УДК 581.192:582.287.37

© О. В. Федотов, М. С. Перцевой

МІКОТЕСТУВАННЯ ЗАБРУДНЕННЯ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА ФЕНОЛОМ

Донецький національний університет; 83050, м. Донецьк, вул. Щорса, 46
e-mail: bio.graff@yandex.ua

Федотов О. В., Перцевой М. С. **Мікотестування забруднення навколишнього середовища фенолом. –** Вивчався вплив фенолу на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) штамів лікарського базидіоміцета *Flammulina velutipes*. Інтенсивність ПОЛ визначали за допомогою тесту з тіобарбітуровою кислотою. Аналіз експериментального матеріалу показує, що під дією фенолу суттєво змінюється вміст малонового діальдегіду (МДА) в досліджуваних зразках міцелію і культурального фільтрату, що вказує на можливість використання *Flammulina velutipes* у мікотестуванні забруднення навколишнього середовища цим полютантом.

Ключові слова: їстівні лікарські базидіоміцети, *Flammulina velutipes*, перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), фенол.

Вступ

Забруднення навколишнього середовища та як наслідок погіршення здоров’я населення зумовлюють актуальність пошуку і розробки ефективних способів утилізації промислових відходів, біоіндикації і моніторингу екологічного стану антропогеннозміненого середовища [1, 10].

Біотичний підхід є сучасною тенденцією в екологічному контролі шкідливих впливів, оскільки хімічний аналіз свідчить лише про наявність «маркерів» – певних концентрацій забруднювачів і нічого не говорить про стан і перспективу розвитку різних компонентів біоти й екосистеми в цілому. Тому гострою й актуальною проблемою екологічного контролю є вибір інформативних біологічних показників та адаптація біологічних методів для екоконтролю [2, 11].

Як показують результати досліджень, до ефективних, тобто чутливих, біоіндикаторів (тест-об'єктів) відносяться лишайники, мохи, ґрунтові і водяні мікроорганізми: водорості, бактерії, мікрогриби [1, 12]. Роботи щодо використання вищих грибів у якості біоіндикаторів поодинокі [11]. Велике значення макроміцетів у забезпеченні нормального функціонування природних екосистем виправдовує необхідність практичного застосування результатів мікологічних досліджень, включення мікологічних показників у системи біотичних спостережень. Вивчення реакцій окремих видів на забруднення різних типів може послужити у проведенні якісного та всебічного тестування навколишнього середовища [8].

Отже, використання макроміцетів у діагностиці екологічного стану довкілля відкриває новий напрямок їх практичного застосування [7]. Окрім того, актуальним є удосконалення методів біологічного моніторингу, котрі передбачають ідентифікацію забруднюючих речовин та встановлення їх концентрації [1, 8].

У науковій літературі з’являється все більше способів біотестування навколишнього середовища [3, 7-9, 12].

Зокрема, розроблено спосіб визначення гострої токсичності води на водоростях *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. [7]. Методика ґрунтується на встановленні різниці між інтенсивністю росту водоростей у воді, що аналізується (дослід), та воді, яка не містить токсичних речовин (контроль). У якості стандартного токсиканту використовується біхромат калію в діапазоні концентрацій 1,3-2,5 мг/л. Недоліками цього способу є необхідність постійного культивування водоростей в лабораторних умовах, отримання результатів лише через 96 годин біотестування [8].

Опрацьовано спосіб проведення біоіндикації [12], на основі використання міксоміцетів для дослідження токсичності нафтозабруднених ґрунтів, а також ґрунтів з надлишковим засоленням пластовими водами, що формуються на відвалах фосфогіпсу та знаходяться в зоні металургійних комбінатів. Згідно цього способу проводять експрес-оцінку ступеня токсичного навантаження на природні системи, аналізують вплив замочування спор у

розчинах біхромату калію на їх проростання, а саме: в лабораторних умовах на агаризованих середовищах вирощують міцелій різних видів міксоміцетів, змивають конідії з поверхні культури, замочують спори в розчинах біхромату калію таких концентрацій – 0,5 ppm, 50 ppm та підраховують кількість пророслих конідій. На основі отриманих даних інгібування проростання конідій встановлюють чутливість до токсиканту. Недоліками цього способу є патогенність міксоміцетів по відношенню до людини, яка виявляється в здатності викликати алергічні реакції, а також необхідність постійного культивування грибів у лабораторних умовах.

Розроблені та апробовані біосорбенти для очистки поверхні природних і штучних водойм, стічних вод і рідких відходів виробництв від забруднення нафтою і нафтопродуктами з одночасною утилізацією забруднення мікроорганізмами. Біосорбенти включають біомасу штамів певних мікроміцетів чи їх консорціум [3]. Запропоновані способи не містять дані щодо реакцій окремих видів мікроміцетів на забруднення нафтою і нафтопродуктами.

Запатентовано спосіб біотестування забруднення навколишнього середовища полютантами з використанням грибів [8]. Спосіб полягає в тому, що шляхом здійснення експрес-оцінки ступеня токсичного навантаження на природні системи, аналізу впливу замочування спор у розчинах біхромату калію на їх проростання згідно з корисною моделлю, що заявляється, отримують з плодових тіл зморшкових грибів стерильні відбитки аскоспор, визначають вплив розчинів біхромату калію при концентраціях – 1,3; 1,5; 1,7; 1,9; 2,1; 2,3; 2,5 та 3 мг/л на проростання аскоспор та формування ростових трубок, а ступінь токсичного навантаження на природні системи визначають за відсотком зниження чисельності пророслих спор. Недоліком цього способу є необхідність зберігання аскоспор з певними характеристиками проростання чи постійного культивування зморшкових грибів для отримання аскоспор.

Нами запропонований спосіб визначення стресового стану базидіоміцетів та екологічного стану місця їх зростання за вмістом продуктів перекисного окиснення ліпідів [9]. З метою індикації стану базидіоміцетів та діагностики екологічного стану довкілля спосіб містить визначення вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів у міцелії дикоростучих плодових тілах базидіоміцетів з різних за екологічними умовами місць зростання та міцеліальних культурах цих грибів при штучному культивуванні в оптимальних умовах і за дії температурних стресорів. Недоліками цього способу є необхідність збору дикорослих плодових тіл певних базидіоміцетів на визначених територіях чи культивування їх у лабораторних умовах.

Метою роботи було вивчення впливу фенолу на інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів культури *Flammulina velutipes* і на основі цих показників визначення порогу чутливості штаму F-610 до фенолу та розробка способу мікотестування забруднення навколишнього середовища цим полютантом.

Об’єкт і методи дослідження

Об’єктом дослідження був штам F-610 *F. velutipes*. Для вивчення динаміки росту і інтенсивності процесів ПОЛ штам F-610 культивували поверхнево на глюкозо-пептонному середовищі об’ємом 50 мл в колбах Erlenmeyer ємністю 250 мл при температурі 27,5°С протягом 20 діб. Початкове pH живильного середовища – 6,0-6,5 од. Ріст штаму оцінювали за накопиченням біомаси (абсолютно сухий міцелій) ваговим методом [4, 5]. Для оцінки активності процесів ПОЛ використовували тест з тіобарбітуровою кислотою – ТБК-тест. Метод заснований на визначенні кількості забарвленого продукту, який має максимум поглинання в червоному видимому спектрі при 532 нм. Забарвлений продукт утворюється в результаті взаємодії двох молекул ТБК з однією молекулою малонового діальдегіду (МДА) – одного із вторинних продуктів ПОЛ. Встановлено, що реакцію з ТБК дає не тільки МДА, а й багато інших карбонільних сполук, які утворюються під час ПОЛ. Тому разом їх називають ТБК-активні продукти (ТБК-АП) [6]. Вміст продуктів ПОЛ у міцелії та культуральному

фільтраті (КФ) визначали на 5, 10, 15 і 20-ту добу культивування. Для отримання гомогенату (МГ) міцелій відділяли від КФ і розтирали в ступці при +5°С. Суміш центрифугували при 3000 об/ хв. протягом 10 хв. Визначали вміст продуктів ПОЛ у мікологічному матеріалі в присутності 20% трихлороцтової кислоти. Вміст ТБК-АП перераховували на вміст у наномолях МДА на 1 г (мл) маси досліджуваного матеріалу [6]. pH розчинів визначали потенціометричним методом. Одержані цифрові дані обробляли за методом дисперсійного аналізу, порівняння середніх величин проводили за методом Дункана із застосуванням пакету програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів [13].

Результати та їх обговорення

Постановка досліду з вивчення впливу фенолу на міцеліальну культуру штаму F-610 *F. velutipes* мала три стадії (рис. 1) і починалась із встановлення динаміки росту – накопичення біомаси та інтенсивності процесів ПОЛ у міцелії та культуральній рідині досліджуваного штаму.

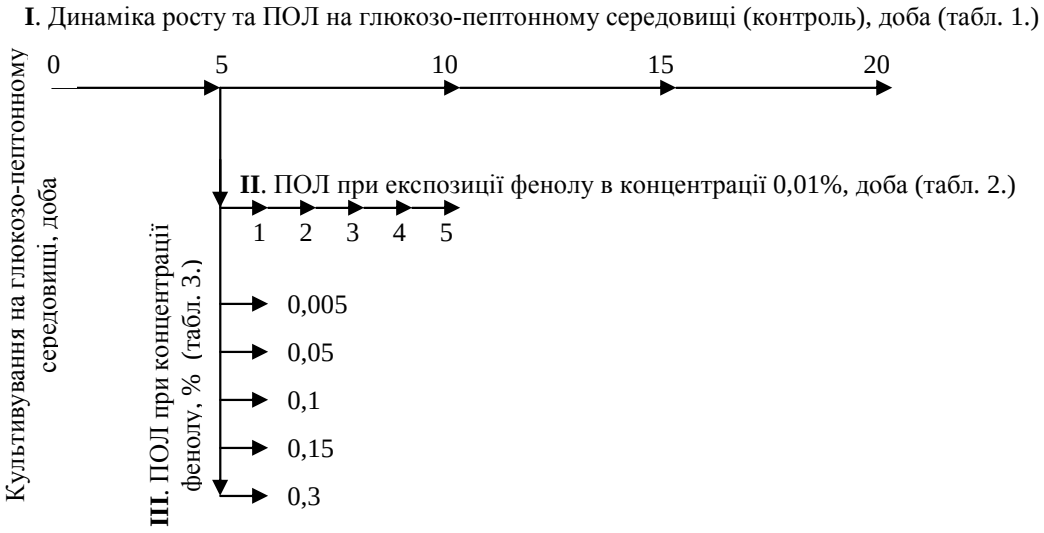

Рис. 1. Схема постановки досліду з вивчення впливу фенолу на міцеліальну культуру штаму F-610 *Flammulina velutipes*.

Результати цього дослідження, які представлені в табл. 1, використовувались у подальшому з метою встановлення як впливу фенолу на ПОЛ культури базидіоміцету *F. velutipes*, так і її порогу чутливості до цього полютанту.

Таблиця 1

Динаміка росту та інтенсивності перекисного окислення ліпідів штаму F-610 *Flammulina velutipes*

Час культивування, доба	Біомаса, г/ л	pH КФ	Вміст ТБК-АП, нмоль МДА / г (мл)	
			МГ	КФ
5	1,24 ± 0,21	6,10	16,77 ± 0,05	11,70 ± 0,20
10	2,98 ± 0,16	5,94	14,85 ± 0,13	9,55 ± 0,05
15	3,63 ± 0,09	6,28	4,51 ± 0,04	4,01 ± 0,04
20	3,15 ± 0,16	6,28	3,74 ± 0,04	2,27 ± 0,09

Дані динаміки росту та інтенсивності процесів ПОЛ досліджуваного штаму говорять про наступне. Найвищий вміст ТБК-АП як у КФ, так і в міцелії припадає на 5-ту добу культивування; мінімальний – на 20-ту добу росту. Між зареєстрованими величинами

накопичення біомаси й інтенсивності перекисного окислення ліпідів не існує вірогідної залежності.

Наступним етапом дослідження було визначення вмісту продуктів ПОЛ штаму F-610 гриба *F. velutipes* залежно від часу експозиції фенолу в концентрації 0,01%.

Штам культивували в тих же умовах, що і в попередньому досліді, протягом 5 діб, після цього в колби вносили фенол у кінцевій концентрації 0,01%. Результати впливу фенолу на інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів штаму F-610 наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Вміст продуктів ПОЛ штаму F-610 гриба *Flammulina velutipes* залежно від часу експозиції фенолу в концентрації 0,01%

Час експозиції фенолу, доба	Вміст ТБК-АП, нмоль МДА / г (мл)			
	МГ		КФ	
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль
1	26,83 ± 0,01	16,77 ± 0,05	16,75 ± 0,09	11,70 ± 0,20
2	25,00 ± 0,88	16,20 ± 0,10	18,30 ± 0,68	11,00 ± 0,68
3	22,75 ± 0,02	16,20 ± 0,05	22,94 ± 0,04	10,65 ± 0,92
4	19,05 ± 0,29	15,15 ± 0,03	19,25 ± 0,92	10,50 ± 0,27
5	18,60 ± 0,05	14,85 ± 0,13	11,35 ± 0,34	9,55 ± 0,05

Виявлено вірогідний вплив фенолу в концентрації 0,01% на вміст ТБК-активних продуктів як у міцелії, так і в культуральному фільтраті. Максимальна кількість продуктів ПОЛ у міцелії зафіксована на 24 годину експозиції фенолу і перевищувала цей показник у контролі в 1,6 рази; у КФ – на 72 годину і зросла порівняно з контролем у 2,16 рази.

Далі вивчали вплив різних концентрацій фенолу на інтенсивність процесів ПОЛ штаму F-610. Штам культивували в стандартних умовах протягом 5 діб, після чого в колби вносили фенол у кінцевій концентрації 0,005; 0,01; 0,05; 0,01 та 0,15%. Обрані концентрації перевищують ГДК фенолу (0,01 мг/м^3 – у повітрі та 0,001 мг/дм^3 – у воді). Вміст продуктів ПОЛ визначали через 24 години експозиції фенолу.

Результати впливу різних концентрацій фенолу на інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів штаму F-610 *F. velutipes* представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив різних концентрацій фенолу на вміст продуктів ПОЛ штаму F-610 *Flammulina velutipes*

Концентрація фенолу, %	Вміст ТБК-АП, нмоль МДА / г (мл)	
	МГ	КФ
0,005	19,36 ± 0,52	12,67 ± 0,95
0,01	26,83 ± 0,01	16,75 ± 0,09
0,05	167,50 ± 9,05	23,30 ± 0,45
0,1	62,03 ± 0,82	27,68 ± 0,45
0,15	32,93 ± 0,07	34,51 ± 0,21
0,3	17,05 ± 0,29	14,50 ± 1,75
контроль (0)	16,77 ± 0,05	11,70 ± 0,20

Вивчення впливу концентрацій фенолу в інтервалі від 0,005 до 0,15% на інтенсивність процесів ПОЛ досліджуваного штаму показало наступне. Зміна вмісту продуктів ПОЛ в культуральній рідині при концентрацій фенолу 0,005% порівняно з контролем не є вірогідною. Отже, поріг чутливості на фенол – найменша величина параметра, яку може фіксувати штам F-610, є концентрація 0,01%. При цій концентрації вміст ТБК-АП у міцелії

перевищує контрольний в 1,6 рази, а у культуральній рідині – в 1,4 рази. Максимальна кількість продуктів ПОЛ у міцелії була зафіксована при концентрації фенолу 0,05% і перевищила контрольну в 9,99 рази. Найбільший вміст ТБК-АП у КФ зафіксовано при концентрації 0,15%, що в 2,95 рази більше за контрольну пробу. Концентрація фенолу в 0,15% є верхнім порогом чутливості для штаму F-610 *F. velutipes,* оскільки подальше підвищення концентрації фенолу в середовищі до 0,3% веде до пригнічення процесів перекисного окиснення ліпідів у міцелії та зменшення вмісту їх продуктів у культуральній рідині.

Висновки

Фенол впливає на процеси ПОЛ і зумовлює їх інтенсифікацію як у міцелії, так і в культуральному фільтраті *F. velutipes*. Максимальне нагромадження продуктів ПОЛ у міцелії зафіксовано на 24 годину експозиції фенолу в концентрації 0,01%, а в КФ – на 72 годину досліду. Максимальна кількість ТБК-активних продуктів у міцелії спостерігається при концентрації фенолу 0,05%, а в культуральному фільтраті – 0,15%. Поріг чутливості на фенол – найменша величина параметра, яку може фіксувати штам F-610, є концентрація 0,01%. Концентрація цього полютанту 0,3% веде до пригнічення процесів перекисного окиснення ліпідів. Отже, міцеліальні культури *F. velutipes* мають достовірний відгук на дію фенолу, що вказує на можливість використання їх для мікологічного тестування забруднення навколишнього середовища цією речовиною.

Список літератури

1. *Мелехова О. П.* Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студентов вузов / О. П. Мелехова, Е. И. Сарапульцева, Т. И. Евсеева – М.: Академия, 2007. – 287 с.

2. Биомодификатор для определения фенола и его производных / Цивилева О. М., Никитина В. Е., Кучменко Т. А., Силина Ю. Е. // Патент 2346051 Россия МПК 7 C12Q 1/00, Ин-т биохимии и физиол. растений и микрооганизмов РАН № 20071106772/13; заявл. 26.02.07; опубл. 10.02.09 // Бюл. № 4.

3. Биосорбент для очистки водоемов от нефтепродуктов на основе бактерий и дрожжевых грибов / Хабибуллина Ф. М., Арчегова И. Б., Ибатуллина И. З. и др. // Патент 2318736 Россия МПК 7 C02F 3/34, Ин-т биологии КНЦ УрО РАН № 2006104082/13, заявл. 10.02.06; опубл. 10.03.08. // Бюл. № 4.

4. *Бисько Н .А.* Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Н. А. Бисько, А. С. Бухало, С. П. Вассер, И. А Дудка. – К.: Наук. думка, 1983. – 312 с.

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

6. *Капич А. Н.* Содержание в грибах продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой / А. Н. Капич, Т. С. Гвоздкова // Микол. и фитопатол. – 1998. – Т. 32, вып. 4. – С. 30–36.

7. *Крайнюкова А. М.* Методика визначення гострої токсичності води на водоростях *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Breb. / А. М. Крайнюкова, Л. А. Васьковець, С. А. Соколова. КНД 211.1.4.058-97: Затв. Мінекобезпеки України 21.05.97. – Київ, 1997. – 24 с.

8. Спосіб біотестування забруднення навколишнього середовища полютантами з використанням грибів / Сухомлин М. М., Куткова О. В. // Патент 41752 Україна МПК (2009) A01H 15/00, A01G 7/00, Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, № u200814059; заявл. 05.12.08; опубл.10.06.09. // Бюл. № 11.

9. Спосіб визначення стресового стану базидіоміцетів та екологічного стану місця їх зростання за вмістом продуктів перекисного окиснення ліпідів / Федотов О. В. Патент 12384 Україна МПК A01G 7/00, C30B 28/00, C04B 35/00, A01H 3/00, Донецький національний університет, № u200504732; заявл. 20.05.05; опубл. 15.02.06. // Бюл. № 2.

10. *Терехова В. А.* Биоиндикационное значение микромицетов в экологической оценке водных и наземных экосистем: Автореф. дис. … д-ра биол. наук: 03.00.16 / Моск. гос. ун-т им. М. В. Ломоносова. – М., 2004. – 48 с.

11. *Терехова В. А.* Микотестирование химических воздействий / В. А. Терехова // Материалы II Съезда микологов России. Современная микология в России. – М.: Национальная академия микологии, 2008. – Т. 2. – С. 106–108.

12. *Терехова В. А.* Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем / В. А. Терехова. – М.: Наука, 2007. – 216 с.

13. *Приседський Ю. Г.* Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів: Навч. пос. / Ю. Г. Приседський. – Донецьк: ДонНУ, 2005. – 75 с.

Федотов О. В., Перцевой М. С. **Микотестирование загрязнения окружающей среды фенолом.** – Изучалось влияние фенола на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) штаммов лекарственного базидиомицета *Flammulina velutipes*. Интенсивность ПОЛ определяли с помощью теста с тиобарбитуровой кислотой. Анализ экспериментального материала показывает, что под действием фенола существенно изменяется содержание малонового диальдегида (МДА) в исследуемых образцах мицелия и культурального фильтрата, что указывает на возможность использования *Flammulina velutipes* в микотестировании загрязнения окружающей среды этим полютантом.

Ключевые слова: съедобные лекарственные базидиомицеты, *Flammulina velutipes*, перекисное окисление липидов (ПОЛ), фенол.

Fedotov O. V., Pertsevoy M. S. **The mycological testing of environmental pollution by phenol**. – The phenol influence on peroxidate oxidation of lipids (POL) by strains of medicinal basidiomycete *Flammulina velutipes* was studied. The intensity of POL was indicated by test of thiobarbituric acid. The content of malonic dialdehyde (MDA) in testing samples of mycelium and cultural filtrate essentially changed. It indicates in use possibility *Flammulina velutipes* in the mycological testing of environmental pollution by this pollutant.

Key words: edible medicinal basidiomycetes, *Flammulina velutipes*, peroxidate oxidation of lipids (POL), phenol.