

ОЦІНКА ЕКОЛОГІЧНОГО СТАНУ ДОВКІЛЛЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ КУЛЬТУР БАЗИДИОМІЦЕТІВ

О.В. Чайка, аспірант*

О.В. Федотов, кандидат біологічних наук
Донецький національний університет

Запропоновано тест-систему, яка базується на культивуванні мікологічного тест-об'єкта в чітко визначених умовах, що відрізняються лише за одним фактором – рослинним субстратом з еталонних (чистих) та техногенно трансформованих середовищ із подальшим визначенням і порівнянням показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи тест-культури. За допомогою тест-системи проведено біотестування 4 різних за екологічними умовами локацій.

Вступ. Сучасний стан забруднення навколишнього середовища характеризується появою нових, стійких до біодеградації поллютантів та джерел їх надходження [7]. У результаті набуває актуальності розробка та вдосконалення способів тестування стану довкілля. Основною вимогою до таких способів є не стільки аналіз наявності тих чи інших речовин, як виявлення в інтегральній формі ступеня та інтенсивності їх комплексного впливу на біоту. Саме цим вимогам відповідають біологічні методи індикації та моніторингу екологічного стану довкілля [11, 12, 13].

Доведено можливість використання в якості біоіндикаторів організмів з різних систематичних груп [9, 17, 20]. Індикаторні властивості грибів та їх практичне застосування інтенсивно вивчаються фахівцями різних галузей [6, 21].

Дереворуйнівні гриби – ксилотрофи – є найважливішою функціональною ланкою сталих лісових екосистем, пройшли тривалу коеволюцію, через що виявляють високу чутливість до змін умов середовища [1].

Індикаторні властивості біологічних об'єктів можуть виявлятися на різних рівнях організації біоти – хімічному, морфологічному, фізіологічному, ценотичному [1, 13]. В цьому відношенні перспективним є дослідження прооксидантно-антиоксидантної системи тест-організмів. Відомо, що система активації та інгібування процесів вільнорадикального окиснення є однією з найважливіших і найчутливіших складових гомеостазу аеробних організмів. У рамках цієї взаємодії антиоксиданти підтримують необхідний рівень вільнорадикальних процесів, які є ланкою багатьох метаболічних

*Науковий керівник - кандидат біологічних наук О.В. Федотов.

процесів і виконують найважливіші регуляторні функції [3, 23]. Динамічна рівновага в системі окиснення-антиокиснення визначає фізіологічний стан і стійкість метаболічних процесів організму. Водночас вона характеризує і впливає на здатність організму до адаптації, визначає можливість розвитку патологічних змін, оскільки її порушення є однією з перших неспецифічних ланок у розвитку стрес-реакції на фактори довкілля і є тригером інших механізмів захисту [2, 5, 8]. Отже, надзвичайна чутливість рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи відкриває перспективи використання її в багатьох напрямках, зокрема в біоіндикації та біотестуванні стану довкілля.

Мета даної роботи – розробка способу та оцінка екологічного стану довкілля з використанням прооксидантно-антиоксидантної активності культур базидіомицетів.

Матеріали та методи дослідження.

Тест-об'єкт. Матеріал дослідження – міцелій та культуральний фільтрат (КФ) тест-культури штаму ксилотрофного базидіомицету *Pleurotus eryngii* (DC.) Quel. Р-ег. Штам Р-ег відібрано в попередніх скринінгових дослідженнях за рівнем процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), для нього розроблено живильне середовище і спосіб глибинного культивування [15, 19].

Штам Р-ег культивували в два етапи на модифікованому глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) наступного складу: глюкоза – 7,5 г; лігносульфонат – 5,0 г; пептон – 4,0 г; Твін-80 – 1,0 г; розчин мінеральних елементів Кірка [22] – 70 мл; KH_2PO_4 – 0,6 г; K_2HPO_4 – 0,4 г; дистильована вода – до 1 л. Водневий показник середовища становив 6,60 од. На першому етапі отримували 7-денну чисту гомогенну посівну культуру штаму *P. eryngii* Р-ег. Процедури стерилізації, іноку-

ляції, культивування та контролю чистоти інокулюму проводили згідно розробки [14]. На другому етапі – у тест-системі, де глюкозу в ГПС було замінено на рослинний субстрат у кількості, еквівалентній за вмістом вуглецю в глюкозі. ГПС інокулювали 10% за об'ємом посівною культурою штаму. Термін культивування глибинним методом складав 6 діб. Після закінчення терміну культивування, міцелій відділяли від культуральної рідини за допомогою щільної капронової тканини, таким чином отримуючи КФ. Після цього міцелій при $+3\pm 2^\circ\text{C}$ тричі промивали дистильованою водою та підсушували фільтрувальним папером.

Частину міцелію використовували для приготування водної витяжки, гомогенізуючи його за $+3-2^\circ\text{C}$. Залишок міцелію зважували у відкаліброваних бюксах і висушували при 105°C до постійної маси. Визначали абсолютно суху біомасу (АСБ) для встановлення вологості міцелію та перерахунку вмісту продуктів ПОЛ на суху масу.

Рослинний субстрат. В якості рослинного субстрату для ГПС у тест-системі використовували листя клена ясенепolistого (*Acer negundo* L.), широко розповсюдженого в регіоні досліджень інвазійного виду. Листки збирали у другій частині вегетації, після завершення активного росту і до початку листопаду. Для досліду обирали окремо стоячі середньовікові рослини, що ростуть у схожих за рівнем освітленості, вологості, ґрунтом, рельєфом тощо умовах. Збір матеріалу проводили в суху погоду. Для досліджень зривали 3–4-ті листки однорічного приросту бічних гілок на рівні піднятої руки із максимальної кількості доступних гілок по всьому периметру крони (з південної, північної, східної та західної частин). Листки відбирали одного, середнього розміру, здорові, неушкоджені, без значного забруднення, ознак хло-



розу чи обприскування хімікатами. Збір матеріалу проводили з 8–10 дерев у кожній точці для отримання середньозмішаної проби.

Поверхню досліджуваних листків обережно очищали і промивали дистильованою водою. Матеріал просушували спочатку за кімнатної температури, потім – у сушильній шафі за $50 \pm 5^\circ\text{C}$ до постійної ваги. Сухий субстрат гомогенізували до стану муки і використовували як компонент ГПС.

Методи визначення стану прооксидантно-антиоксидантної системи. Інтенсивність процесів ліпідної пероксидації визначали модифікованим методом за вмістом продуктів ПОЛ, активних до тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [18]. Для встановлення рівня самочинної інтенсивності процесів ПОЛ (ПОЛсі) 1,5 мл водної витяжки міцелію відбирали в пробірку. В контрольній пробі використовували дистильовану воду; в пробі з культуральним фільтратом – 0,5 мл КФ. Подальша обробка контрольної проби та проби з КФ проходила так само, як і дослідної з міцелієм. Додавали розчини трихлороцтової кислоти (ТХО) та ТБК до кінцевих концентрацій в реакційній суміші – 0,61 та 0,37 моль/л відповідно; ретельно перемішували, переносили в центрифужну пробірку та кип'ятили протягом 15 хв на водяній бані. Після інкубації проби швидко охолоджували до кімнатної температури і центрифугували 15 хв за 3000 об/хв. Відбирали супернатант у сухі пробірки. Екстинкції дослідної проби вимірювали проти контрольної на спектрофотометрі при довжинах хвиль 532 нм і 590 нм. Розрахунок ПОЛсі (A_c) проводили за формулою:

$$A_c = \frac{(E_{532} - E_{590}) \cdot 10^6 \cdot V \cdot K}{1,56 \cdot 10^5 \cdot P}, \quad (1)$$

де E_{532} і E_{590} – показники екстинкції дослідної проби при 532 і 590 нм; 10^6 – фактор розмірностей; V – об'єм реакцій-

ної суміші (мл); K – коефіцієнт перерахунку на абсолютно суху масу міцелію (для КФ – не враховується); $1,56 \cdot 10^5$ – молярний коефіцієнт екстинкції; P – кількість матеріалу – сирого міцелію (г) чи КФ (мл). Вміст ТБК-АП виражали в нмоль/г АСБ міцелію (мл КФ).

Визначення рівня індукованої інтенсивності процесів ПОЛ (ПОЛіі) мікологічного матеріалу проводили таким чином. Для створення умов індукції ПОЛ використовували інкубацію мікологічного матеріалу з розчинами сірчаноокислого заліза та аскорбінової кислоти. Для цього до встановленої кількості мікологічного матеріалу додавали $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчин сірчаноокислого заліза та $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л аскорбінової кислоти. Інкубацію проводили за 40°C протягом 90 хв. Потім визначали вміст продуктів ПОЛ у пробі аналогічно до встановлення рівня самочинної інтенсивності процесів ПОЛ.

Загальну антиоксидантну активність (АОА) мікологічного матеріалу оцінювали за інтенсивністю гальмування накопичення продуктів перекисного окиснення і визначали за допомогою моделі перекисного окиснення ліпідів – реакції окиснення Твін-80 киснем повітря [16]. Для цього до підготовленого мікологічного матеріалу додавали $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчин сірчаноокислого заліза, $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л аскорбінової кислоти та 1% водний розчин Твін-80. У контрольний розчин замість мікологічного матеріалу вносили дистильовану воду. Інкубацію проводили в герметичних ємностях об'ємом 100 мл за температури 40°C протягом 24 год. Далі проводили визначення продуктів ПОЛ у реакційній суміші аналогічно до встановлення рівня самочинної інтенсивності процесів ПОЛ. АОА розраховували за формулою [16]:

$$AOA = \frac{A_k - A_d}{A_k}, \quad (2)$$

де A_k , A_d – вміст ТБК-АП в контрольному і дослідному зразках відповідно.

За отриманими даними розраховували показник прооксидантної активності (ПОА), який характеризує активність прооксидантної складової прооксидантно-антиоксидантної системи за формулою:

$$ПОА = \frac{A_c}{A_i}, \quad (3)$$

де A_c – самочинна інтенсивність ПОЛ, що оцінюється за вмістом ТБК-АП, A_i – індукована активність ПОЛ проби.

Показник резерву субстратів перекисного окиснення (СПО), зокрема поліненасичених жирних кислот, вказує на можливість індукції ПОЛ за умов дії факторів середовища і певною мірою характеризує стан антиоксидантної системи. СПО розраховували за формулою:

$$СПО = \frac{A_i - A_c}{A_i} \cdot 100\%. \quad (4)$$

Коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи (КРПАС) розраховували за формулою:

$$K_{РПАС} = \frac{АОА}{ПОА}. \quad (5)$$

При переважанні прооксидантних процесів значення КРПАС знижується до 0 і може набувати від'ємних значень. В іншому випадку показник КРПАС є більш високим.

Досліди проводились у 3-кратній повторності. Отримані експериментальні дані оброблялись за допомогою програм для статистичної обробки результатів біологічних експериментів.

Результати та їх обговорення. Для оцінки екологічного стану довкілля запропоновано тест-систему, яка базується на культивуванні конкретного тест-об'єкта в чітко визначених умовах, що відрізняються лише за одним фактором – рослинним субстратом з еталонних (чистих) та техногенно трансформованих середовищ із подальшим визначенням і порівнянням показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи тест-культури. Це дозволяє позбавитися зай-

вих факторів середовища і дослідити відповідь тест-культури за одним фактором – "забруднення".

Здатність рослин до біоаккумуляції екоотоксикантів, зокрема важких металів, є широко відомою і на цьому засновано процеси фітореMediaції забруднених середовищ [10]. На відміну від грибів, які акумулюють токсиканти переважно з субстрату, та мохів і лишайників – з атмосфери, судинні рослини здатні накопичувати хімічні елементи одночасно з декількох середовищ. Отже, рослини виступають особливими концентраторами екоотоксикантів [4] і виправданим є створення тест-систем на основі рослинних субстратів та ксилотрофів, що виокремлюють фактори, пов'язані з субстратом, від інших факторів довкілля з метою спрощення інтерпретації відповіді тест-організму.

Точки (локації) збору рослинного субстрату визначили в місцях з ймовірно високим техногенним тиском: інтенсивна транспортна розв'язка на площі Комунарів (локація №1) та ділянка проспекту Лагутенка навпроти терикону шахти Центрально-заводська поблизу Донецького металургійного заводу (локація №2) у м. Донецьку. В якості контрольних точок було обрано відносно чисті райони – широколистяний ліс біля с. Дронівка (локація №3) та смт. Райгородок (локація №4) Донецької області.

Результати біотестування 4-х різних за екологічними умовами локацій за допомогою запропонованої тест-системи для екологічної індикації стану довкілля за показниками прооксидантно-антиоксидантної системи культур базидіоміцетів наведено в таблиці.

Результати досліду показали, що тест-культура однаково добре росте на усіх модифікаціях середовища з рослинними субстратами.

При аналізі показників прооксидантно-антиоксидантної системи тест-культури –



Таблиця. Показники прооксидантно-антиоксидантної системи тест-культури базидіоміцету *Pleurotus eryngii* P-er, при культивуванні на модифікованому ГПС з рослинним субстратом різних локацій

Локації	АСБ, г/л	ПОЛ _{ст} , нмоль/г (мл)		ПОЛ _{пр} , нмоль/г (мл)		АОА, %		СПО		ПОА		К _{РПАС}	
		М	КФ	М	КФ	М	КФ	М	КФ	М	КФ	М	КФ
1	4,82 ±0,15	174,02 ±3,30*	10,84 ±0,28	367,37 ±6,06	14,11 ±0,17	43,20 ±0,54*	64,22 ±3,09*	0,52 ±0,01*	0,23 ±0,01*	0,47 ±0,01*	0,76 ±0,01	0,91 ±0,04	0,83 ±0,03*
2	4,64 ±0,19	182,90 ±5,77*	10,88 ±0,18	392,30 ±11,95	13,81 ±0,24	39,54 ±1,23	62,40 ±2,09*	0,53 ±0,01*	0,21 ±0,01*	0,46 ±0,01*	0,78 ±0,02	0,84 ±0,03*	0,79 ±0,02
3	4,57 ±0,26	147,35 ±5,44	10,87 ±0,24	365,86 ±8,99	14,25 ±0,15	40,58 ±1,95	55,61 ±3,97	0,59 ±0,01	0,23 ±0,01*	0,40 ±0,01	0,76 ±0,01	1,01 ±0,04	0,72 ±0,04
4	4,91 ±0,23	154,11 ±6,38	10,68 ±0,28	371,81 ±11,92	14,22 ±0,23	40,03 ±1,72	55,05 ±2,45	0,58 ±0,01	0,25 ±0,01	0,41 ±0,01	0,75 ±0,02	0,96 ±0,04	0,73 ±0,03

* – різниця, вірогідна за $p < 0,05$.

штаму *P. eryngii* P-er видно, що при зростанні на середовищах з субстратом із місць з високим техногенним тиском, достовірно підвищується самочинна інтенсивність процесів ПОЛ у міцелії. Це призводить до збільшення ПОА міцелію і, відповідно, зменшення незадіяних СПО. На середовищі з субстратом 1 локації, відбувається незначне підвищення АОА міцелію, що дозволяє культурі зберегти оптимальний баланс прооксидантних та антиоксидантних процесів, на це вказує значення КРПАС, яке не відрізняється від контрольних.

На середовищі з 2 локації компенсаторного підвищення АОА в міцелії не відбувається, що значно зміщує показник КРПАС у бік прооксидації. При зростанні тест-культури на середовищах із субстратом з 1 та 2 локацій, відбувається підвищення синтезу позаклітинних антиоксидантних речовин, особливо на першому середовищі. На останньому середовищі це призводить до зміщення коефіцієнта рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи (КРПАС) у бік антиоксидантної складової, що може розглядатися як явище надкомпенсації та вказує на стійкість гомеостазу тест-об'єкта за даних умов.

Висновки

Оцінка екологічного стану довкілля з використанням прооксидантно-антиоксидантної активності культур базидіоміцетів надає інформацію про істинний стан тест-організму в умовах дії факторів середовища з урахуванням його захисного та адаптивного потенціалів, що обумовлює реакції компенсації або надкомпенсації негативних впливів.

Запропонований та апробований спосіб біотестування довкілля за допомогою тест-системи за показниками прооксидантно-антиоксидантної системи культур базидіоміцетів є достатньо простим для виконання у лабораторній практиці та відповідає вимогам об'єктивності, високої чутливості та інформативності.

Література

1. Арефьев С.П. Микоиндикация состояния лесных экосистем Ямала // Природная среда Ямала. Т.3: Биоценозы Ямала в условиях промышленного освоения. – Тюмень: ИППОС СО РАН, 2000. – С. 96–116.
2. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. – 1991. – 111. – Вып. 6. – С. 923–932.
3. Белозерская Т.А., Гесслер Н.Н. Активные формы кислорода и стратегия антиоксидантной защиты у грибов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – 43, № 5. – С. 565–575.
4. Ведерников К.Е., Бухарина И.Л., Шумилова М.А. Динамика содержания тяжелых металлов в ассимиляционном аппарате древесных растений в условиях техногенной среды // Химическая физика и мезоскопия. – 2010. – 11, №. 4. – С. 483–489.
5. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
6. Дудка І.О., Мережко Т.О., Гайова В.П. Мікологічний моніторинг як засіб оцінки і прогнозування фітосанітарного стану лісових екосистем // Укр. ботан. журн. – 1994. – 51, № 6. – С. 53–59.
7. Земля тревоги нашей. По материалам Докладов о состоянии окружающей природной среды в Донецкой области в 2007–2008 годах / Под ред. С. Третьякова, Г. Аверина. – Донецк, 2009. – 124 с.
8. Капич А.Н., Корнейчик Т.В. Определение антиоксидантной активности на модели перекисного окисления линолевой кислоты, инициированного грибной марганец пероксидазой // Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. 9. – С. 162–164.
9. Лихеноиндикационные методы исследования качества атмосферного воздуха / Н.Н. Красногорская, Э.Ф. Легуш, Н.Ю. Цвиленева, И.Э. и др. // Безопасность жизнедеятельности. – 2003. – № 11. – С. 26–30.
10. Кулагин А.А., Шагиева Ю.А. Древесные растения и биологическая консервация промышленных загрязнителей. – М.: Наука, 2005. – 190 с.
11. Лыдня А.Г., Пилипенко А.Ф. Биоиндикаторы в мониторинге заповедников Украины // Сб.: Вестник Днепропетровского университета "Биология и Экология". – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 1993. – Вып. 1. – С. 37–39.
12. Макаренко Н. Використання біологічних індикаторів для визначення забруднення ґрунту важкими металами // Вісник аграрної науки. – 2002. – № 10. – С. 55–56.
13. Мисюра А.Н., Смирнов Ю.Б., Гасов В.Я. Биотестирование как метод оценки природной среды // Проблемы фундаментальной та прикладної екології. – Кривий Ріг, 1997. – Ч.1. – С. 42–43.
14. Патент 74241 України. Спосіб глибинного культивування вищих базидіоміцетів / Чайка О.В., Федотов О.В. Заявка № u201203276, від 20.03.2012, МПК (2006.01), кл. А01G1/04, С12N1/14 Бюл. № 20, від 25.10.2012.
15. Патент 78482 України. Штам соматичних структур дереворуйнівного базидіоміцета *Pleurotus eryngii* (Dc.) Quel. Р-er - продуцент екзопродуктів перекисного окиснення ліпідів / Чайка О.В., Федотов О.В. Заявка № u201208872, від 18.07.2012, МПК (2006.01), кл. А01G 1/04 Бюл. № 6, від 25.03.2013.
16. Антиоксидантные свойства плодовых тел *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) Sf Gray (*Basidiomycetes, Polyporaceae*) / И.И. Полохина, С.Д. Трискиба, Л.В. Каниболоцкая и др. // Вісник Донецького національного університету: Природничі науки. – 2010. – №1. – С. 200–203.
17. Руденко С.С., Легета У.В. Нова методика визначення техногенної трансформації територій на основі маси фігур, утворених кривими виживання *Drosophila melanogaster* Mg. // Доповіді НАН України. – 2005. – №7. – С. 193–196.
18. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
19. Чайка О.В., Федотов О.В. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів ксилотрофних базидіоміцетів у глибинній культурі // Биологический вестник МГПУ имени Богдана Хмельницкого. – 2013. – 2 (8). – С. 220–236.



20. Черненкова Т.В. Реакция лесной растительности на промышленное загрязнение. – М.: Наука, 2002. – 191 с.
21. Щеглов А.И., Цветнова О.Б. Грибы – биоиндикаторы техногенного загрязнения // Природа. 2002. – № 11. – С. 13–16.
22. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*, effect of selected growth conditions and the use of a mutant strain / K.T. Kirk, S. Croan, M. Tien et al. // *Enzyme Microbiol Technol.* – 1986. – 8. – P. 27–32.
23. McCord J.M. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress // *Am. J. Med.* – 2000. – 108. – P. 652–659.

АННОТАЦІЯ

Чайка А.В., Федотов О.В. Оцінка екологічного стану оточуючої середовища з використанням прооксидантно-антиоксидантної активності культур базидіоміцетів // Біоресурси і природопольовання. – 2014. – 6, № 1–2. – С. 5–11.

Предложена тест-система, основанная на культивировании микологического тест-объекта в четко определенных условиях, которые отличаются только одним фактором – растительным субстратом из эталонных (чистых) и техногенно трансформированных сред с последующим определением и сравнением показателей состояния прооксидантно-антиоксидантной системы тест-культуры. С помощью тест-системы проведено биотестирование 4 различных по экологическим условиям локаций.

SUMMARY

A. Chaika, O. Fedotov. Evaluation of the environment ecological state using the prooxidant-antioxidant activity of Basidiomycetes cultures // Biological Resources and Nature Management. – 2014. – 6, № 1–2. – P. 5–11.

The test system based on the mycological test object cultivation under clearly defined conditions, which differ in the only one factor – the plant substrate of the standard (pure) and technologically transformed environments with following determination and comparison of prooxidant-antioxidant system indicators of test culture has been proposed. Biological testing of 4 locations with different environmental conditions was conducted using test-system.