

Федотов О.В., Клименко С.Ю.

**ДЕСТРУКЦІЯ КСЕНОБІОТИКІВ З ВИКОРИСТАННЯМ  
КУЛЬТУРАЛЬНОГО ФІЛЬТРАТУ КСИЛОТРОФІВ**

Донецький національний університет, м. Вінниця, Україна,  
e-mail: o.fedotov@donnu.edu.ua

Досліджено ефективність біодеградації забруднювачів на модельній сполуці – барвнику *Methyl Orange* культуральним фільтратом (КФ) штамів ксилотрофів, при їх культивуванні глибинним методом на стандартному глюкозо-пептонному середовищі (ГПС). Мета роботи – скринінг 81 штаму 19 видів ксилотрофів за показником ефективності біодеградації барвника, та вивчення можливості індукції даного показника шляхом модифікації живильного середовища. Ефективність біодеградації визначали наступним методом. Встановлену кількість КФ (дослід) чи живильного середовища (контроль) додавали до 0,001% розчину *Methyl Orange* в натрій-ацетатному буфері. Водневий показник реакційної суміші становив 4,4 од. Проби інкубували при +40°C протягом 48 годин. Після цього встановлювали рН реакційної суміші на рівні 3,1 од. за допомогою натрій-ацетатного буферу та вимірювали оптичну густину розчинів при довжині хвилі 506 нм. Ефективність біодеградації розраховували за різницею оптичної густини контролю та дослідів у відсотках. Відібрано найбільш перспективні для біодеградації штами – *F. velutipes* F-1105, *P. eryngii* P-er, *T. hirsuta* Th-11 і *D. quercina* Dq-08. Для них модифіковано склад глюкозо-пептонного середовища шляхом введення до нього лігносульфонату, твін-80, розчину мінеральних елементів за Кірком та підбору концентрації цих компонентів. Встановлено, що з метою деградації полютантів доцільно культивувати штаму *F. velutipes* F-1105 на модифікованому ГПС, яке додатково містить, на 1 л: лігносульфонат – 3,5 г, Твін-80 – 1,0 г, розчин мінеральних елементів Кірка – 70 мл; штаму *P. eryngii* P-er – 5,0 г, 1,0 г, 70 мл; штаму *T. hirsuta* Th-11 – 5,0 г, 1,0 г, 105 мл; та штаму *D. quercina* Dq-08 – 6,5 г, 1,0 г, 105 мл, відповідно. Це дозволяє підвищити ефективність деструкції модельної сполуки культуральним фільтратом штаму *F. velutipes* F-1105 у 9,3; штаму *D. quercina* Dq-08 – у 9,6; штаму *P. eryngii* P-er – у 13,3 та штаму *T. hirsuta* Th-11 – у 19,2 рази. За результатами роботи розроблені модифікації ГПС, які підвищують ефективність окислювальної деструкції модельної сполуки *Methyl Orange*, що є підставою подальшої оптимізації умов культивування обраних штамів ксилотрофів з метою індукції біодеградації ксенобіотиків.

*Ключові слова:* ксилотрофні базидіоміцети, глибинне культивування, біодеградація, *Methyl Orange*.



O.V. Fedotov, S.Yu. Klymenko

**DESTRUCTION OF XENOBIOTICS BY CULTURE FILTRATE FROM  
XYLOTROPHIC BASIDIOMYCETES**

*Donetsk National University, Vinnitsa, Ukraine*

*e-mail: o.fedotov@donnu.edu.ua*

The article deals with the efficiency of pollutants biodegradation by xylotrophic basidiomycetes submerged cultures grown on standard glucose-peptone medium (GPM). The efficiency of pollutants biodegradation was determined by the model compound – dye *Methyl Orange*. The purpose of the work is screening of 19 species 81 strains xylotrophic basidiomycetes cultures on the indicator of the dye oxidative degradation efficiency and exploring the possibility of induction of this indicator by modifying the culture medium. The biodegradation efficiency was determined by following method. Assigned amount of culture filtrate (experiment) or medium (control) was added to the 0.001% solution of *Methyl Orange* in sodium acetate buffer. pH of the reaction mixture was 4.4 units. Samples were incubated at +40°C for 48 hours. Then pH of the reaction mixture was set up at 3.1 units using sodium acetate buffer and the optical density of solutions at a wavelength of 506 nm was measured. The efficiency of biodegradation was calculated by the difference of the optical density of control and experiment as a percentage. The most promising strains – *F. velutipes* F-1105, *P. eryngii* P-er, *T. hirsuta* Th-11 and *D. quercina* Dq-08 were selected. The composition of the glucose-peptone medium was modified for these strains by the introduction in the medium lignosulfonate, Tween 80, Kirk's minerals solution and selecting the concentration of these components. According to the study for the purpose of pollutants degradation it is advisable to cultivate *F. velutipes* F-1105 strain on modified GPM, which further comprises at 1 l: lignosulfonate – 3.5 g; Tween 80 – 1.0 g, Kirk's minerals solution – 70 ml; *P. eryngii* P-er strain – 5.0 g, 1.0 g, 70 ml; *T. hirsuta* Th-11 strain – 5.0 g, 1.0 g, 105 ml; and *D. quercina* Dq-08 strain – 6.5 g, 1.0 g, 105 ml, respectively. This allowed to increase the model compound degradation efficiency by the culture filtrate of strain *F. velutipes* F-1105 in 9,3; *D. quercina* Dq-08 – in 9,6; *P. eryngii* P-er – in 13,3 and *T. hirsuta* Th-11 – 19,2 times. Thus, GPS modifications were designed that enhance the model compound oxidative degradation efficiency and are the basis for further optimization of the selected xylotrophic basidiomycetes strains submerged cultivation conditions to increase biodegradation of xenobiotics.

*Keywords:* xylotrophic basidiomycetes, submerged cultivation, biodegradation, *Methyl Orange*.

Федотов О.В., Клименко С.Ю.

**ДЕСТРУКЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
КУЛЬТУРАЛЬНОГО ФИЛЬТРАТА КСИЛОТРОФОВ**

Донецкий национальный университет, г. Винница, Украина

e-mail: o.fedotov@donnu.edu.ua

Исследована эффективность биodeградации загрязнителей на модельном составе - красителе *Methyl Orange* культуральным фильтратом (КФ) штаммов ксилотрофов, при их культивировании глубинным методом на стандартной глюкозо-пептонной среде (ГПС). Цель работы - скрининг 81 штамма 19 видов ксилотрофов по показателю эффективности биodeградации красителя, и изучение возможности индукции данного показателя путем модификации питательной среды. Эффективность биodeградации определяли следующим методом. Установленное количество КФ (опыт) или питательной среды (контроль) добавляли к 0,001% раствора *Methyl Orange* в натрий-ацетатном буфере. Водородный показатель реакционной смеси составлял 4,4 ед. Пробы инкубировали при 40°C в течение 48 часов. После этого устанавливали pH реакционной смеси на уровне 3,1 ед. с помощью натрий-ацетатного буфера и измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 506 нм. Эффективность биodeградации рассчитывали по разнице оптической плотности контроля и опыта в процентах. Отобраны наиболее перспективные для биodeградации штаммы - *F. velutipes* F-1105, *P. eryngii* P-er, *T. hirsuta* Th-11 и *D. quercina* Dq-08. Для них модифицировано состав глюкозо-пептонной среды путем введения в нее лигносульфоната, твин-80, раствора минеральных элементов по Кирку и подбора концентрации этих компонентов. Установлено, что с целью деградации поллютантов целесообразно культивировать штамм *F. velutipes* F-1105 на модифицированной ГПС, которая дополнительно содержит, на 1 л: лигносульфонат - 3,5 г, Твин-80 - 1,0 г, раствор минеральных элементов Кирка - 70 мл; штамм *P. eryngii* P-er - 5,0 г, 1,0 г, 70 мл; штамм *T. hirsuta* Th-11 - 5,0 г, 1,0 г, 105 мл; и штамм *D. quercina* Dq-08 - 6,5 г, 1,0 г, 105 мл, соответственно. Это позволяет повысить эффективность деструкции модельного состава культуральным фильтратом штамма *F. velutipes* F-1105 в 9,3; штамма *D. quercina* Dq-08 - в 9,6; штамма *P. eryngii* P-er - в 13,3 и штамма *T. hirsuta* Th-11 - в 19,2 раза. По результатам работы разработаны модификации ГПС, которые повышают эффективность окислительной деструкции модельного состава *Methyl Orange*, что является основанием дальнейшей оптимизации условий культивирования избранных штаммов ксилотрофов с целью индукции биodeградации ксенобиотиков.

*Ключевые слова:* ксилотрофные базидиомицеты, глубинное культивирование, биodeградация, *Methyl Orange*.

Останнім часом, через високі темпи росту промислового виробництва, утворюється велика кількість високо- та низькотоксичних відходів, що мають слабку біодоступність. Це ксенобіотики – чужорідні для живих організмів хімічні речовини, що природно не входять до біотичного кругообігу. Серед таких речовин значна кількість представлена фенольними сполуками. Наприклад, метилоранж *Methyl Orange* (CAS 547-58-0) – поширений органічний



барвник, широко використовуваний в промисловості (Федотов та ін., 2012).

Отже, одна з найбільш актуальних проблем сьогодення – раціональне природокористування, зокрема, утилізація промислових відходів. Так, серед фізико-хімічних методів очищення стічних вод, ефективним методом вважається адсорбція. Однак, при такому очищенні не вирішується питання деградації цих речовин. Розробка способів деградації ксенобіотиків базується на пошуку нових технологій або організмів – деструкторів хімічних сполук. Мікроорганізми, які знайшли широке застосування в очисних спорудах, не завжди здатні до знешкодження промислових викидів. Це пов'язано з тим, що вони не володіють повноцінним ферментативним комплексом, здатним до повного розкладання поліютантів. Як наслідок, ці речовини накопичуються в навколишньому середовищі.

Базидіальні ксилотрофи – еволюційно найбільш молоде угруповання грибів з надзвичайно потужним ферментним комплексом, здатним до руйнування складного та хімічно стійкого лігніноцелюлозного комплексу деревини. Робота цих ферментів тісно взаємопов'язана з функціонуванням прооксидантно-антиоксидантної системи ксилотрофів. Остання генерує активовані форми кисню, зокрема ліпоперекисні радикали, які є модуляторами процесів біодеградації (Дудка и др., 1982; Hammel et al., 2002). Отже, є перспективним залучення ксилотрофних базидіоміцетів до процесів біоремедіації забруднених середовищ і розкладання нових промислово-створених речовин (Капич, 2011; Рабинович та ін., 2004).

Метою роботи було проведення скринінгу та індукції ефективності біодеградації *Methyl Orange* глибинними культурами ксилотрофів.

#### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Об'єктами дослідження були 81 штамп 19 видів ксилотрофів з колекції культур базидіоміцетів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету (Федотов та ін., 2012). Серед досліджених штамів, 62 належать до порядку *Agaricales*: *Agrocybe cylindracea* (DC.) Maire – 167, 218, 960, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – Le-2, Le-340, Le-4, Le-6, Le-7, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer – F-03, F-06, F-073, F-1, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-202, F-204, F-610, F-vv, F-10, F-11, F-1105, *Fistulina hepatica* (Schaeff.) With. – Fh-08, Fh-09, Fh-18, *Schizophyllum commune* Fr. – Sc-10 Sc-1102 Sc-1104, *Pleurotus citrinopileatus* Singer – P-citr, *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. – P-er, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. – D-140, Hk-35, P-004, P-01, P-035, P-039, P-081, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-91, P-94, P-105, P-107, P-191, P-203, P-206, P-208, P-209, P-210, P-998, P-6v, P-4к, P-12к, P-кл, НУ-35, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. – AX, MS-3; a 19 – до порядку *Polyporales*: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. – Gl-1, Gl-2, Gl-3, Gl-B-99, Gl-11, *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. – IL-4K, IL-1, IL-1201, *Fomes fomentarius* (L.) Fr. – Ff-09, T-10, Ff-1201, *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd – Th-11, *Trametes ochracea* (Pers.) Gilb. & Ryvarden – To, *Trametes trogii* Berk. – Tt-11, *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvarden – Tb-11, *Daedalea quercina* (L.) Pers. – Dq-08,

*Grifola frondosa* (Dicks.) Gray – Gf-01, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill – Ls-08, Ls-09. Більшу частину штамів (85%) було виділено в чисту культуру методом вилучення тканинних ізолятів (Федотов та ін., 2012) з дикоростучих базидіом, зібраних в різних місцевостях м. Донецька й області. Також, у дослідженнях використовували 5 штамів з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК): *A. cylindracea* 167, 218, 960, *L. edodes* Le-340, *F. velutipes* F-610 та 7 штамів – з комерційних організацій ТОВ «УкрМіцелій» та ТОВ «Біотехнологія», м. Донецьк: *L. edodes* Le-2, Le-4, Le-6, Le-7, *P. citrinopileatus* P-citr, *P. eryngii* P-er, *P. ostreatus* Hk-35.

З метою проведення дослідження, штами культивували глибинним методом на стандартному глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) наступного складу (г/л) (Дудка, 1982): пептон (Biofac, Данія) – 3,0; глюкоза – 10,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,6;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 0,05;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001 (всі компоненти – кваліфікації чда та хч). Співвідношення С:N у ГПС дорівнювало 13:1. Початковий рН ГПС складав  $6,62 \pm 0,06$ . Культивування проводили при  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  – температурному оптимумі росту більшості штамів (Дудка и др., 1982). Процес глибинного культивування штамів ксилотрофних базидіоміцетів проводили в колбах ємністю 250 мл з 50 мл ГПС на лабораторній качалці АБУ-6С (Росія) зі зворотно-поступальним рухом з режимом 45 хв. роботи з частотою 120 коливань за хв. та 15 хв. – інтервал. Інокулюмом слугував гомогенізований глибинний міцелій, що вирощувався в аналогічних умовах в колбах з шипоподібними відбійниками протягом 7 діб. Інокулюм вносили в кількості 10% за об'ємом. Перед інокуляцією асептично відбирали проби та визначали абсолютно суху біомасу і відсутність контамінації інокулюму за допомогою світлового мікроскопу XS-5520 MICROmed (Китай). Термін культивування штамів на основній стадії становив 6 діб, але для трьох штамів (*G. frondosa* Gf-01, *L. sulphureus* Ls-08 та Ls-09) його було подвоєно через повільну швидкість росту міцелію.

Наприкінці терміну культивування міцелій відділяли від культуральної рідини за допомогою щільної капронової тканини, отримуючи таким чином культуральний фільтрат (КФ). Визначали абсолютно суху біомасу (АСБ) міцелію ваговим методом. З метою визначення ефективності окислювальної деструкції речовин (ЕД) було обрано модельну сполуку – широко використовуваний барвник *Methyl Orange*, що відноситься до класу азобарвників. Визначену кількість КФ (дослід) чи живильного середовища (контроль) додавали до 0,001% розчину *Methyl Orange* в натрій-ацетатному буфері. Водневий показник реакційної суміші становив 4,4 од. Проби інкубували при  $+40^\circ\text{C}$  протягом 48 годин. Після цього встановлювали рН реакційної суміші на рівні 3,1 од. за допомогою натрій-ацетатного буферу. Вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 506 нм.

Ефективність деструкції розраховували за формулою:

$$ED = \frac{E_k - E_d}{E_k} \cdot 100\%$$

де  $E_k$ ,  $E_d$  – оптична густина контрольної і дослідної проби відповідно.

Досліди проводили у трикратній повторності. Отримані експериментальні дані обробляли з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки результатів біологічних експериментів.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження зі скринінгу та індукції ефективності біодеградації *Methyl Orange* глибинними культурами ксилотрофів проводили за схемою (рис. 1).



Рис. 1. Схема проведення дослідження зі скринінгу та індукції ефективності біодеградації *Methyl Orange* глибинними культурами ксилотрофів.

Першим етапом досліджень з біодеградації ксенобіотиків була розробка легкого у виконанні і недорогого способу визначення ефективності окислювальної деструкції речовин. Цим вимогам відповідають спектрофотометричні методи. У зв'язку з цим, проводили відбір модельної сполуки – барвника, утилізацію якої можна було б встановити за знебарвленням розчинів через трансформацію хромофорної групи базидіоміцетами. Як результат, обрано найбільш підходящий барвник *Methyl Orange*.

Наступним етапом проводили скринінг штамів – активних деструкторів модельної сполуки. Ефективність окислювальної деструкції барвника *Methyl Orange* та накопичення АСБ 81 штаму 19 видів базидіоміцетів при глибинному

культивуванні на стандартному ГПС терміном 6-ть діб представлено в табл. 1.

**Таблиця 1. Ефективність окислювальної деструкції *Methyl Orange* та накопичення АСБ штамами базидіоміцетів при глибинному культивуванні на стандартному ГПС**

Вид	Штам	ЕД, %	АСБ, г/ л	Вид	Штам	ЕД, %	АСБ, г/ л
<i>A. aegerita</i>	167	0,24±0,11	3,12±0,08	<i>P. ostreatus</i>	P-087	0,11±0,09	2,45±0,15
	218	1,22±0,57	3,50±0,17		P-088	0,41±0,24	1,61±0,09
	960	0,19±0,10	4,38±0,25		P-208	1,19±0,92	2,65±0,12
	L.e.-2	2,36±1,20	0,67±0,04		P-6v	0,70±0,47	2,49±0,04
<i>L. edodes</i>	L.e.-340	0,31±0,11	1,01±0,05		P-91	0,23±0,13	1,31±0,10
	L.e.-4	1,26±0,86	0,81±0,08		P-94	0,69±0,40	2,19±0,04
	L.e.-6	0,12±0,10	0,73±0,03		P-998	0,52±0,42	1,78±0,04
	L.e.-7	0,98±0,52	0,91±0,08		HУ-35	0,26±0,15	1,39±0,10
	F-03	0,47±0,34	1,52±0,20		P-089	1,54±1,03	3,51±0,24
	F-06	0,21±0,14	1,50±0,12		P-105	0,34±0,10	2,65±0,13
	F-073	0,52±0,27	2,08±0,11		P-107	0,33±0,21	3,21±0,15
	F-1	0,40±0,33	2,43±0,21		P-12к	0,69±0,41	1,63±0,10
	F-102	1,10±0,62	3,52±0,12		P-191	1,13±0,86	3,79±0,11
	F-104	0,90±0,88	3,26±0,26		P-203	0,17±0,07	2,53±0,16
<i>F. velutipes</i>	F-107	0,28±0,15	3,04±0,11	P-206	0,09±0,03	2,80±0,19	
	F-112	0,79±0,31	3,62±0,09	P-209	0,33±0,12	1,41±0,06	
	F-2	1,11±0,73	1,74±0,12	P-210	1,17±0,77	1,35±0,10	
	F-202	0,56±0,43	2,74±0,24	P-4к	0,32±0,21	1,82±0,08	
	F-204	0,41±0,34	3,96±0,19	P-кЛ	0,85±0,41	1,70±0,08	
	F-610	0,12±0,08	3,39±0,30	P.	АХ	0,07±0,04	9,60±1,10
	F-vv	1,31±0,86	1,05±0,08	<i>pulmonarius</i>	MS-3	0,06±0,03	5,33±0,47
	F-10	2,70±2,31	0,97±0,05	G.I.-1	0,18±0,10	1,29±0,07	
	F-11	0,64±0,41	3,13±0,14	G.I.-2	0,77±0,38	1,37±0,05	
	F-1105	2,35±1,35	2,58±0,16	G.I.-3	0,55±0,41	1,32±0,10	
<i>F. hepatica</i>	Fh-08	0,19±0,17	4,13±0,03	<i>G. lucidum</i>	GI-B-99	0,12±0,10	1,26±0,02
	Fh-09	0,09±0,05	3,79±0,13	G.I.-11	1,27±0,94	1,77±0,07	
	Fh-18	0,12±0,09	3,89±0,13	IL-4K	1,17±1,03	1,16±0,05	
	Sc-10	0,25±0,24	4,43±0,08	IL.-1	0,67±0,50	1,20±0,11	
	<i>S. commune</i>	Sc-1102	0,47±0,42	3,94±0,11	<i>I. lacteus</i>	IL-1201	1,26±1,13
Sc-1104		0,91±0,86	4,57±0,13	Ff-09	0,59±0,55	2,06±0,08	
<i>P.citrinopileatus</i>		P-citr	2,07±1,63	1,36±0,12	T-10	1,55±1,26	1,98±0,07
	<i>P. eryngii</i>	P-er	2,72±1,91	3,65±0,22	<i>F. fomentarius</i>	Ff-1201	0,88±0,51



Вид	Штам	ЕД, %	АСБ, г/ л	Вид	Штам	ЕД, %	АСБ, г/ л
<i>P. ostreatus</i>	D-140	2,48±1,42	5,85±0,10	<i>T. hirsuta</i>	Th-11	3,83±1,49	3,87±0,09
	Hk-35	1,74±1,13	5,45±0,34		To-	3,07±2,30	2,94±0,07
	P-004	0,83±0,48	1,93±0,13	<i>T. ochracea</i>	1201		
	P-01	0,75±0,65	3,00±0,08	<i>T. trogii</i>	Tt-11	2,52±2,45	3,57±0,22
	P-035	0,98±0,62	4,36±0,36	<i>T. biforme</i>	Tb-11	0,64±0,55	2,01±0,15
	P-039	0,42±0,24	3,62±0,11	<i>D. quercina</i>	Dq-08	1,05±0,95	3,38±0,19
	P-081	0,51±0,42	2,30±0,02	<i>G. frondosa</i>	Gf-01	0,15±0,05	0,23±0,04
	P-082	0,62±0,37	2,12±0,14		L.s.-08	0,08±0,04	0,02±0,00
	P-083	0,36±0,26	2,46±0,03	<i>L. sulphureus</i>	L.s.-09	0,08±0,05	0,11±0,01

Приріст АСБ досліджених штамів коливався в широких межах – від 0,08 до 9,60 г/л. Серед видів порядку *Agaricales* лідерами є види *P. pulmonarius*, *S. commune*, *F. hepatica*, *P. eryngii*, та *A. cylindracea*; а серед видів порядку *Polyporales* – *T. trogii*, *D. quercina* та *T. hirsuta*. Найменшу кількість АСБ накопичили види *L. edodes* і *P. citrinopileatus* (*Agaricales*) та *L. sulphureus* і *G. frondosa* (*Polyporales*), що узгоджується з літературними джерелами (Соломко и др., 2000).

З таблиці (табл. 1.) видно, що рівень інтенсивності деструкції барвника *Methyl Orange* глибинними культурами базидіоміцетів на вихідному ГПС є досить низьким, а отже потребує пошуку підходів до її індукції.

Згідно з результатами досліджень (Капич, 2011), вільнорадикальне окиснення лігніну та інших хімічно стійких сполук залежить від активації процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

Внаслідок цього поліненасичені жирні кислоти можуть окислюватись з утворенням перекисних радикалів, що приймають участь в атаці на такі сполуки. Тому для відбору штамів для подальшої розробки методу деструкції забруднювачів використовували результати досліджень деструкції барвника *Methyl Orange*, а також дані попередніх досліджень інтенсивності процесів ПОЛ в КФ (Федотов та ін., 2012).

Так, за цими результатами для подальших досліджень були обрані штами ксилотрофів: *F. velutipes* F-1105, *P. eryngii* P-er, *T. hirsuta* Th-11 та *D. quercina* Dq-08.

Наступним етапом дослідження було встановлення додаткових компонентів ГПС для індукції ЕД відібраних штамів. Модифікації ГПС, крім зазначених компонентів містили лігносульфонат, твін-80 та розчин мінеральних елементів за Кірком.

Вибір додаткових компонентів ГПС пояснюється наступним. Для індукції лігнолітичних ферментів, наприклад, лаккази, можуть застосовуватися різноманітні сполуки (Eggert et al., 1996). Серед них найбільш доступними і дешевими є лігносульфонати – відходи деревопереробних підприємств,



продукти переробки бісульфітного луку в процесі виробництва целюлози. Сульфований лігніновий комплекс має фенольну природу і є токсичним продуктом, що забруднює оточуюче середовище. В дослідженні (Eggert et al., 1996) вказується, що додавання у поживне середовище лігносульфонату у кількості 1% може значно підвищити активність лаккази.

Також відомо (Venkatadri, Irvine, 1990), що культури базидіоміцетів при глибинному культивуванні мають низьку лігніназну активність глибинних культур і багато дослідників вказували на необхідність додавання до живильного середовища детергентів (Jager et al., 1985; Venkatadri, Irvine, 1990) та мікроелементів. Був показаний потужний і часто критичний вплив мікроелементів на вторинний метаболізм різних прокариот та еукаріот (Weinberg, 1977), причому баланс цих мікроелементів має вирішальне значення. Тому в базове середовище додавали розчин мінеральних елементів за Кірком в кількості 70 мл/ л (Kirk et al., 1986).

Поверхнево-активні речовини (ПАР) змінюють поверхневий натяг рідких поживних середовищ і, таким чином, впливають на процеси живлення і розвитку культури, зокрема, через збільшення водної розчинності і біодоступності органічних сполук (Rosenberg et al., 1998; Tugrul, Cansunar, 2005).

В якості такої ПАР використовували Твін-80 (поліоксіетиленсорбітанмоноолеат) у кількості 0,1%.

Ефективність окислювальної деструкції *Methyl Orange* відібраних штамів, які культивували глибинним методом на стандартному ГПС (1) та його модифікаціях – із додаванням 10 г/ л лігносульфонату (2); 1 г/ л Твін-80 (3); 70 мл/ л розчину мікроелементів Кірка (4); та цих компонентів разом (5), представлена на рис. 2.

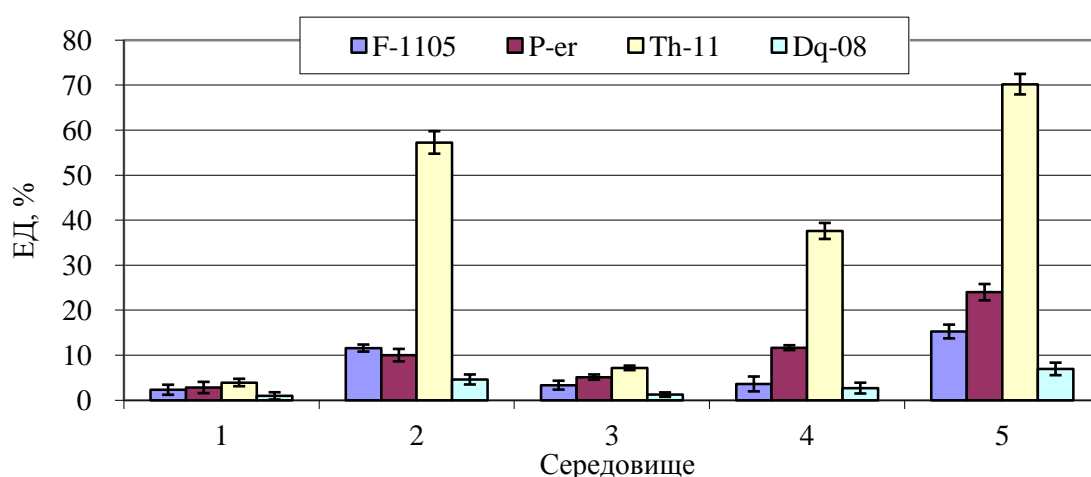


Рис. 2. Ефективність деструкції модельної сполуки КФ деяких штамів ксилотрофів на модифікованих середовищах.



За його даними, найвищі показники ЕД усіх штамів зафіксовано на середовищі 5, що містило всі додаткові компоненти. Так, значення ЕД КФ штаму *F. velutipes* F-1105 на цьому середовищі у порівнянні зі стандартним ГПС більше в 6,6; штаму *D. quercina* Dq-08 – в 7,4; штаму *P. eryngii* P-er – в 8,6; та найбільше – штаму *T. hirsuta* Th-11 – майже в 18 разів. Серед однокомпонентних модифікацій, найбільшу індукцію деградації модельної сполуки спричиняє лігносульфонат. Так, у штаму *P. eryngii* P-er значення ЕД збільшилося в 3,6; штамів *F. velutipes* F-1105 та *D. quercina* Dq-08 – в 5; та найбільше – штаму *T. hirsuta* Th-11 – в 14,6 разів.

Треба зазначити, що під час вирощування культур на середовищі з лігносульфонатом, КФ поступово набував коричневого забарвлення. Найбільше це було виражено у штаму *P. eryngii* P-er, значно менше – у штаму *T. hirsuta* Th-11 і ще менше – у штаму *F. velutipes* F-1105. Майже не змінювався колір культуральної рідини штаму *D. quercina* Dq-08.

Така кольорова реакція має назву реакції Бавендамма (Bavendamm, 1928) і вказує на синтез фенолоксидаз, які окислюють компоненти лігносульфонату. Це є основою розподілення ксилотрофів за типом гнилі деревини, що вони викликають. Отже, використання лігносульфонату в якості індуктора ферментів ксилотрофів, задіяних у процесах біодеградації ксенобіотиків є ефективним і дозволяє вирішити додаткові задачі – утилізацію цієї речовини.

На другому місці за величиною впливу на ЕД КФ досліджуваних штамів знаходяться мікроелементи із найбільшим ефектом на штам *T. hirsuta* Th-11 – майже у 10, та *P. eryngii* P-er – 4,2 рази. Найменшу індукцію ЕД чинить окреме додавання до середовища Твін-80 – майже в 2 рази для штамів *P. eryngii* P-er та *T. hirsuta* Th-11. Результати впливу модифікацій ГПС на накопичення АСБ відібраними штамми показують наступне.

Додавання лігносульфонату в наведеній концентрації не впливає на накопичення АСБ штамми і лише у штаму *T. hirsuta* Th-11 спостерігається незначне збільшення приросту біомаси. Додавання Твін-80 відчутно впливає лише на ріст штаму *F. velutipes* F-1105, його АСБ на цьому середовищі порівняно з контролем більше в 1,5 рази.

Показники росту досліджуваних штамів майже ідентичні на середовищах з Твін-80 та з усіма компонентами (середовище 5). На цьому середовищі зафіксоване значне зменшення АСБ штаму *P. eryngii* P-er порівняно з середовищем з мікроелементами (4), що може бути пов'язано з негативним впливом високої концентрації лігносульфонату, Твін-80 чи їх поєднанням в цьому середовищі. Таким чином, для подальших досліджень було обране модифіковане ГПС з лігносульфонатом, Твін-80 та розчином мікроелементів Кірка.

Наступним етапом досліджень був підбір концентрації цих речовин в модифікованому середовищі. Показники ефективності окислювальної

деструкції модельної сполуки КФ штамів *F. velutipes* F-1105, *P. eryngii* P-er, *T. hirsuta* Th-11 та *D. quercina* Dq-08 на модифікованому середовищі з концентрацією лігносульфонату від 0 до 14 г/л наведено на рис. 3.

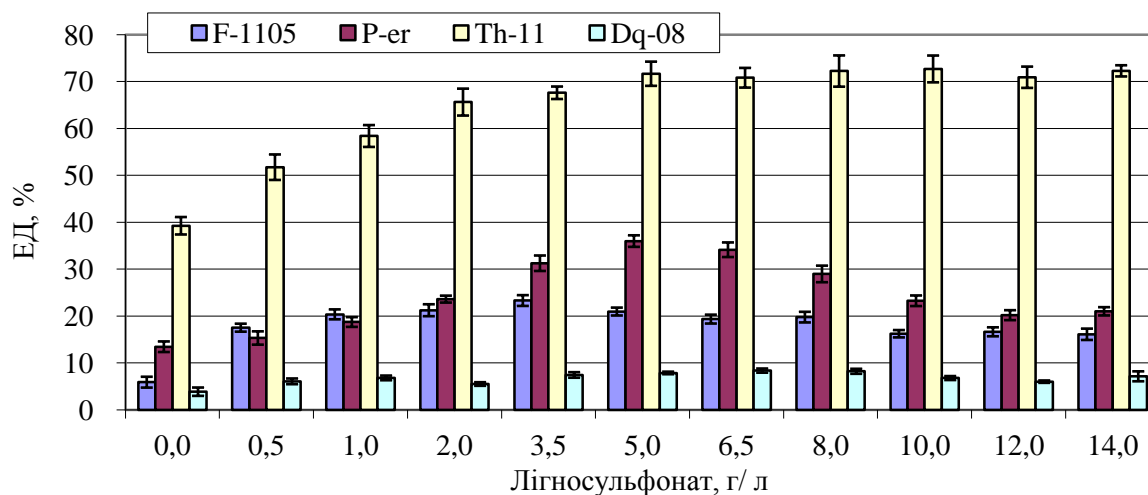


Рис. 3. Ефективність деструкції модельної сполуки КФ досліджуваних штамів залежно від концентрації лігносульфонату.

Досліджувані штами мають індивідуальні реакції зміни ЕД *Methyl Orange* в залежності від концентрації лігносульфонату. Так, штам *P. eryngii* P-er має чіткий максимум ЕД при концентрації лігносульфонату 5,0 г/л. Відхилення від цього значення в обох напрямках ведуть до зниження ЕД: без лігносульфонату та з його максимальним вмістом – в 2,7 та в 1,7 разів відповідно. Штами *F. velutipes* F-1105 та *D. quercina* Dq-08 мають схожу, але не таку виражену в області високих концентрацій лігносульфонату залежність. Оптимальний вміст цієї речовини за рівнем ЕД для штаму F-1105 становить близько 3,5 г/л. На середовищі без лігносульфонату ЕД нижче майже в 4 рази, а з максимальним вмістом цієї речовини – в 1,5 рази. Оптимальний вміст лігносульфонату за ЕД для штаму *D. quercina* Dq-08 – 6,5 г/л, де реєстрований показник в 2,2 рази вищий за такий на середовищі без цієї речовини. ЕД КФ штаму *T. hirsuta* Th-11 підвищується майже в 2 рази при концентрації лігносульфонату 5,0 г/л і надалі залишається на цьому рівні.

Встановлено негативний вплив підвищення концентрації лігносульфонату в модифікованому ГПС на накопичення біомаси (рис. 4). Біомаса штамів F-1105, P-er та Th-11, що викликають білу гниль деревини, значно знижується із підвищенням вмісту лігносульфонату. Низькі концентрації лігносульфонату, навпаки, стимулюють ріст культур грибів білої гнилі. АСБ глибинної культури гриба брурої гнилі *D. quercina* Dq-08 знаходиться майже на одному рівні.

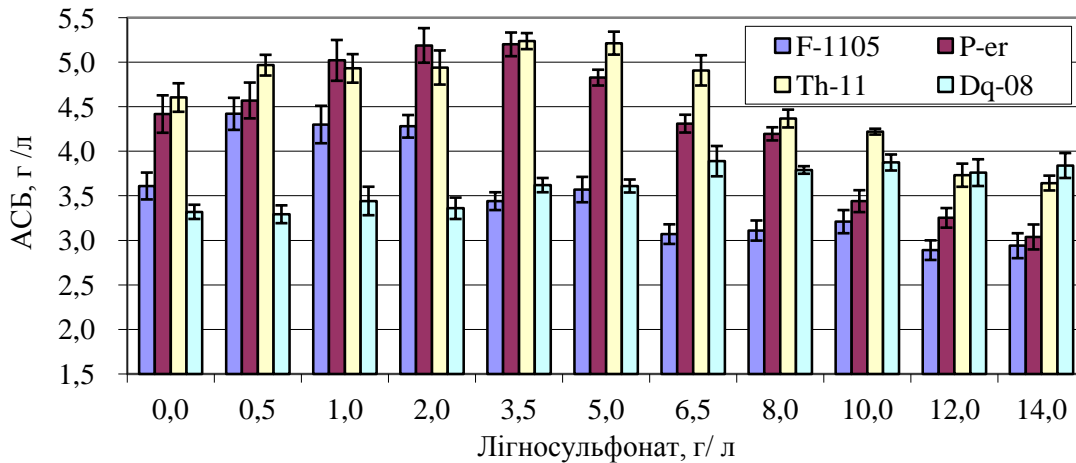


Рис. 4. Приріст АСБ досліджуваними штамми залежно від концентрації лігносульфонату.

Виходячи з отриманих результатів, для подальших досліджень були обрані наступні концентрації лігносульфонату в модифікованих ГПС: для штаму *F. velutipes* F-1105 – 3,5 г/л, штаму *P. eryngii* P-er – 5,0 г/л, штаму *T. hirsuta* Th-11 – 5,0 г/л і штаму *D. quercina* Dq-08 – 6,5 г/л. Це дозволило збільшити ЕД штамів, порівняно із середовищем 5 без лігносульфонату, у 4,0; 2,7; 1,8 та 2,2 рази відповідно; а порівняно з середовищем 5 (з лігносульфонатом 10 г/л) – у 1,4; 1,6; 0,0 та 1,2 рази відповідно.

Наступним етапом досліджень був підбір концентрації Твін-80. Для цього досліджували штами культивували на модифікованому середовищі з оптимальною для кожного штаму концентрацією лігносульфонату та розчином мінеральних елементів за Кірком у незмінній кількості в 70 мл/л (рис. 5).

Як показали результати дослідження, збільшення вмісту даної ПАР в середовищі до концентрації 1,0 г/л веде до вірогідного підвищення ЕД усіх культур грибів білої гнилі. Подальший ріст концентрації Твін-80 або не впливає на швидкість деструкції модельної сполуки (штами F-1105, Th-11), або веде до її зниження (штам *P. eryngii* P-er). Штам Dq-08 гриба бурої гнилі вірогідно не змінює рівень ЕД в залежності від концентрації Твін-80. Приріст АСБ на середовищах з різною концентрацією Твін-80 для усіх штамів, окрім *F. velutipes* F-1105 залишається незмінним. У останнього штаму із підвищенням вмісту Твін-80 з 0 до 4 г/л значення приросту АСБ збільшується в 1,4 рази. Така відмінність може бути пояснена різними вимогами культур до поверхневого натягу рідини, в якій розвивається культура; а Твін-80, являючи собою нейоногенну ПАР, безпосередньо впливає на поверхневий натяг культуральної рідини. До того ж, різні штами можуть мати різну здатність до використання

цієї речовини в якості джерела вуглецю.

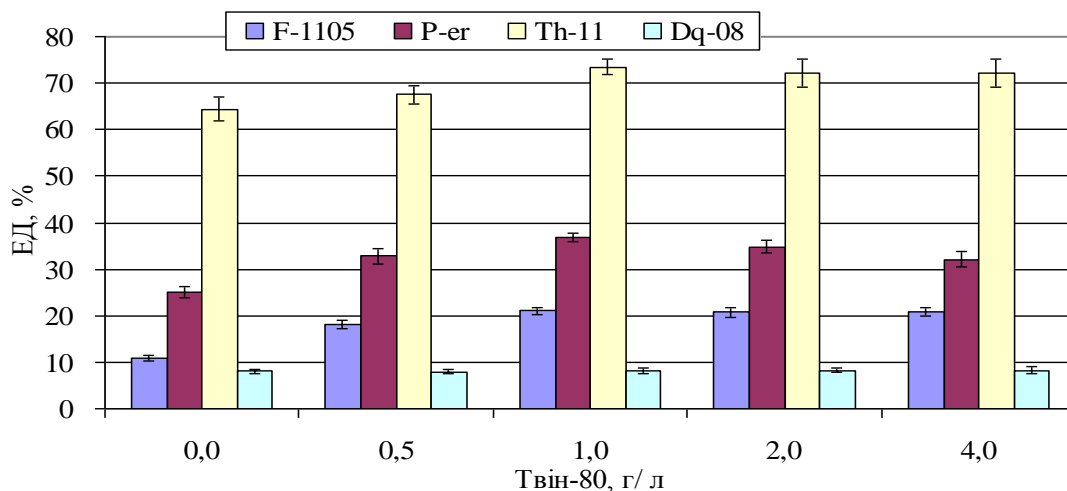


Рис. 5. Ефективність деструкції модельної сполуки КФ досліджуваних штамів залежно від концентрації Твін-80.

Отже, вміст 1 г/ л Твін-80 є найсприятливішим для біодеградації *Methyl Orange* досліджуваними культурами і використовувався в подальших дослідженнях.

Результати дослідження впливу мінеральних речовин на окислювальну деструкцію барвника *Methyl Orange* представлено на рис. 6. Для всіх штамів межі оптимальної концентрації розчину мінеральних елементів Кірка для біодеградації модельної сполуки можна встановити від 70 до 350 мл/ л, з найвищими значеннями на 70 мл/ л – штами F-1105 та P-er і на 105 мл/ л – штами Th-11 та Dq-08. При його нижчому вмісті чи відсутності, ЕД КФ штамів знижується. При підвищенні концентрації мінеральних речовин вище наведеного інтервалу, спостерігається поступове зниження реєстрованого показника. Це може бути пов'язано з негативним впливом високої концентрації деяких компонентів розчину Кірка, зокрема, важких металів на ферментативну активність культур. Це припущення підтверджують дані з накопичення АСБ культурами базидіоміцетів при глибинному культивуванні: для штамів F-1105, P-er та Th-11 найвищі такі значення припадають на концентрацію розчину Кірка в середовищі 70 мл/ л, а для штаму Dq-08 – від 105 до 140 мл/ л. Тобто для досліджуваних штамів грибів оптимальні концентрації розчину Кірка для росту та біодеградації модельної сполуки майже співпадають.

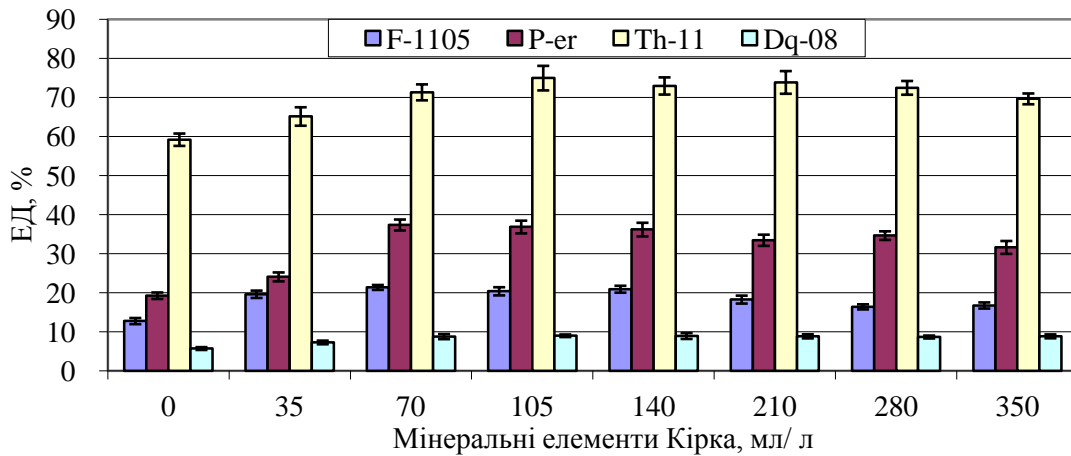


Рис. 6. Ефективність деструкції модельної сполуки КФ досліджуваних штамів залежно від концентрації мінеральних елементів Кірка в середовищі.

Загалом, результати дослідження дозволили розробити модифікації ГПС, які підвищують ефективність окислювальної деструкції модельної сполуки в 9,3 (*F. velutipes* F-1105); 9,6 (*D. quercina* Dq-08); 13,3 (*P. eryngii* P-er) та 19,2 разів (*T. hirsuta* Th-11). При цьому розроблені середовища дозволяють підвищити накопичення АСБ дослідними штамми в 1,2 (Dq-08); 1,3 (Th-11) та 1,5 разів (F-1105 і P-er).

Таким чином, модифіковано метод визначення ефективності окислювальної деструкції модельної сполуки – барвника *Methyl Orange*. За цим показником проведено скринінг глибинних культур 81 штаму 19 видів ксилотрофів. Відібрано найбільш перспективні штами – *F. velutipes* F-1105, *P. eryngii* P-er, *T. hirsuta* Th-11 і *D. quercina* Dq-08. Модифіковано склад стандартного ГПС для цих штамів. З метою деградації полютантів доцільно культивувати штам *F. velutipes* F-1105 на модифікованому ГПС, яке додатково містить, на 1 л: лігносульфонат – 3,5 г, Твін-80 – 1,0 г, розчин мінеральних елементів Кірка – 70 мл; штам *P. eryngii* P-er – 5,0 г, 1,0 г, 70 мл; штам *T. hirsuta* Th-11 – 5,0 г, 1,0 г, 105 мл; та штам *D. quercina* Dq-08 – 6,5 г, 1,0 г, 105 мл, відповідно. Це дозволить значно збільшити ефективність окислювальної деструкції хімічно стійких сполук культуральним фільтратом відібраних штамів базидіоміцетів.

#### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Bavendamm W. Uber das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstorenden Pilzen / W. Bavendamm // Ztschr. Pflanzenkh. und Planzenschutz Bd. – 1928. – 38. – P. 257 – 276.

Eggert C. The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase / C. Eggert, U. Temp, K.L Eriksson.// Applied and Environmental Microbiology. – 1996. – 62 (4). – P. 1151 – 1158.

Hammel K.E. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi / K.E. Hammel, A.N. Kapich, K.A.Jr. Jensen, Z.C. Ryan // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2002. – 30. – P. 445 – 453.

Jager A. Production of ligninases and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* / A. Jager, S. Croan, K. Kirk // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1985. – 50 (5). – P. 1274 – 1278.

Kirk K.T. 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, K.E. Murtagh, R.L. Farrell // *Enzyme Microbiol Technol*. – 1986. – 8. – P. 27 – 32.

Rosenberg E. Rate-limiting steps in the microbial degradation of petroleum hydrocarbons / E. Rosenberg, S. Navon-Venezia, I. Zilber-Rosenberg, E.Z. Ron. – In: *Soil and Aquifer Pollution*. / Edited by Rubin, H. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. – P. 159 – 172.

Tugrul T. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test / T. Tugrul, E. Cansunar // *World J. Microbiol. Biotechnol*. – 2005. – 21. – P. 851 – 853.

Venkatadri R. Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* / R. Venkatadri, R.L. Irvine // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1990. – 56 (9). – P. 2684 – 2691.

Weinberg E.D. Mineral element control of microbial secondary metabolism / E.D. Weinberg / in *Microorganisms and minerals*. – New York: Marcel Dekker, Inc., 1977. – P. 289-316.

Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.

Капич А.Н. Сопряжение перекисного окисления липидов с деградацией лигнина у дереворазрушающих базидиомицетов / А.Н. Капич // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты* : сб. науч. тр. – 2011. – Т. 3. – С. 316–335.

Рабинович М.Л. Разложение природных ароматических структур и ксенобиотиков грибами (обзор) / М.Л. Рабинович, А.В. Болобова, Л.Г. Васильченко // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2004. – 40, № 1. – С. 5–23.

Соломко Е.Ф. Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на поживних середовищах різного складу. / Е.Ф. Соломко, М.Л. Ломберг, Н.Ю. Митропольська, О.В. Чоловська // *Укр. ботан. журн*. – 2000. – 57, (2). – С. 119–126.

Федотов О.В. Вплив бензопірену на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107 / О.В. Федотов, О.В. Чайка, О.Г. Метрусенко // *Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону*. – Донецьк, ДонНУ, 2012. – № 1 (12). – С. 252–257.

Федотов О.В. Колекція культур шапинкових грибів – основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіомицетів /



О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська // Вісник Донецького національного університету. – Донецьк: ДонНУ, 2012. – № 1. – С. 209 – 213.

## REFERENCES

- Bavendamm, W. (1928). Uber das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstorenden Pilzen. Ztschr. Pflanzenkh. und Planzenschutz Bd. 38, 257–276.
- Dudka, I.A., Wasser, S.P., Elanskaya, I.A. (1982) Methods of experimental mycology. Naukova Dumka. 182-218
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.L. (1996). The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase. Applied and Environmental Microbiology. 62 (4), 1151–1158.
- Fedotov, O.V., Chaika, O.V., Metrusenko, O.G. (2012) The influence of benzopyrene intensity of lipid peroxidation *Pleurotus ostreatus* strains R-107. Problems of Ecology and Environment anthropogenic region, Donetsk. 1 (12), 252-257
- Fedotov, O.V., Chaika, O.V., Voloshko, T.E., Veligodska, A.K. (2012). Culture Collection of mushrooms – the basis of mycological research and strategy for biodiversity conservation basidiomycetes. Bulletin of Donetsk National University. Series A, 1, 209-213.
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A.Jr., Ryan, Z.C. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. Enzyme and Microbial Technology. 30, 445–453.



- Jager, A., Croan, S., Kirk, K. (1985). Production of ligninases and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 50 (5), 1274–1278.
- Kapich, A.N. (2011). Pairing lipid peroxidation degradation of lignin from wood Basidiomycetes. *Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects*. 3, 316-335
- Kirk, K.T., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E., Farrell, R.L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*, effect of selected growth conditions and the use of a mutant strain. *Enzyme Microbiol Technol*. 8, 27–32.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.B., Vasil'chenko, L.G. (2004). The decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics by mushrooms (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(1), 5-23.
- Rosenberg, E., Navon-Venezia, S., Zilber-Rosenberg, I., Ron, E.Z. (1998). Rate-limiting steps in the microbial degradation of petroleum hydrocarbons. In: *Soil and Aquifer Pollution*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Solomko, E.F., Lomberg, M.L. (2000) The growth of some medications macromycetes on nutrient media of different composition. *Ukrainian Botanical Journal*, 57 (2), 119-126
- Tugrul, T., Cansunar, E. (2005). Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 21, 851–853.



Venkatadri, R., Irvine, R.L. (1990). Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (9), 2684–2691.

Weinberg, E.D. (1977). Mineral element control of microbial secondary metabolism in microorganisms and minerals. New York: Marcel Dekker, Inc.

*Поступила в редакцію 25.10.2015*

**Как цитировать:**

Федотов, О.В., Клименко, С.Ю. (2015). Деструкція ксенобіотиків з використанням культурального фільтрату ксилотрофів. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 5 (3), 55-72. **crossref** <http://dx.doi.org/10.7905/bbmspu.v5i3.986>

© Федотов, Клименко, 2015

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)