устойчивости "чёрных дрожжей" штамм 365 к летальному действию высоких доз нескольких типов электромагнитного излучения (УФ света, гамма- и рентгеновской радиации). Сравнительно с белыми дрожжами *Candida utilis* (штамм 295) эти различия могут достигать одного-двух порядков.

Таблица 1

Сравнительная устойчивость *N.nigra* (365) и
C. utilis (295) к УФ свету.

Доза, тыс. эрг/ми ²	Выживаемость штам-		Доза, тыс. эрг/ми ²	Выживаемость	
	мов, %			штаммов, %	
	295	365		295	365
0,5	14,5 ± 0,81	52,4 ± 1,14	50	0	0,25 ± 0,04
5	0	50 ± 1,08	100	0	0

Полулетальная доза для *B. nigra* лежала между 25 кр (выживаемость 73 %) и 50 кр (14 %) гамма-радиации, т.е. не довольно высоком для дрожжей уровне (Мейсель и соавт. 1961). Доза в 5 тыс. эрг/см² ультрафиолетовых лучей, которая полностью инактивировала белые дрожжи *S. utilis*, оказалась полулетальной (LD₅₀) для черных.

Таблица 2

Устойчивость дрожжей к гамма и рентгеновской радиации

Доза, кр:	В ы ж и в е м о с т ь штаммов, %			
	гамма-лучи		рентгеновские лучи	
	295	365	295	365
25	4,20±0,08	73,4±0,11	1,000	10±0,03
50	2,50±0,07	14,3±0,09	-	-
100	0,75±0,10	7,1±0,08	0,002	4,2±0,04
150	0,40±0,04	4,1±0,03	0,000	2,1±0,02
200	0,47±0,03	2,1±0,03	0,000	0,3±0,01
250	0,01±0,01	2,3±0,12	0,000	0,4±0,10

Сравнение с цифрами, представленными Самойловой (1967) в сводке данных по чувствительности различных объектов к ультрафиолету, позволяет отнести изученный нами микроорганизм к высокоустойчивым. Поскольку систематическое положение *Nadsoniella nigra* - 365 продолжает оставаться неустановленным, но она более похожа на дрожжи, чем на что-либо другое, мы считаем возможным сопоставлять ее устойчивость к ионизирующей радиации и УФ свету с устойчивостью к ним дрожжевых организмов, хотя общеизвестно, что сравнение в абсолютных величинах данных с приведенными в литературе очень затруднительно, так как все эксперименты проходились в разных условиях и с материалом, находящемся в неодинаковом физиологическом состоянии.

Дозовая зависимость выживания штамма 365 в интервале 50-200 кр (для гамма-радиации) выражалась прямой линией при использовании логарифмической шкалы, т.е. была экспоненциальной (рис. 1).

Мы связываем повышенную резистентность *N. nigra* к поражающему действию лучистой энергии прежде всего с присутствием в клетке чёрного пигмента.

6. ФОТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИЗОЛИРОВАННОГО МЕЛАНИНА *MADSONIELLA NIGRA*

Впервые были получены прямые доказательства непосредственного фотопротекторного действия микробных пигментов в опытах по облучению чувствительных к УФ организмов в присутствии изолированных соединений. В качестве объекта защиты были выбраны белые дрожжи *Candida (Torula) utilis*, противолучевым агентом служил внеклеточный меланиновый пигмент мутанта I-365 *N. nigra* (рис. 2).

Пигмент, присутствующий в суспендирующей жидкости в концентрации 0,15 %, полностью защищает радиочувствительные клетки дрожжей от УФ излучения (бактерицидной лампы) в условиях эксперимента. Десятикратное уменьшение содержания пигмента в растворе снижает его радиопротекторную активность, разведение в 100 снижает ее полностью. По-видимому, концентрации этого порядка для примененных доз ультрафиолета являются пороговыми. Пигмент защищает клетки только непосредственно в момент облучения, перенесение облученных в воде клеток тотчас же после воздействия на них УФ света в раствор пигмента (необлученные и облученные) не приводило к повышению уровня выживаемости. При облучении растворов пигмента образования цитотоксичных веществ не наблюдалось.

Главную защитную роль мы склонны приписывать "захвату" пигментом *N. nigra* энергии ультрафиолетового света и возникающих в среде при облучении реактивных свободных радикалов стабильными свободными радикалами, присутствующими в меланине в больших количествах (механизм I). С другой сто-

роны, защитное экранирование предполагается или известно для ряда веществ, поглощающих в ультрафиолете и несомненно, что этот эффект может принимать участие в защите клеток *C. utilis* от фотолиза благодаря поглощению меланинами лучистой энергии. Фотометрическое исследование меланипигмента *N. nigra* показало ярко выраженную способность вещества поглощать ультрафиолетовую часть спектра в широком диапазоне волн.

7. КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И ПЕРЕКИСНАЯ ИНАКТИВАЦИЯ *NADSONIELLA NIGRA* VAR. *NESUELICIA*

Косвенным подтверждением правильности предположения о радиозащитной функции чёрного пигмента *N. nigra* - 365 могло бы служить установление факта отсутствия действия у этого организма ряда клеточных радиопротекторных механизмов, в частности, каталазы, повышенная активность которой привлекалась многими исследователями для объяснения устойчивости к УФ свету и ионизирующей радиации различных биологических объектов. В связи с этим представляло интерес определение уровня каталазной активности штамма 365 и его устойчивости к H_2O_2 .

Сравнительное изучение каталазной активности и перекисной инактивации *Nadsoniella nigra* - 365 ("чёрные дрожжи") и *Candida utilis* - 295 ("белые дрожжи") показало отсутствие прямой зависимости между определяемым уровнем каталазной активности организма и его устойчивостью к H_2O_2 : штамм 365 обнаружил более низкую каталазную активность, чем 295 при значительно более высокой устойчивости к инактивации H_2O_2 . Аналогичная картина была выявлена и у другой пары штаммов: мутант 7-365, двухсуточные культуры которого содержали очень немного пигмента, оказался в 4 раза более чувствительным к инактивации 0,01 %-ной H_2O_2 , чем штамм 365, хотя его каталазная активность в момент обработки перекисью была выше на достаточно ощутимую величину (табл. 3).

Таблица 3

Каталазная активность дрожжей (двухсуточные культуры на сусло-агаре) и их устойчивость к действию 0,01 %-ного раствора H_2O_2 .

Штаммы	Каталазная активность, мг H_2O_2 /100 мг сух.вещ./час.	Устойчивость к действию перекиси, % и контроль
295	152,62 ± 1,18	3,2
365	121,68 ± 0,94	30,9
7-365	142,40 ± 0,72	6,9

При увеличении концентрации H_2O_2 до 0,5 % у всех штаммов выживали только отдельные клетки, 1 %-ная H_2O_2 давала полный летальный эффект. Вероятно, большая устойчивость черных дрожжей к перекиси водорода обусловлена способностью их пигмента связывать H_2O_2 и этим снимать ее токсическое действие на клетку. По-видимому, при высоких концентрациях H_2O_2 может происходить "пересыщение" активного объема пигмента, необратимое разрушение пигментного барьера и - как следствие этого - перекисная инактивация клеток.

Динамика каталазной активности трех сравниваемых штаммов представлена на рис. 3. Разнохарактерность хода кривых и различие в каталазной активности между штаммами 365 и I-365 могут быть объяснено тем, что пигмент, затрудняя доступ к чувствительным структурам клетки такого высокотоксичного вещества, каким является H_2O_2 , одновременно препятствует "встрече" внутриклеточной каталазы с ее субстратом, вследствие чего она полностью и не выявляется. Когда же мутант со временем успевает синтезировать довольно плотный пигментный слой в клеточной стенке, контакт энзима с субстратом затрудняется, что выглядит как резкое падение его каталазной активности. Устойчивость штамма 365 к H_2O_2 при более низком уровне каталазной активности и сравнительно высоком радио -

устойчивость наводят на мысль о связи этих двух свойств клеточек с третьим фактором - присутствием меланина, который и определяет оба эти качества. Каталазная активность штамма 365 невелика и, по-видимому, большой радиопротекторной роли не играет. Полученные данные могут представлять особый интерес в связи с проблемой непрямого действия радиации, обусловленного продуктами радиолитиза воды. Облучение гамма-радиацией (в дозах 5.10 и 100.10 p) изученных штаммов не приводит к заметным сдвигам в каталазной активности как у радиостойчивого (365), так и у радиочувствительного штаммов (295).

8. СТАБИЛЬНОЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПИГМЕНТА *MADSONIELLA NIGRA* VAR. *RESUELICA* И ЕГО ВОЗМОЖНОЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Меланопигменты *Madsoniella nigra* var. *resuelica* являются первыми микробными меланинами, у которых было обнаружено существование стабильных свободных радикалов в высоких концентрациях (10^{19} ед/г сух.вещ). Их спектры ЭПР могут быть описаны как слегка асимметричные синглетные сигналы без СТС с величиной g фактора, близкой к величине, характерной для свободного электрона, и расстоянием между точками максимального наклона около 5-6 эрст. (рис. 4).

Изменение интенсивности сигналов ЭПР живых культур находится в полном соответствии с уровнем накопления пигмента. Особенно четко это прослеживается на мутантах с замедленным пигментогенезом. Факт установления стабильного свободно-радикального состояния меланина *M.nigra* имеет огромное значение для решения вопроса о его физиологической функции. Сходство его спектров ЭПР со спектрами других меланинов-природных и синтетических - допускает известное "перенесение" выводов, полученных в экспериментах со специально изучавшимися с этой точки зрения меланинами, на пигменты *M.nigra*. Вероятно, с этим свойством меланопигмента организма связана его низкая чувствительность к H_2O_2 и большая устойчивость к ионизирующей радиации и УФ свету (гл.5 и 7).

9. ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА МЕЛАНИНОГЕНЕЗ
NADSONIELLA NIGRA VAR. *NESEUELLICA*
 И ЕЕ УСТОЙЧИВОСТЬ К УФ И ГАММА-РАДИАЦИИ

При попытках получить нормально развивающиеся, но лишенные пигмента культуры чёрных дрожжей *Nadsoniella nigra*, выяснилось, что из всех испытанных соединений, известных в качестве ингибиторов меланиногена и тирозиназы, эффективной оказалась только аскорбиновая кислота (гл.4). Механизм действия этого соединения на меланиногенез до сих пор недостаточно ясен и на микробном материале не исследовался. Влияние аскорбиновой кислоты на меланиногенез *N. nigra* проявлялось при концентрациях, приближающихся к 10^{-2} М. Микроскопически клетки были подобны контрольным, никакого ингибирования роста не было отмечено даже при концентрации 10^{-1} М. Потемнение культур происходило медленно, культуры же на среде с 10^{-1} М аскорбиновой кислоты оставались светлыми до 3 недель. Аналогичное действие аскорбиновой кислоты наблюдалось и у всех мутантов с различным изменением пигментогенезом. При помещении в целочь белая биомасса довольно быстро темнела.

После автоклавирования раствор NaOH интенсивно окрашивался в коричневый цвет, подобно тому, как это бывает при извлечении пигмента из чёрных клеток.

Исключенные данные свидетельствуют о том, что аскорбиновая кислота не блокирует активность меланиногенного фермента

N. nigra, поскольку в противном случае пигмент в указанных выше условиях не мог бы образовываться вследствие щелочной, а затем и термической инактивации ферментативического белка.

Почернение могло происходить и просто под влиянием кислорода воздуха при суспендировании клеток в дистиллированной воде, но времени для этого требовалось значительно больше. Облучение УФ светом водной суспензии "белых" клеток *N. nigra* значительно ускоряет их пигментирование.

Предположение о том, что пигмент, как сложный полимер, присутствует в клетке, но находится в восстановленной форме,

переходя в окрашенную при окислении кислородом воздуха (особенно легко в щелочных условиях) было оставлено исходя из того, что аскорбиновая кислота практически не обесцвечивает "готовый" пигмент, т.е. не восстанавливает его до лейкоформы. Не обесцвечивает она сколько-нибудь заметно и пигментированную (черную) культуру (при суспендировании клеток в ее насыщенном растворе), не допуская в то же время потемнения неокрашенных ("аскорбиновых") культур даже при инкубации в течение месяца. В связи с этим нам кажется более вероятным предположение о вмешательстве аскорбиновой кислоты в процесс синтеза полимерной молекулы, которая как акцептор свободных радикалов может выступать в роли ингибитора полимеризации семихинонов, участие которых в образовании меланинов *in vitro* достоверно доказано, а в меланиногенезе, протекающим *in vivo* представляется весьма вероятным.

Отсутствие обычного сигнала ЭПР у "аскорбиновых" культур *N. nigra* - 365 также может быть приведено в качестве свидетельства того, что в клетках нет полимерного пигмента, поскольку известно, что обработка меланина аскорбиновой кислотой не сказывается на их парамагнитных свойствах ни в количественном, ни в качественном аспекте (Blois et al, 1964). Слабый сигнал обесцвеченных культур, возможно, обусловлен присутствием каких-то промежуточных продуктов синтеза меланина или же очень небольшими количествами полимерного пигмента.

"Аскорбиновая", а пигментная культура оказалась заметно устойчивее к излучениям, чем черная, пигментированная форма (табл.4): к УФ свету более, чем в 3,5 раза, к гамма-радиации в 1,5 3,5 и 6 раз - в зависимости от дозы (50, 100 и 150 крад) чем выше доза, тем ниже была относительная радиочувствительность клеток. Этот эффект описан впервые.

Мы предполагаем, что защита пигментных ("аскорбиновых") клеток от излучений осуществляется за счет иницирования синтеза полимерного пигмента окислительными радикалами, образующимися при облучении (в особенности, ионизирующей радиацией), т.е. путем их своеобразного "перехвата" (механизм II).

Таблица 4

Сравнительн. : устойчивость чёрной (исходной)
и белой ("аскорбиновой ") форм *N.nigra* - 365
к действию УФ света и гамма-радиации

Культура	Выживаемость после облучения, %				
	УФ светом, сек.		гамма-лучами, крбд		
	60	120	50	100	150
КОНТРОЛЬ (чёрная форма)	24,1±0,61	7,2±0,50	12,3±0,08	3,9±0,11	2,12±0,03
Культура с 10 ⁻² M аскор- биновой кис- лоты (белая форма)	87,4±0,72	26,1±0,07	18,2±0,06	14,1±0,09	12,5±0,08
Устойчивость белой формы в сравнении с чёрной, %	360	370	140	360	600

Кроме того, нельзя без специальных исследований исключить возможность некоторого непосредственного участия аскорбиновой кислоты в механизме, обуславливающим значительное повышение радиоустойчивости культур *N.nigra*, выросших в ее присутствии в среде. Что касается фотозащиты, то она возможно, происходит также в результате использования энергии фотонов на завершение процессов меланиногенеза. В природных условиях, вероятно, могут действовать оба механизма фотозащиты (гл.6 и 9) с преобладанием того или другого, в зависимости от состояния, в котором находится клетка.

В общем случае фотопротекторная функция, обеспечиваемая процессом синтеза полимерного пигмента, в особенности важна для культур с замедленной динамикой пигментогенеза, что очень характерно для грибов группы "чёрных дрожжей".

ВЫВОДЫ

1. Описан новый чёрный антарктический дрожжеподобный микроорганизм (штамм 365), близкий по морфологическим и культурально-физиологическим характеристикам к *Nadsoniella nigra* Б.Л.Исаченко, но значительно отличающийся от "чёрных дрожжей" типа *Pullularia pullulans* и от описанных чёрных криптококков. Предложено считать его *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica*.

2. Установлено, что дикий пигментный фенотип очень устойчив и проявляется на разных средах и в разных условиях культивирования.

3. Были получены мутанты нескольких типов. Некоторые из этих типов ранее не описывались в литературе как формы генетического изменения пигментации у меланофорных микроорганизмов. Устойчиво измененные формы получались почти исключительно под действием больших доз рентгеновской радиации (200-250 крад). Ультрафиолетовый свет (2537 Å) в испытанных дозах (до 50 тыс. эрг/мм²) почти не обладал мутационным действием в отношении индукции пигментных мутантов.

4. Впервые показано, что пигмент чёрных дрожжеподобных организмов локализуется в клеточной стенке, составляя ее наружный довольно плотный слой. Клетки апигментных мутантов при электронном микроскопировании ультратонких срезов выглядят как "белые" дрожжевые клетки. У мутантов с замедленным и ослабленным пигментогенезом в оболочках молодых клеток и вполне сформировавшихся и готовых отделиться почек пигментный слой представлен только отдельными гранулами. Со временем пигментации усиливается, однако не достигает уровня, существующего у исходной формы. Мутанты с внеклеточным накоплением пигмента характеризуются истончением самого верхнего слоя клеточной стенки, соприкасающегося со средой, заметно более рыхлой упаковкой пигментных гранул, часть которых как бы "слизывается" с клетки, переходя в окружающую среду.

5. Последний мутантный фенотип может быть легко "превращен" в исходный путем выращивания культур в присутствии неко-

торых органических кислот.

6. Пигменты *N.ligra* и ее мутантов могут считаться меланинами на основании соответствующих показателей комплексов тестов, принятых для идентификации этой группы пигментов. Меланины исходного и мутантного штаммов не полностью идентичны и отличаются по ряду характеристик. Их химическая структура не установлена. Они могут быть извлечены из клеток и из культуральной жидкости разными способами. Получение нейтральных водорастворимых препаратов микробных и синтетических меланинов дает возможность использовать их в практических целях, например при испытании их противоопухолевого и противолучевого действия на животных.

7. Пигмент синтезируется на средах, не содержащих хромогенные субстраты (белки, пептиды, хромогенные аминокислоты и пр.) Меланогенный энзим и его субстрат не известны. Проверенные ингибиторы тирозиназы оказались неактивными *in vivo* в отношении меланиногенеза *N.ligra*. Ароматические аминокислоты и их аналоги не индуцируют и не ускоряют этот процесс у пигментных и замедленно пигментирующихся мутантов. Аскорбиновая кислота (10^{-2} и выше) дает избирательное торможение пигментообразования без какого-либо подавления функции роста. Блокирование не затрагивает активности меланогенного энзима, а осуществляется, по-видимому, на стадии формирования полимерной молекулы пигмента, предположительно, через предотвращение свободнорадикальной полимеризации. Ингибирующее действие аскорбиновой кислоты обратимо и может быть снято её устранением.

8. Меланипигменты *N.ligra* являются первыми микробными меланинами, у которых было обнаружено стабильное свободно-радикальное состояние. Концентрация СР в них довольно велика ($1,6 \cdot 10^{19}$ /г сух.вещ. у пигмента исходного штамма). Они очень похожи на спектры синтетических и некоторых природных (животных) меланинов. Изменения интенсивности сигналов ЭПР живых культур определяются присутствием в клетках меланинов в таком же полном соответствии с уровнем накопления этих пигментов.

9. Штамм 365 *N. nigra* устойчив к действию коротковолновых электромагнитных излучений (УФ-света, гамма и рентгеновской радиации), что хорошо коррелирует с экологическими условиями его жизни и позволяет предполагать существование у его пигмента фото- и радиопротекторной функции. Впервые получены прямые доказательства антилучевой активности микробных меланинов в опытах по облучению УФ светом чувствительных к этому агенту дрожжей *Candida utilis* в водных растворах очищенного пигмента.

10. Показана высокая устойчивость штамма 365 к инактивации перекисью водорода, что также, по-видимому, связано с наличием пигмента в клеточной стенке. Мутанты с ослабленным синтезом пигмента более чувствительны к H_2O_2 , чем исходная форма. Каталазная активность штамма 365 невелика и, вероятно, большой радиопротекторной роли не играет. Было установлено отсутствие прямой зависимости между устойчивостью организма к H_2O_2 и уровнем каталазной активности интактных клеток.

11. Описан эффект меньшей радиочувствительности спигментной формы штамма 365 ("аскорбиновые культуры") по сравнению с исходной чистой. Предложено объяснение этому явлению.

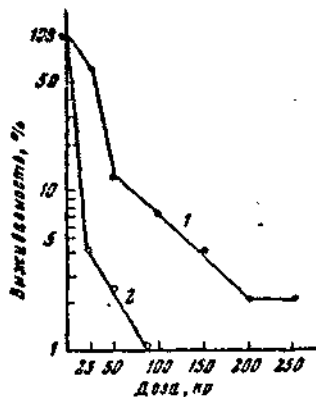


Рис. 1. Выживаемость *Nadsoniella nigra* - 365(I) и *Candida utilis* - 295 в зависимости от дозы гамма-облучения.

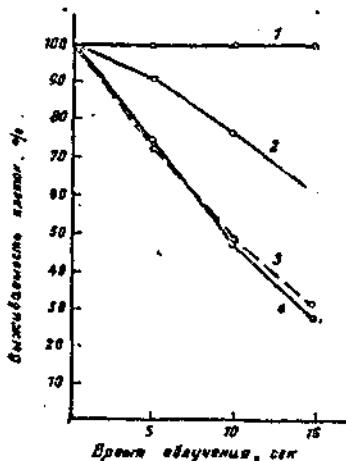


Рис. 2. Эффективность защиты от УФ света клеток *Candida utilis* - 295 изолированных пигментом *Nadsoniella nigra* I-365 в зависимости от его концентрации (%):
1 - 0,15 ;
2 - 0,015 ;
3 - 0,0015 ;
4 - облучение в дистиллированной воде.

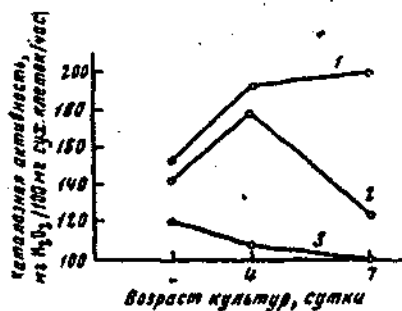


Рис. 3. Динамика каталазной активности культур *Candida utilis* - 295 (1), *Nadsoniella nigra* 7-365 (2) и *Nadsoniella nigra* -365 (3).

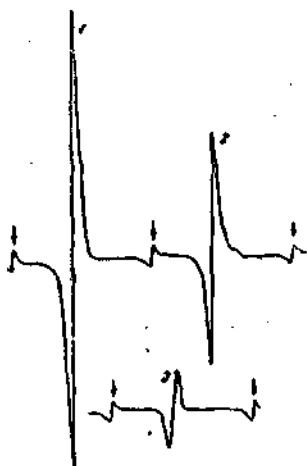


Рис. 4. Спектры ЭПР меланинов *Nadsoniella nigra*: клеточные пигменты штаммов 365 (1) и I-365 (2) и внеклеточный пигмент штамма I-365 (3). Стрелками показаны сигналы внутреннего стандарта.

Список работ, опубликованных по материалам
диссертации

1. Рубан Е.Л., Волкова Т.М., Лях С.П. 1968. Локализация пигмента в клетках черных дрожжей. Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 299-301.
2. Рубан Е.Л., Лях С.П. 1968. Устойчивость *Nadsoniella nigra* к действию коротковолновых электромагнитных излучений. Изв. АН СССР, сер. биол. № 9, 402-407.
3. Лях С.П., Рубан Е.Л. 1968. Каталазная активность и перекисная инактивация *Nadsoniella nigra* Микробиология, т.37, вып.4, 586-590.
4. Лях С.П., Рубан Е.Л. 1968. Фотопротекторное действие пигмента *Nadsoniella nigra* . Микробиология, т.37, вып.5, 862-864.
5. Рубан Е.Л., Фомин Г.В., Лях С.П. 1968. Исследование меланинов *Nadsoniella nigra* методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). ДАН СССР, т.182, № 5, 1219-1222.
6. Рубан Е.Л., Лях С.П., 1968. Исследование природных меланинов. Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 530-542.
7. Лях С.П., Рубан Е.Л., 1968. Меланиногенез и активность тирозиназы у микроорганизмов. Успехи микробиологии, Ут.5, 90-120.
8. Лях С.П. 1968. Методы определения тирозиназной активности микроорганизмов. Микробиологический синтез № 9, 20-28.
9. Лях С.П. 1968. Химия природных меланинов. Биологические науки, № II, 87-97.
10. Рубан Е.Л., Лях С.П., Хрулева И.М., Титова И.А. 1969. Меланиновые пигменты *Nadsoniella nigra* . Изв. АН СССР, сер. биол. № I, 134-148.
11. Рубан Е.Л., Лях С.П., Волкова-Козлова Т.М., 1969. Мутант *Nadsoniella nigra* , синтезирующий экзоцеллюлярный меланин. Изв. АН СССР, сер. биол. № 2, 283-285.

12. Рубан Е.Л., Лях С.П., 1969. Влияние аскорбиновой кислоты на меланиногенез *Nadsoniella nigra*. к ее устойчивости к УФ свету и гамма-радиации. Изв. АН СССР, сер. биол. № 3, 401-405.
13. Лях С.П., Рубан Е.Л., 1969. Типы пигментных мутантов *Nadsoniella nigra* и эффективность радио - мутагенов. Микробиология, т. 38, № 4, 663-666.
14. Рубан Е.Л., Лях С.П. 1970. Генетическое детерминирование синтеза тирозиназы и меланиногена у микроорганизмов. Изв. АН СССР, сер. биол. № 2 (в печати)
15. Рубан Е.Л., Лях С.П., 1970. Биологическая функция меланинопигмента *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica* и предполагаемые механизмы ее обеспечения. Изв. АН СССР, сер. биол. № 3 (в печати).
16. Лях С.П. 1970. Действие химических соединений на меланиногенез и тирозиназную активность микроорганизмов. Биологические науки (в печати).
17. Лях С.П., Рубан Е.Л. 1970. Антарктические черные дрожжи *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica*. (Характеристика и идентификация штамма 365) ©1970. Изв. АН СССР, сер. биол. (в печати).
18. Лях С.П., Рубан Е.Л. 1970. Микробные меланины (монография) "Наука" (в печати).

Т-00656. Подп. к печати 4/II-70 г.
Зак. 93. Тир. 200

Типография ХОЗУ Минотроля СССР

