ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ПРОДУКТАХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗЛОЖЕНИЯ СОЛОМЫ ЗЛАКОВ, И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ И УРОЖАЙНОСТЬ РАСТЕНИЙ В НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЯХ

Фитискина Н.В.¹, Карташова Е.Р.²,
Юрина Т.П.³, Олескин А.В.³, Курченко
В.П.⁴, Калабин Г.А.⁵, Кудоярова Г.Р.⁶,
Архипова Т.Н.⁶

¹Московский государственный университет пищевых
производств; ²Московское общество испытателей природы;
³Московский государственный университет им.
М.В.Ломоносова; ⁴Белорусский государственный университет,
Минск; ⁵Российский университет дружбы народов, Москва;
⁶Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, Уфа
E-mail: nvfitiskina@mail.ru

Применение продуктов микробиологического разложения растительного сырья - один из возможных подходов к снижению отрицательного воздействия на растения неблагоприятных условий окружающей среды, в том числе, присутствия тяжелых металлов в почве. «Экотол» образуется биотехнологическим путем микро- и микробиотой в воде в аэробных условиях в процессе трансформации растительного сырья (соломы, листового опада и пр.). Микро- и микробиота выделяет в культуральную среду вещества фенольной природы: биогенные амины, меланиновые пигменты, индолилуксусную кислоту и другие физиологически-активные соединения. Эти соединения, включаясь в метаболизм, повышают устойчивость растений к стрессовым воздействиям и положительно влияют на ростовые процессы как сельскохозяйственных растений, так и древесных саженцев лиственных пород.

Ключевые слова: экотол, микро- и микробиота, нейромедиаторы, меланиновые пигменты, индолилуксусная кислота, повышение устойчивости растений

PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN THE PRODUCTS OF MICROBIOLOGICAL DECOMPOSITION OF STRAW OF CEREALS, AND THEIR EFFECT ON GROWTH AND YIELD OF PLANTS IN UNFAVORABLE CONDITIONS

Fitiskina N.V.¹, Kartashova E.R.²,
Yurina T.P.³, Oleskin A.V.³, Kurchenko
V.P.⁴, Kalabin G.A.⁵, Kudoyarova G.R.⁶,
Arkhipova T.N.⁶

¹Moscow State University of Food Production, Moscow;
²Moscow Society of Naturalists; ³Lomonosov Moscow
State University, Moscow; ⁴Belarusian State University,
Minsk; ⁵Peoples Friendship University of Russia,
Moscow; ⁶Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal
Research Centre of RAS, Ufa
E-mail: nvfitiskina@mail.ru

The use of the products of microbial decomposition of plant raw material is one of the possible approaches to reducing the negative impact on plants of adverse environment, as well as heavy metals in soils. "Ecotol" is formed biotechnologically by micro- and mycobiotics in water under aerobic conditions in the process of transformation of plant material (straw, leaf litter, etc.). Myco- and microbiota releases into the culture medium substances of a phenolic nature: biogenic amines, melanin pigments, indolylacetic acid and other physiologically active compounds. These compounds, being included in the metabolism, help plants to withstand stress and positively influence the growth processes of both agricultural plants and hardwood deciduous trees.

Keywords: ecotol, myco-and microbiota, neurotransmitters, melanin pigments, indolylacetic acid, increase of plant resistance

Поступила в редакцию: 13.09.2018

DOI: 10.31163/2618-964X-2018-1-3-161-176

ВВЕДЕНИЕ

Дефицит воды в почве, неоптимальный температурный режим и присутствие в почве токсичных веществ (например, тяжелых металлов) ингибируют рост растений, способствуя снижению их урожайности. Характерное для многих регионов повышение аридности

климата и техногенное загрязнение почвы создают угрозу продовольственной безопасности и возможности обеспечения пищей растущее население земли [Tester, Langridge, 2010]. Поэтому не прекращается поиск путей повышения устойчивости растений к неблагоприятным условиям обитания. Путем микробиологического разложения растительного сырья (соломы, листового опада и т.п.) была получена смесь веществ, способных повышать устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды, что позволило присвоить им название «экотолы» (от слов «экология» и «толерантность») [Лебедев, 1999; Лебедев и др., 2004]. Экотол образуется в результате разложения растительного материала под действием мико- и микробиоты, что является аналогом процесса, имеющего место в природе. Получение экотола может осуществляться как в лабораторных условиях, так и в условиях многотонного промышленного производства [Биореактор для разложения растительного сырья: пат., 1994], благодаря которому экотол способен внести ощутимый вклад в защиту агробиосистем от антропогенных воздействий и неоптимального температурного режима [Лебедев, 1999; Лебедев и др., 2004].

Использование метода пиролитической масс-спектрометрии позволило установить в экотоле наличие целого ряда характерных для него органических соединений [Лебедев, 1999, с. 68-69, 72-73]. Ароматические циклические соединения, содержащиеся в экотоле, представляют собой широкий спектр фенольных веществ, в том числе оксибензолы, аминобензолы, бензолкарбонные кислоты, бензофураны, фураны, алкилфураны, нафталины, нафталинкарбонные кислоты, алкилпирролы, пиридины, индолы, хиноны, нафтохиноны, лигнаны, лигниноподобные соединения и целый ряд циклических, бициклических и полициклических О- и N- содержащие соединения. В настоящее время фенольным соединениям отводится важная роль в защите растений от стрессовых воздействий и в целом ряде других жизненно важных функций, в том числе сигнальных [Фенольные соединения..., 2018].

Мы поставили своей **целью** продолжить изучение как самого экотола, так и его воздействия на растения при неблагоприятных климатических условиях и наличия в почве тяжелого металла свинца.

В **задачи** нашего исследования входило:

1. Установить, изменяется ли соотношение алифатических и ароматических структурных фрагментов в экотоле после длительного его хранения.
2. Определить содержание меланиновых пигментов в экотоле, обладающих антиоксидантными и фитостимулирующими свойствами.
3. Определить наличие в экотоле биогенных аминов сигнальных веществ, выполняющих роль внеклеточных и внутриклеточных регуляторов.
4. Определить в экотоле наличие фитогормонов.
5. Оценить воздействие экотола на рост и элементы структуры урожая яровой пшеницы в условиях засухи.
6. Оценить воздействие экотола на развитие саженцев древесных и культур в условиях засухи, а также при норме и избытке в почве свинца.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлся экотол, синтезированный микро- и микробиотой на основе соломы пшеницы сорта Хакасская как описано [Биореактор для разложения

растительного сырья: пат., 1994]. Солому пшеницы нарежали длиной 3-6 см, заливали водой и через отверстие в днище сосуда проводили непрерывную принудительную аэрацию воздухом с расходом 0,4-0,6 л/мин на 1 литр воды, поддерживая при этом температуру $+ 20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Окончание пенообразования и выделения CO_2 , а также отсутствие запаха, свидетельствовало о завершении процесса, который проходил примерно за 3 месяца. В результате получили жидкость без вкуса и без запаха, темно-коричневого цвета, имеющую рН 7,5 и содержащую в своем составе 2,4 г/литр сухих веществ.

Полученный биотехнологическим путем экотол хранился в условиях холодильника при температуре $+ 6-8^{\circ}\text{C}$.

В серии опытов, связанных с определением меланинов, был использован экотол длительного хранения, полученный из *Chelidonium majus* L. (чистотела), *Avena sativa* L. (овса) и *Triticum aestivum* L. (пшеницы).

Для полевого опыта по изучению воздействия экотола на рост и урожай *Triticum aestivum* в условиях засушливого лета использовался сорт Иволга.

Для полевого многолетнего опыта по выяснению воздействия экотола на древесные растения в природных климатических условиях были выбраны двухлетние саженцы *Acer platanoides* L. (клена остролистного).

Для вегетационных опытов по оценке воздействия экотола на древесные саженцы в условиях нормы и избыточных концентраций свинца в почве были взяты трехлетние растения *Fraxinus pensylvanica* (ясень пенсильванский), как наиболее устойчивый к антропогенным воздействиям вид, *Sorbus aucuparia* L. (рябина обыкновенная), которая является среднеустойчивым видом, и *Picea abies* L. (ель обыкновенная), как вид, восприимчивый к загрязняющим веществам.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение содержания ароматических и алифатических фрагментов в экотоле было осуществлено с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, как описано [Дероум, 1992].

Выделение и идентификация меланинов проводились как описано в работе [Kurchenko et al., 2006]. Для удаления липидов лиофильно высушенные образцы экотолов обрабатывали смесью гексан – изопропанол (1:1) при соотношении субстрат-растворитель 1:10 в течение 24 ч, и фильтровали через целлюлозную мембрану с порами 0,45 микрон (Agilent, США). Остатки смеси растворителей удаляли на роторном испарителе при температуре 30°C . Экстракцию пигментов проводили из обезжиренного сырья 0,1н NaOH при $45 - 50^{\circ}\text{C}$ в течение 2 ч, твердый остаток отделяли фильтрованием через целлюлозную мембрану с порами 0,45 микрон. Полученный фильтрат подкисляли 1н HCl до рН 1,5, в результате чего пигмент образовывал хлопьевидный осадок, который отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 10 000 g и растворяли в 0,1н NaOH. Процедуру кислотного переосаждения проводили трижды, после чего полученный осадок растворяли в 0,01н NaOH и диализовали против воды до нейтральной рН. Полученный препарат сушили на лиофильной установке «Heto-Holten» (Дания).

Идентификация выделенных пигментов проводилась по традиционной схеме, включающей комплексное исследование их растворимости, качественных реакций на хиноны и фенолы, элементного состава, спектральных свойств.

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе марки «Cary 50 Bio» (Австралия) с использованием кварцевых кювет ($l = 1\text{ см}$).

Содержание О рассчитывали по разности между массой беззольной навески и суммарным содержанием С, Н, N, выраженным в весовых процентах.

Важными характеристиками, определяющими физико-химические свойства, исследуемых образцов, являются их парамагнитные свойства. Исследования электронного парамагнетизма осуществляли на спектрометре «Varian E-112» (США). Содержание парамагнитных центров (ПМЦ) определяли методом сравнения с аттестованным образцом угольного порошка с известным содержанием центров. Для расчета g-факторов использовали в качестве эталона Mn^{2+} в порошке MgO .

Определение содержания биогенных аминов, их предшественников и продуктов окислительного дезаминирования в экотоле осуществляли в НИИ фармакологии имени В.В. Зукосова РАМН методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электродетекцией на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125. В эксперименте использовали лиофильно высушенный экотол, 100 мг которого растворяли в 1 мл H_2O . Изучаемые вещества разделяли на термостатируемой при 25 °С обращенно-фазовой колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм, размер частиц 3 мкм («Dr.Majsch GMBH», «Элсико», Москва). Скорость элюции подвижной фазы – 1,0 мл/мин, давление 2,0 атм. Мобильная фаза содержала 0,1 М цитратно-фосфатный буфер с 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9 % ацетонитрила (pH 3,0). Измерения проводили на стеклоугольном электроде (+ 0,85V) против Ag/Ag Cl электрода. Фиксируемая прибором интенсивность измеряемого электрического тока, возникающего при контакте анализируемого вещества с поверхностью рабочего стеклоугольного электрода, сопоставлялась затем со стандартными растворами анализируемых веществ в заданных концентрациях. Стандартные растворы биогенных аминов и их предшественников были предоставлены нам д.б.н. А.В. Олескиным. Величины концентраций моноаминов в опытных образцах рассчитывали, исходя из отношений высот пиков в стандартной смеси и в исследуемом образце [Маликина и др., 2010; Шишов, 2010; Фитискина, 2017б].

Выделение и идентификацию гормонов осуществляли в лаборатории физиологии растений Уфимского биологии УФИЦ РАН, Уфа. Фитогормоны экстрагировали согласно работам [Veselov et al., 1992; Vysotskaya et al., 2008]. Содержание индолил-3-уксусной кислоты и абсцизовой кислоты определяли с помощью иммуноферментного анализа в соответствующих тест-системах. Содержание цитокининов определяли с помощью тонкослойной хроматографии, также с последующим иммуноанализом [Kudoyarova et al., 2014].

Перед проведением биохимических анализов экотол лиофильно высушивали.

Для решения задач, связанных с изучением воздействия экотола на растения, были использованы полевой и вегетационный методы, применяемые в физиологии растений. При этом, учитывались ростовые параметры растений. В случае работы с яровой пшеницей учитывали также элементы структуры урожая: количество зерен в колосе и их вес. Семена яровой пшеницы сорта Иволга были высажены в почву без предварительной обработки экотолом. Первый полив экотолом провели через 3 недели после посева семян, перед колошением. Повторно, растения поливались экотолом через неделю. При первом поливе экотол разводился в 5 раз, при втором – в 2 раза. Общий расход экотола при первой обработке равнялся 0,5 л/м², в случае повторной обработки – 1,5 л/м². Опытный вариант имел свой контроль, который в тех же объемах обрабатывался водой. Полевые опыты по

изучению влияния экотола на рост и урожайность растений пшеницы проводили в 2014 году с неоптимальным температурным режимом. Так, в первые шесть дней июня 2014 г. было установлено два температурных максимума, превысивших температурные рекорды более чем за 100-летнюю практику метеорологических наблюдений, а в середине июня наблюдались заморозки, повторяющиеся в среднем один раз в 20 лет. Также отличительной чертой июня стали порывистые ветры. Количество выпавших в июле осадков составило 5 % от климатической нормы (для сравнения в июле 2010 года количество выпавших осадков составило 13 % от нормы), в результате чего этот месяц стал самым сухим за всю историю метеонаблюдений. Средняя суточная температура июля превысила норму на 3 °С, при этом в последнюю неделю в Московском регионе наблюдался сухой. Данный температурный режим отмечается в столице примерно один раз в 10 лет. Средняя месячная температура августа превысила обычную на 2,8 °С, при этом осадков выпало чуть больше месячной нормы – 106 % или 82 мм [Гидрометцентр России [Сайт]: Новости, 2018].

Для выяснения воздействия экотола на двухлетние древесные саженцы *A. platanoides* в начале и середине летних сезонов 2008 и 2009 гг. половина растений поливалась неразбавленным экотолом вокруг стебля (опытный вариант), другая водой (контрольный вариант) в количестве 5 мл (1 мл экотола содержал 2,4 мг сухого вещества). В 2010 г. растения экотолом не обрабатывались. Характеристики, связанные с ростом растений, регистрировались с августа 2008 г. по май 2012 г.

При работе с древесными саженцами помимо ростовых параметров в условиях засухи нас интересовало влияние экотола на подвижность свинца в почвах, на которых произрастали древесные саженцы различной устойчивости к тяжелым металлам.

Определение валового содержания (ВС) и доступной для растений подвижной формы (ПФ) свинца в образцах почв проводили с помощью атомно-абсорбционного метода на спектрометре с источником непрерывного спектра ContrAA 300 (Analytik Jena AG, Германия). Для определения валового содержания свинца (Pb), навеску почвы массой 0,5 г помещали в термостойкий стакан и заливали 20 мл смеси концентрированных азотной и соляной кислот в соотношении 1:3. Далее закрытый стакан с полученной смесью устанавливали в микроволновую печь на 20 мин при мощности 1200 Вт. После разложения, содержимое стакана количественно переносили в мерную колбу на 100 мл. При этом объем доводился дистиллированной водой до метки. Полученный образец помещали в прибор для дальнейшего анализа. Определение подвижных форм свинца (Pb^{2+}) в почвах производили в вытяжке с ацетатно-аммонийным буфером (ААБ), pH 4,8. Соотношение почвы к экстрагенту (буферу) брали равным 1:10. Образец встряхивали в течение 1 ч на ротаторе. После чего он профильтровывался и поступал на анализ. Серии эталонных растворов определяемого элемента готовили из химически чистой соли свинца – $Pb(NO_3)_2$.

Для сравнительной характеристики корневых систем исследуемых вариантов древесных саженцев в конце вегетационного периода их корневые системы были полностью изъятые из вегетационных сосудов, промыты проточной водой и заспиртованы для последующего анализа. Подробно методика работы с микоризированными корневыми системами описана в работе [Фитискина, 2017а].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы Microsoft® Excel 2007. В работе рассчитывали среднее арифметическое значение (M) и среднюю ошибку средней арифметической величины (m), ($M \pm m$). Повторность измерений – пятикратная.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Ароматические и алифатические фрагменты экотола после его длительного хранения

Поскольку в результате 7-летнего хранения экотола, полученного на основе соломы пшеницы, усиливалась его цветность и наблюдалось образование темно-коричневого осадка, мы предположили в процессе хранения экотола возможность изменения соотношения ароматических и алифатических фрагментов.

Ароматические и алифатические структурные фрагменты в исходном экотоле из соломы пшеницы были изучены с помощью метода пиролитической масс-спектрометрии [Лебедев, 1999], который выявил, что алифатические соединения составляют 93,3 %, а на долю ароматических соединений приходится ~ 6,5 %. Нас интересовало, будет ли изменяться соотношение алифатических и ароматических фрагментов экотола после его длительного хранения в жидком виде в течение 7 лет. Для данного опыта темно-коричневый осадок и оставшаяся в экотоле надосадочная жидкость были отделены друг от друга и лиофильно высушены.

Процентное содержание ароматических и алифатических фрагментов в экотоле представлено в таблице 1, из которой следует, что содержание $CH_{ар}$ в образцах с разным соотношением надосадочной жидкости к осадку мало различается и составляет 13-15 %, а содержание $CH_{алк-О}$ варьирует от 43 до 49 %. Уровень $CH_{алк}$ варьирует в большей степени: от 44 % в образце № 1, где соотношение надосадочной жидкости к осадку составляло 3:1, до 36 % в образце № 2, где это соотношение составляло 1:3.

Таблица 1. Содержание атомов водорода различных фрагментов в экотоле из соломы пшеницы длительного хранения, полученные в условиях регистрации спектра ЯМР 1H *

№ образца	Образцы		Содержание фрагментов**, %		
	Соотношение надосадочной жидкости к осадку	Цветность, дисперсность	$CH_{ар}$	$CH_{алк-О}$	$CH_{алк}$
№ 1	3:1	Светло-желтый, мелкодисперсный	13	43	44
№ 2	1:3	Коричневый, крупнодисперсный	15	49	36

*режим регистрации спектра ЯМР 1H – без устранения остаточных сигналов протонов воды;

** $CH_{ар}$ – протоны ароматических и гетероароматических фрагментов; $CH_{алк-О}$ – протоны алифатических фрагментов, соединённых с атомом О; $CH_{алк}$ – протоны алифатических фрагментов, соединённых с атомами C/N.

Поскольку содержание алифатических и ароматических фрагментов исходного экотола, проанализированного ранее с помощью метода пиролитической масс-спектрометрии [Лебедев, 1999], и экотола, хранившегося в течение 7 лет, проанализированного методом ЯМР-спектроскопии, представлены в процентах, мы посчитали возможным провести их сопоставление. Оно показало, что при длительном хранении экотола имеет место незначительное уменьшение процентного содержания алифатических фрагментов в среднем на 7 % (сумма $CH_{алк-О}$ и $CH_{алк}$, длительно

хранившегося экотола, составляет ~ 86%; в исходном экотоле – 93 %). Количество ароматических соединений, представленных в экотоле, хранившемся 7 лет, составляет в среднем 14 %, а в исходном – 6,5 %, т.е. в течение 7-летнего хранения экотола ароматических соединений становится ~ на 7 % больше. Результаты сравнения свидетельствует о том, что на протяжении длительного времени хранения состояние экотола остается стабильным.

2. Содержание меланинов в экотоле из различных источников сырья.

Меланины имеют высокую физиологическую активность, которая проявляется в антиоксидантных, антипротекторных, фотопротекторных, генопротекторных, а также в фитостимулирующих свойствах [Goncalves, Pombeiro-Sponchiado, 2005; Тоноян и др., 2010; Азарян, Мелконян, 2014; Гесслер и др., 2014]. Для меланинов характерны группы, содержащие подвижный протон: -COOH; -OH; -SO₃H и нейтральные электронодонорные группы: R₂CO; R₃PO; R₃N, участвующие в образовании комплексов меланина с ионами тяжелых металлов, что значительно снижает их доступность для организмов.

Мы предположили, что экотол, образующийся при аэробной биотехнологической конверсии соломы в результате деятельности грибов и бактерий, содержит меланины, тем более, что для экотола характерно коричневое окрашивание разной степени интенсивности [Лебедев и др., 2004] и сроков хранения экотола. Такое окрашивание характерно для группы высокомолекулярных нерастворимых или малорастворимых меланиновых пигментов, образующихся в результате ферментативного окисления, аутоокисления и поликонденсации простых фенольных предшественников [Kurchenko et al., 2006].

Таблица 2. Содержание меланинов в экотолах, отличающихся сроками хранения и источниками биомассы

Номер образца	Источник биомассы	Окрашивание экотола	Выход меланина, %
1	Солома <i>Triticum aestivum</i> – пшеницы*	Коричневое	2,5
2	Надземная часть <i>Chelidonium majus</i> – чистотела**	Желто-коричневое	1,5
3	Надземная часть <i>A. sativa</i> – овса**	Желто-коричневое	1,7
4	Солома <i>Triticum</i> – пшеницы**	Темно-коричневое	3,2

*Экотол, полученный в год анализа.

**Экотол, хранившийся в течение 7 лет, из коллекции Н.Г. Лебедевой.

Из таблицы 2 следует, что во всех проанализированных образцах экотола, полученного из различного растительного сырья, были обнаружены меланины.

Одним из критериев отнесения пигментов к меланинам является их неспособность растворяться в органических растворителях в сочетании с растворимостью в щелочных растворах. Экстрагированные пигменты не растворялись в большинстве органических растворителей: этаноле, изопропанол, гексане, петролейном эфире, но растворялись в диметилформамиде, концентрированных азотной и серной кислотах и щелочных растворах.

Спектры поглощения пигментов имели вид пологих кривых с постепенным уменьшением оптических плотностей по мере возрастания длин волн от 200 до 600 нм, что характерно для всех меланинов независимо от происхождения.

Данные по элементному составу позволили оценить простейшие структурные параметры – атомные соотношения элементов. В исследуемых образцах содержание N

колебалось от 0,79 % до 2,23 %, содержание С от 16,15 % до 29,14 %, Н от 2,16 % до 4,23 %. Содержание О составляло от 19,82 % до 35,6 %. Коэффициент Н/С был рассчитан из соотношения атомных процентов и колебался от 0,093 % до 0,145 %.

Качественные реакции показали, что водные растворы пигментов обесцвечивались H_2O_2 , а в присутствии $KMnO_4$ изменяли окраску с коричневой на зеленую с последующим выпадением осадка. Добавление $FeCl_3$ приводило к выпадению осадка, который растворялся в присутствии избытка $FeCl_3$. Такое поведение исследуемых пигментов характерно для меланинов и свидетельствует о присутствии в их структуре хиноидных и фенольных компонентов.

При идентификации анализируемого материала основное внимание уделяли его парамагнитным свойствам, которые представляют собой специфическую особенность меланинов как природных полимеров, содержащих развитые системы сопряженных связей. Наличие неспаренных электронов в высокомолекулярных природных соединениях оказывает существенное влияние на многие их свойства – растворимость, электропроводность, обменную емкость, химическую реакционную способность и биологическую активность. В наших образцах экотолы содержание парамагнитных центров составляло от $2,6 \times 10^{16}$ спин/г до $8,9 \times 10^{16}$ спин/г. Эти данные согласуются с результатами, приведенными в сообщениях других авторов для грибных, животных, растительных и синтетических меланинов [Kurchenko et al., 2006].

Меланины при биотехнологической конверсии растительного сырья могли поступать в культуральную среду из находящихся в ней микроорганизмов. Так в культуральной среде были обнаружены грибы рода *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, а также бактерии рода *Bacillus*, некоторые штаммы которых могут являться продуцентами меланиновых пигментов [Лебедев и др., 2004; Гесслер и др., 2014].

На основе проведенного анализа элементного состава и парамагнитных свойств меланины, содержащиеся в образцах экотолы, наиболее вероятно отнести к эумеланинам – азотосодержащим гетерополимерам (в наших образцах содержание азота колеблется от 0,76 % до 2,23 %), биополимерам индолил-5,6-хинона с включением пиррольных и ДОФА-хиноновых фрагментов.

Это нашло также подтверждение при установлении нами наличия в экотолы биогенных аминов, их предшественников и продуктов окислительного дезаминирования, содержащих в своем составе целый ряд однотипных с меланиновыми пигментами фрагментов, таких как триптофан, диоксифенилаланин и др.

3. Биогенные амины, их предшественники и продукты окислительного дезаминирования в экотолы.

В организмах биогенные амины, их предшественники и продукты окислительного дезаминирования выполняют также различные физиологически важные функции, в том числе участвуют в ответе на стрессовые факторы [Маликина и др., 2010].

Биогенные амины (БА), обнаруженные нами в экотолы: дофамин (ДА), норадреналин (НА), 5 – гидрокситриптамиин – серотонин (5-ГТ); их предшественники: диоксифенилаланин (ДОФА), 5 – гидрокситриптофан (5-ГТР) и продукты окислительного дезаминирования: дигидроксифенилуксусная кислота (ДГФУК), гомованилиновая кислота (ГВК), 5 – гидроксииндолукусусная кислота (5-ГИУК) (табл. 3).

Таблица 3. Биогенные амины, их предшественники и продукты окислительного дезаминирования в экотоле, полученного из соломы пшеницы (наномоль/л)

Биогенные амины (БА)			Предшественники БА		Продукты окислительного дезаминирования БА		
ДА	НА	5-ГТ	ДОФА	5-ГТР	ДФУК	ГВК	5-ГИУК
295,87	56,89	12,55	569,84	8,61	49,56	14,18	292,94

Как видно из таблицы 3 из числа биогенных аминов, присутствующих в экотоле из соломы пшеницы, наибольшее количество приходится на долю дофамина (ДА) и его предшественника ДОФА. Известно, что ДОФА, как правило, сопутствует фенольным полимерам – меланинам [Кретович, 1971].

Биогенные амины, их предшественники могли быть привнесены в экотол бактериями из рода *Bacillus*, доминирующими в первые 10-15 дней при разложении пшеничной соломы [Лебедев, 1999]. Для данных бактерий характерно наличие биогенных аминов и их предшественников как в самой культуре, так и в культуральной жидкости [Шишов, 2010]. Приведенный материал еще раз подчеркивает, что при образовании экотола в него поступают не только продукты деструкции исходных веществ растительного происхождения, но и вещества, синтезируемые *de novo* мико- и микробиотой.

Обнаружение в экотоле биогенных аминов, их предшественников и продуктов окислительного дезаминирования, обосновывает важное значение его практического использования, поскольку данные вещества могут включаться в обменные процессы не только отдельных организмов, но и целых систем: почва – мико- и микробиота – растения, что, в свою очередь, должно благоприятно сказываться на росте и развитии растений, в том числе при неблагоприятных условиях среды.

4. Содержание гормонов в экотоле.

В экотоле, полученном из соломы пшеницы, определялось содержание индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), абсцизовой кислоты (АБК), цитокининов: изопентениладенозина (ИПА), изопентениладенина (ИП), зеатина (Z), зиатин рибозида (ZR) (табл. 4).

Таблица 4. Содержание гормонов в экотоле из соломы пшеницы (нг/г сухой массы экотола)

ИУК	АБК	ИПА	ИП	Z	ZR
441	19	7	16	12	4

Данные таблицы наглядно демонстрируют, что из проанализированных гормонов в экотоле существенное содержание приходится только на ИУК. Количество остальных проанализированных гормонов находится на грани чувствительности метода и не может играть существенной роли в действиях на растения.

Наличие в экотоле ИУК согласуется с представлением о том, что при аэробном разложении растительной биомассы мико- и микробиотой активируются декарбоксилазы аминокислот. Процесс декарбоксилирования аминокислот сопровождается выделением углекислого газа и синтезом новых аминокислот, а также различных активных соединений, в том числе индола, способным снова вовлекаться в синтетические процессы, катализируемые ферментами, содержащимися в грибах и бактериях. Синтез β -индолилуксусной кислоты из триптофана при диссимиляции белков и аминокислот известен давно [Кретович, 1971]. Кроме того, было установлено, что в начальный период, равный 10-15 дням, при разложении

растительной массы в культуральной среде наряду с бактериями из родов *Pseudomonas* и *Bacillus* преобладают дрожжи из рода *Lipomyces* [Лебедев, 1999, с. 27]. В настоящее время эти бактерии и дрожжи рассматриваются как продуценты фитогормонов, в первую очередь ИУК [Стрелецкий и др., 2017; Kudoyarova et al., 2017].

Подытоживая изложенный материал, подчеркнем, что мико- и микробиота, участвующая в деградации компонентов растительного сырья, привносит в среду, в нашем случае – в экотол, целый ряд физиологически-активных соединений, обуславливающих его полифункциональные свойства, которые способны оказать воздействие на растения.

5. Влияние экотола на рост и урожайность пшеницы на фоне неоптимального температурного и водного режимов.

В опытах, проведенных в 2014 г. на растениях яровой пшеницы сорта Иволга, было показано, что растения положительно реагировали на внесение экотола (рис. 3). Это нашло отражение на результатах морфологического анализа ростовых показателей растений и урожая (табл. 5).

Рис. 3. Растения яровой пшеницы сорта Иволга (фото 23.07.2014 г.):
1 – обработанные экотолом, 2 – не обработанные экотолом

Таблица 5. Величина верхнего междоузлия, высота всего растения, длина листовой пластинки**, озерненность колоса и масса 1000 зерен

Вариант	Высота растения		Длина междоузлия		Длина листовой пластинки		Длина колоса		Число зерен в колосе		Масса 1000 зерен	
	См	%	см	%	см	%	см	%	шт.	%	г	%
Контроль	64,8 ±8,6	100	15,9 ±2,7	100	20,7 ±3,8	100	8,8 ±1,3	100	41,4 ±7,3	100	19,321	100
Экотол	80,7* ±5,7	125	20* ±2,2	126	27,6* ±5,2	133	11,2* ±1,2	127	65,4* ±11,7	158	31,343	162

* отмечены статистически значимые отличия от значений контрольного варианта при $p = 0,05$.

** учитывалась длина верхнего листа.

Из таблицы видно, что по всем учтенным в работе ростовым параметрам растения, обработанные экотолом, превосходили контрольный вариант. Вес 1000 зерен и их число в колосе в варианте с обработкой экотолом в 1,6 раза превосходили контрольный вариант.

Вероятно, что усиление ростовых процессов и увеличение урожайности пшеницы при аномально повышенных и пониженных температурах, характерных для лета 2014 г., связано с наличием в экотоле меланинов [Goncalves, Pombeiro-Sponchiado, 2005; Тоноян и др., 2010; Азарян, Мелконян, 2014; Гесслер, Егорова, Белозерская, 2014; Kurchenko et al., 2006; Tarangini, Mishra, 2014]. Повышению устойчивости растений и активации их роста могло также способствовать присутствие в экотоле ауксина, который, как известно, положительно влияет на эти процессы, что было показано в экспериментах с продуцирующими ауксины микроорганизмами (Kudoyarova et al., 2017) Ауксины выполняют большое количество разнообразных физиологических функций, активно участвуют в ростовых процессах растений [Медведев, 2004, с. 186; Woodward, Bartel, 2005].

Присутствующие в экотоле активных компонентов приводит к усилению ростовых процессов пшеницы и благоприятно сказывается на ее урожае, показателями которого являются число зерен в колосе и масса 1000 зерен. После обработки растений экотолом колосья выглядят крупнее и более плотными. Щуплость зерна не отмечалась (рис. 4).

Рис. 4. Колосья яровой пшеницы растений второго варианта.

Обозначения: 1 – обработанные экотолом; 2 – не обработанные экотолом

Стоит отметить, что период роста и развития яровой пшеницы – лето 2014 года вошло в историю, как одно из самых жарких за весь период регулярных метеорологических наблюдений на Северном полушарии планеты. Приведенный материал демонстрирует, что аномальные условия летнего сезона 2014 г. меньше сказались на растениях, обработанных экотолом.

6. Воздействие экотола на древесные растения в условиях засухи на примере саженцев *A. platanoides*

В 2008 г. обработанные экотолом клены по ростовым параметрам, так же как и в 2009 г., не отличались от контрольных растений (рис. 5.1).

Рис. 5.1. Клен остролистный. Июль 2008 год:

1 – Растения, не обработанные экотолом; 2 – Растения, обработанные экотолом

Различия в ростовых параметрах проявились в сентябре 2010 г., после засушливого лета (количество выпавших осадков за июль – 12 мм, при норме 90 мм) и нехарактерной тогда для Москвы и области жары (среднемесячная температура июля по данным наблюдений составила 26,0 °С при норме – 18,4 °С [Климатический монитор [Сайт]: Июль 2010 года, 2013]. Саженцы, ранее обработанные экотолом, стали в среднем на 30 см выше и имели в 1,3 раза большее число листьев, чем контрольный вариант (рис. 5.2).

Рис. 5.2. Клен остролистный. Сентябрь 2010 год:

1 – Растения, не обработанные экотолом; 2 – Растения, обработанные экотолом

Преимущество в росте кленов, обработанных экотолом, сохранялось до конца эксперимента – май 2012 г. Так, средняя высота контрольной группы кленов составляла $107 \pm 15,7$ см, а кленов, обработанных экотолом – $147 \pm 12,3$ см, при этом средний диаметр стволов равнялся $3,6 \pm 0,5$ см, а у кленов, обработанных экотолом – $4,9 \pm 0,7$ см.

Так же, как и в опытах с яровой пшеницей сорта Иволга, стимуляция роста и развития растений, а также повышение их устойчивости к неблагоприятным условиям среды, включая засуху, могли происходить за счет наличия в составе экотола меланиновых пигментов и фитогормональных веществ – ауксинов.

7. Влияние экотола на подвижность свинца в почве, на которой произрастали древесные саженцы, различной устойчивости к тяжелому металлу

Воздействие экотола на валовое содержание (ВС) и подвижные формы (ПФ) свинца в почве с избыточными дозами металла при наличии растущих на ней древесных саженцев давало возможность судить о поглощении свинца растениями. Валовое содержание свинца в почве при наличии экотола после роста на ней саженцев ясеня пенсильванского и рябины обыкновенной претерпевало незначительные изменения: $3,9 \pm 0,1$ %, где рос ясень, и $6,0 \pm 0,1$ %, где росла рябина. При наличии экотола содержание подвижных форм заметно снижалось на $42,9 \pm 0,7$ % в почве, на которой рос ясень пенсильванский, и на $36,0 \pm 0,3$ % в почве, на которой росла рябина обыкновенная по сравнению (рис. 6. А, Б). При этом за 100 % было принято валовое содержание и подвижные формы свинца в почвах, на которых произрастали не обработанные экотолом растения.

Рис. 6. Валовое содержание (ВС) и подвижные формы (ПФ) свинца в почве после роста саженцев *F. pensylvanica*, *S. aucuparia* и *P. abies*.

Примечание: избыток свинца вносился в почву в виде раствора $Pb(NO_3)_2$ в количестве 10ПДК (ПДКРb = 32 мг/кг в соответствии с ГН 2.1.7.2041-06 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве»).

При избытке свинца экотол вносился в почву в объеме 10 мл на 100 г почвы (10 мл экотола содержит 24 мг сухого вещества).

Если бы подвижные формы свинца поглощались корневой системой ясеня пенсильванского и рябины обыкновенной в присутствии экотола, то это бы сказалось на валовом содержании свинца в почве, что собственно мы наблюдали в случае роста саженцев ели обыкновенной. Очевидно, значительное снижение подвижных форм свинца в почве в присутствии древесных саженцев лиственных пород, связано с усилением под действием экотола выделений органических соединений, иммобилизующих свинец, корневой системой

этих растений и сопутствующей растениям микоризой, т.к. для вегетационных опытов отбирались древесные саженцы, находящиеся в симбиозе с микоризой.

Иная картина, отражающая снижение валового содержания и подвижных форм свинца в почве, наблюдалась под действием экотолы после роста на ней саженцев ели обыкновенной. При избыточных дозах свинца и наличии экотолы имело место снижение подвижной формы тяжелого металла на $45,8 \pm 0,3 \%$, однако при этом наблюдалось и снижение его валового содержания на $41,4 \pm 0,2\%$ (рис. 6. В).

Значительное снижение валовой формы свинца в почве наряду с подвижной формой у саженцев ели могло быть связано с усиленным переводом свинца в подвижные формы, сопровождаемое поглощением его корневой системой. Можно предполагать, что усиленное поглощение свинца корневой системой саженцев ели обыкновенной связано с воздействием экотолы на микоризу, которая, как показано, влияет на поглощение растением тяжелых металлов [Smith, Read, 2008; Фитискина, 2017a].

Обширный литературный материал по микоризному симбиозу [Smith, Read, 2008] и целый ряд других работ, позволяет утверждать, что наблюдаемое в присутствии экотолы существенное снижение подвижных форм свинца при его практически неизменном валовом содержании в почвах после роста на них саженцев ясеня пенсильванского и рябины обыкновенной связано с активацией защитных механизмов по отношению к тяжелому металлу арбускулярно-микоризным грибом, присущим листовным породам. Показано, что данный тип микоризы способен наряду с корневой системой выделять органические кислоты, хелатирующие свинец, т.е. реализуется механизм, при котором связывание тяжелого металла происходит вне растения. Снижение валового содержания и подвижных форм свинца в почвах после роста на них саженцев ели в присутствии экотолы на фоне избытка свинца приводит к активации эктомикоризных грибов, свойственных хвойным породам. Под действием гиф микоризного гриба, которые оплетают корневую систему и находятся внутри корня, вместе с гифами гриба внутрь корня, а соответственно и в растение, попадет тяжелый металл, т.е. реализуется иной механизм взаимодействия микоризы с тяжелым металлом. Данный механизм является неэффективным для защиты от тяжелого металла для хвойной древесной породы *P. abies* и делает ее восприимчивой к загрязняющим веществам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарян К.Г., Мелконян Э.А. Эффективность биопрепаратов при выращивании декоративных растений // Биологический журнал Армении. № 4 (66). 2014. С. 42-50.
2. Биореактор для разложения растительного сырья: пат. 1763478 Российская Федерация: МПК С 12 М 1/00 / Г.В. Лебедев; патентообладатель Лебедев Г.В.; заявл. 18.09.1989; опубл. 23.09.1992, Бюл. № 13, 1994. 6 с.
3. Гесслер Н.Н., Егорова А.С., Белозерская Т.А. Меланиновые пигменты грибов в экстремальных условиях существования (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 125-134. DOI: [10.7868/S0555109914020093](https://doi.org/10.7868/S0555109914020093)
4. Дероум Э. Современные методы ЯМР для химических исследований: Пер. с англ. М.: Мир, 1992. 403 с.
5. Гидрометцентр России [Сайт]: Новости. Режим доступа: <https://meteoinfo.ru/category/articles/81-climate-cat/clim-var/severnoe-polusharie/--2014-/9802-2014-105> (дата обращения: 31.07.2018).

6. Климатический монитор [Сайт]: Июль 2010 года. – Режим доступа: <http://www.pogodaiklimat.ru> (дата обращения: 18.01.2013).
7. Кретович В.Л. Основа биохимии растений. М.: Высшая школа, 1971. С. 411.
8. Лебедев Г.В. Экотолы, класс природных физиологически-активных соединений. М.: «Яхонт», 1999. 207 с.
9. Лебедев Г.В., Сабина Е.Д., Лебедева Н.Г. и др. Экотолы. Производство и применение. М.: ФГУП, ВИМИ, 2004. 116 с.
10. Маликина К.Д., Шишов В.А., Чувелев Д.И., Кудрин В.С., Олескин А.В. Регуляторная роль нейромедиаторных аминов в клетках *Saccharomyces cerevisiae* // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, № 6. С. 672-677. DOI: [10.1134/S0003683810060104](https://doi.org/10.1134/S0003683810060104)
11. Медведев С.С. Физиология растений: уч. – СПб.: Изд-во СПб. университета, 2004. 337 с.
12. Стрелецкий Р.А., Мочалкин А.В., Федотов Г.Н. Влияние дрожжей – продуцентов фитогормонов на развитие проростков *Lepidium sativum* // Современные проблемы науки и образования. № 1. 2017. С. 1-9.
13. Тоноян Л.Е., Петросян М.Т., Азарян К.Г., Попов Ю.Г. Влияние бактериального меланина на рост и развитие огурца в культуре *in vitro* и *in vivo* // Ученые записки Ереванского государственного университета. Химия и биология. № 1. 2010. С. 50-55.
14. Фенольные соединения: активность, инновации, фундаментальные и прикладные аспекты. Фенольные соединения: функциональная роль в растениях / Отв. ред. Загоскина Н.В. // Сборники научных статей X Международного симпозиума (М., 14-19 мая 2018). М.: ИФР РАН, 2018. 1 сб., 625 с. 2 сб., 443 с.
15. Фитискина Н.В. Влияние экотола на содержание свинца в хвое и корнях *Picea abies* L. и на микоризацию корневой системы // Полифункциональность воздействия экотола на древесные саженцы при неблагоприятных условиях среды: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. / Н.В. Фитискина. М., 2017а. С. 110-116.
16. Фитискина Н.В. Определение биогенных аминов, их предшественников и продуктов окислительного дезаминирования в экотоле // Полифункциональность воздействия экотола на древесные саженцы при неблагоприятных условиях среды: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. / Н.В. Фитискина. М., 2017б. С. 60-61.
17. Шишов В.А. Биогенные амины в динамике роста микроорганизмов: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03. / В.А. Шишов. М., 2010. 122 с.
18. Goncalves R., Pombeiro-Sponchiado S. Antioxidant Activity of the Melanin Pigment Extracted from *Aspergillus nidulans* // Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2005. 28. 1129-1131. DOI: [10.1248/bpb.28.1129](https://doi.org/10.1248/bpb.28.1129)
19. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R. et al. 2014. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) // Journal of Experimental Botany. 2014. V. 65. P. 2287–2294. doi: [10.1093/jxb/eru113](https://doi.org/10.1093/jxb/eru113)
20. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzmina L.Y., Galimsyanova N.F., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A.I., Veselov S.Yu. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants // Acta Physiol Plant. 2017. 39: 253. DOI: [10.1007/s11738-017-2556-9](https://doi.org/10.1007/s11738-017-2556-9).
21. Kurchenko V.P., Kukulyanskaya T.A., Azarko I.I., Zueva O.Yu., Khizmatullin R.G., Varlamov V.P. Physicochemical properties of chitin–melanin and melanoprotein complexes

- from bee corpses // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006. Vol. 42. No. 3. Pp. 331–334. DOI: [10.1134/S0003683806030197](https://doi.org/10.1134/S0003683806030197)
22. Smith S., Read D. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition. Elsevier Academic Press. 2008. Hardcover ISBN: 9780123705266. 800 p. DOI: [10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6)
23. Tester M., Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world // *Science*. 2010. V. 12. P. 327. P.818-822. DOI: [10.1126/science.1183700](https://doi.org/10.1126/science.1183700)
24. Tarangini K., Mishra S. Production of melanin by soil microbial isolate on fruit waste extract: two step optimization of key parameters // *Biotechnol Rep (Amst)*. 2014. V. 4: 139–146. DOI: [10.1016/j.btre.2014.10.001](https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.001)
25. Veselov S., Kudoyarova G., Egutkin N., Gyuli-Zade V., Mustafma A., Kof E. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // *Physiol. Plantarum*. 1992. V. 86. P. 93-96. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1992.tb01316.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb01316.x)
26. Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Kudoyarova G.R. Absciscic acid accumulation in the roots of nutrient-limited plants: its impact on the differential growth of roots and shoots // *Journal of Plant Physiology*. 2008. V. 165. P. 1274–1279. DOI: [10.1016/j.jplph.2007.08.014](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.08.014)
27. Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot*. 2005. V. 95 (5). P. 707-735. DOI: [10.1093/aob/mci083](https://doi.org/10.1093/aob/mci083)