

УДК 582.284 : 57.083.132 : 577.125

© О. В. Федотов, О. В. Чайка, О. Г. Метрусенко

ВПЛИВ БЕНЗОПІРЕНУ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ШТАМУ *PLEUROTUS OSTREATUS* P-107

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

Федотов О. В., Чайка О. В., Метрусенко О. Г. Вплив бензопірену на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107. – Розглянуто результати вивчення динаміки інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) штаму *Pleurotus ostreatus* P-107 на рідких живильних середовищах та впливу концентрацій бензопірену від 0,001 до 0,15% на вміст продуктів ПОЛ в культуральному фільтраті та міцелії штаму. Встановлено поріг чутливості на бензопірен за інтенсивністю процесів ПОЛ досліджуваного штаму та запропоновано метод його використання у біоіндикації цього поліотанту.

Ключові слова: біоіндикація, бензопірен, перекисне окиснення ліпідів, *Pleurotus ostreatus*, культуральний фільтрат, міцелій.

Вступ

Результати моніторингових досліджень екологічного стану територій Донбасу показують, що в антропогенний період його розвитку відбулися значні хімічні перетворення практично всіх компонентів біосфери регіону [6, 17]. Значне техногенне навантаження призводить до деградації довкілля, надмірного забруднення поверхневих і підземних вод, атмосферного повітря та ґрунтів, накопичення величезної кількості промислових і побутових відходів. Донбас є щільно заселеним, і всі техногенні перетворення як наслідок відбуваються на здоров'ї мешканців регіону.

Забруднення навколишнього середовища зумовлює необхідність проведення комплексного моніторингу екологічного стану антропогенно зміненого середовища та розробки ефективних методів біоіндикації і способів утилізації промислових відходів [5, 12, 18, 19].

Мікоіндикація – один з напрямів у біоіндикації, який використовує як організми-індикатори гриби. Індикаторні властивості грибів на даний момент все більше затребувані при оцінці стану навколишнього середовища [1, 4, 5, 18]. Глива звичайна *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kuntm. відноситься до екологічної групи грибів деструкторів деревини – ксилотрофів. Культури гливи звичайної перспективні для біотехнологічного використання для отримання біологічно активних речовин [16, 20]. *P. ostreatus* є типовим та широко розповсюдженим грибом для Донецького регіону з добре вивченою біологією, а отже, може бути використаний в мікоіндикації. Досить перспективними також є дослідження біотехнологічних методів біодеградації фенольних сполук [9]. Деградація цих сполук у природі – складний багатоступінчатий та надзвичайно тривалий, а тому й низькопродуктивний процес, який здійснюють ґрунтові мікроорганізми. Лігнотрофні гриби відомі як деструктори складних лігноцелюлозних комплексів деревини, здатні до ефективного розкладу і фенольних сполук [9, 13].

Як відомо, фенольні сполуки є найбільш токсичними та широко розповсюдженими забруднювачами навколишнього середовища [6, 11], тому актуальним є пошук ефективних організмів – індикаторів цих речовин.

Бензопірен (рис. 1.) – $C_{20}H_{12}$, п'ятикільцевий поліциклічний ароматичний вуглеводень, утворюється при піролізі ацетилену, стирулу, тетраліну [7].

Бензопірен міститься в кам'яновугільній смолі, сирій нафті, тютюновому димі, забрудненому повітрі великих міст, особливо біля магістралей, а також у ґрунті поблизу бензоаправних станцій. Це дуже сильний мутаген і канцероген, один з найнебезпечніших вуглеводнів, є загрозою для здоров'я в будь-якій кількості. Спроби організму знешкодити бензопірен призводять до утворення іншої, ще більш токсичної речовини, спроможної безпосередньо ушкоджувати ДНК [6, 7, 11]. На даний момент в Україні є діючою ГДК бензопірену для повітря – 0,01 мг/м³, води – 0,005 мкг/дм³, ґрунту – 0,02 мг/кг.

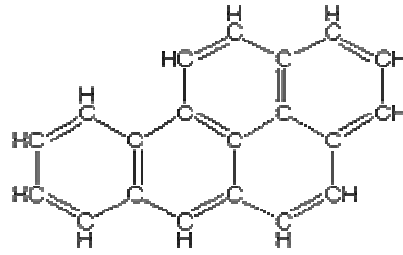


Рис. 1. Структурна формула бензопірену.

Встановлено, що вільнорадикальні процеси, зокрема реакції перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) залучені до транспорту електронів у ланцюзі дихальних ферментів, проліферації і диференціювання клітин й регуляції ліпідного складу біологічних мембран тощо [2, 9]. Інтенсивність цих процесів проявляється за конститутивним та індукційним типами. Другий тип розвивається у відповідь на зміну умов навколишнього середовища [2, 8, 10]. Тобто інтенсивність процесів ПОЛ є показником фізіологічного стану організму-індикатора.

Таким чином, цікавим є вивчення впливу поллютантів фенольної природи на рівень інтенсивності процесів ПОЛ мікологічних організмів з метою розробки способів індикації цього забруднення.

З урахуванням вищезазначеного, метою даної роботи було дослідження впливу бензопірену на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалами дослідження були міцелії та культуральний фільтрат (КФ) штаму P-107 гливи звичайної *P. ostreatus* колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології рослин ДонНУ [16]. Штам отриманий з дикоростучих плодівих тіл зі Слов'янського лісництва за загальновідомими методами [3].

Досліджуваний штам P-107 культивували при 27,5°C в культивувальних колбах ємністю 250 мл на рідкому глюкозо-пептонному (ГПС) та синтетичному (СС) живильних середовищах об'ємом 50 мл. ГПС мало такий склад, г/л: глюкоза – 10,0; пептон – 3,0; KH_2PO_4 – 0,6; K_2HPO_4 – 0,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,05; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; дистильована вода – до 1 л; а СС, г/л: глюкоза – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,3; KH_2PO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,1; FeSO_4 – 0,02; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, дистильована вода – до 1 л.

Використовували наступні методи досліджень. Інтенсивність процесів ПОЛ в міцелії та КФ визначали за вмістом продуктів, активних до тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП), з використанням модифікованого методу. В основі методу лежить реакція між малоновим дільдегідом (МДА) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), що веде до утворення забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 532 нм [15].

Досліди проводили у трикратній повторності, отримані експериментальні дані обробляли з використанням програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. Достовірною вважається різниця при показнику достовірності $P > 0,95$. Експериментальні дані представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – похибка середньої [14].

Результати дослідження та їх аналіз

Постановка досліду з вивчення впливу бензопірену на міцеліальну культуру *P. ostreatus* P-107 починалась зі встановлення конститутивної динаміки інтенсивності процесів ПОЛ у міцелії та КФ досліджуваного штаму під час його росту на ГПС та на СС протягом 15 діб (табл. 1.).

Таблиця 1

Динаміка інтенсивності процесів ПОЛ штаму P-107 *P. ostreatus* на ГПС та на СС

Термін культивування, доба	Вміст ТБК-АП, нмоль/г (мл)			
	ГПС		СС	
	Міцелій	КФ	Міцелій	КФ
6	103,14±7,26	1,48±0,06	210,46±11,01	1,65±0,07
9	90,00±3,27	1,17±0,04	116,30±1,31	1,29±0,08
12	112,61±6,29	1,11±0,07	197,88±7,34	1,12±0,06
15	67,38±2,84	1,13±0,10	127,86±5,55	1,11±0,09

Із табл. 1 видно, що на синтетичному живильному середовищі спостерігались більш високі показники інтенсивності процесів ПОЛ в міцелії штаму *P. ostreatus* P-107, ніж на глюкозо-пептонному середовищі. Під час його росту на даних живильних середовищах високий вміст продуктів ПОЛ в міцелії було встановлено на 6-ту і 12-ту добу, а відносно низький – на 9-ту і 15-ту добу. На ГПС максимальний вміст ТБК-АП в міцелії зафіксовано на 12-ту, а мінімальний – на 15-ту добу. На СС цей показник мав максимальне значення 6-ту, а мінімальне на 9-ту добу ферментації.

Максимальний вміст ТБК-АП у культуральному фільтраті припадає на 6-ту добу ферментації як на ГПС, так і на СС. Далі відбувається незначне поступове зниження вмісту ТБК-АП до мінімального рівня наприкінці культивування на обох живильних середовищах.

Періодичність активності процесів ПОЛ в міцелії може бути пояснена генотиповими біосинтетичними особливостями штаму. Аналіз цих даних дозволив обрати ГПС, як більш придатне, для культивування та встановлення впливу бензопірену на штам *P. ostreatus* P-107.

Виходячи з того, що глибинний метод культивування дозволяє інтенсифікувати обмінні процеси культури і скоротити термін ферментації, наступним завданням дослідження було встановлення та порівняння динаміки інтенсивності процесів ПОЛ штаму P-107 *P. ostreatus* при поверхневому (ПК) та глибинному культивуванні (ГК) на ГПС.

Результати цього дослідження представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Динаміка інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів штаму P-107 *P. ostreatus* при поверхневому та глибинному культивуванні

Термін культивування, доба	Вміст ТБК-АП, нмоль/г (мл)			
	ПК		ГК	
	Міцелій	КФ	Міцелій	КФ
6	103,04±10,30	1,36±0,08	88,55±7,85	1,27±0,07
9	77,97±7,55	1,22±0,07	86,70±7,72	1,22±0,09
12	98,50±9,65	1,05±0,09	68,29±6,91	0,96±0,09

Отримані дані свідчать про наступне. Вміст ТБК-АП у міцелії значно вищий, ніж у культуральній рідині штаму P-107. У міцелії максимальну інтенсивність процесів ПОЛ встановлено на 6-ту добу ферментації як при поверхневому, так і при глибинному культивуванні, а мінімальну – на 9-ту при ПК та на 12-ту – при ГК. Максимальний вміст ТБК-АП за абсолютними показниками в КФ припадає на 6-ту добу ферментації. При подальшому культивуванні відбувається незначне, але поступове зниження інтенсивності процесів ПОЛ.

Отже, при глибинному культивуванні внаслідок механічного перемішування середовища та прискорення дифузії речовин створюються більш сприятливі умови росту культури, що відображається в нижчій інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів, ніж при поверхневому. Тому для подальших досліджень застосовувався метод глибинного культивування. Результати цього дослідження використовувались у подальшому з метою встановлення впливу бензопірену на інтенсивність процесів ПОЛ штаму та порог

чутливості до нього.

Наступним етапом експерименту було вивчення вмісту продуктів ПОЛ штаму P-107 залежно від часу експозиції бензопірену в концентрації 0,01%. Штам культивували на ГПС глибинним методом протягом 6 діб, після цього в колби вносили бензопірен у кінцевій концентрації 0,01%. Результати впливу бензопірену на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів штаму P-107 представлені у табл. 3.

Таблиця 3

Вплив бензопірену (в концентрації 0,01%) на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів штаму P-107 гриба *Pleurotus ostreatus* в залежності від часу культивування

Експозиція бензопірену, доба	Вміст ТБК-АП, нмоль/ г (мл)			
	Міцелій		КФ	
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль
1	65,50 ± 0,01	90,70 ± 0,01	6,75 ± 0,03	1,25 ± 0,01
2	308,05 ± 1,88	90,80 ± 0,21	8,30 ± 1,68	1,70 ± 0,08
3	116,75 ± 0,92	90,70 ± 0,36	10,40 ± 1,84	1,65 ± 0,02
4	95,05 ± 1,29	90,75 ± 0,45	11,25 ± 0,92	1,20 ± 0,07
5	90,10 ± 1,25	90,85 ± 0,43	9,35 ± 0,34	1,01 ± 0,05

Порівняння та статистичний аналіз показників вмісту продуктів ПОЛ залежно від часу культивування дослідів і контролю показує наступне.

Виявлений достовірний вплив бензопірену на вміст ТБК-АП як в міцелії, так і в культуральному фільтраті. Культури, в які вносили бензопірен, мали вищі показники ТБК-АП міцелію в порівнянні з контролем, за виключенням першої доби експозиції діючої речовини. Максимальна активність ПОЛ в міцелії була зафіксована на 2 добу експозиції бензопірену. Максимальний вміст продуктів ПОЛ у культуральному фільтраті зафіксовано дослідних культур на 3 і 4 добу після внесення бензопірену.

Подальшим етапом експерименту стало вивчення впливу різних концентрацій бензопірену на інтенсивність процесів ПОЛ штаму P-107 *P. ostreatus*. Штам культивували в стандартних умовах протягом 6 діб, після чого в колби вносили бензопірен у кінцевій концентрації 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,15%. Обрані концентрації дорівнюють чи перевищують ГДК бензопірену. Вміст продуктів ПОЛ визначали через 24 години після внесення бензопірену.

Таблиця 4

Вплив різних концентрацій бензопірену на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів штаму P-107 *Pleurotus ostreatus*

Концентрація бензопірену, %	Вміст ТБК-АП, нмоль/ г (мг)	
	Міцелій	КФ
0,005	99,36 ± 0,52	1,97 ± 0,05
0,01	308,05 ± 0,92	8,40 ± 0,84
0,05	367,50 ± 0,05	10,30 ± 0,45
0,1	122,03 ± 0,82	2,68 ± 0,45
0,15	102,93 ± 0,07	1,87 ± 0,21
контроль (0)	90,23 ± 0,68	1,27 ± 0,02

Порівняння отриманих показників вмісту продуктів ПОЛ показує наступне. Статистично доведено достовірний вплив бензопірену на вміст ТБК-АП як в міцелії, так і в культуральному фільтраті: культури, в які вносили бензопірен, мали вищі показники інтенсивності ПОЛ в порівнянні з контролем (ГПС). Поріг чутливості штаму P-107 до бензопірену складає 0,005%, але максимальна кількість ТБК-АП в міцелії та культуральному фільтраті була зафіксована при концентрації бензопірену 0,05%.

Висновки

Глибинне культивування на глюкозо-пептонному живильному середовищі за показниками інтенсивності ПОЛ є більш сприятливими для культивування штаму *P. ostreatus* P-107. Виявлений поріг чутливості штаму P-107 до бензопірену в концентрації 0,005%, але максимальна кількість ТБК-АП в міцелії та культуральному фільтраті була зафіксована при концентрації бензопірену 0,05%. Вивчення процесів перекисного окиснення ліпідів штамів базидіоміцетів може бути використане в оцінці впливу на них різноманітних поллютантів, зокрема бензопірену. На основі отриманих експериментальних даних запропоновано спосіб індикації бензопірену та визначення стресового стану базидіоміцетів за вмістом продуктів перекисного окиснення ліпідів.

Список літератури

1. *Арефьев С. П.* Дереворазрушающие грибы – индикаторы состояния леса / С. П. Арефьев // Вестн. экол., лесоведения и ландшафтоведения. – 2000. – № 1. – С. 91–105.
2. *Барабой В. А.* Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В. А. Барабой // Усп. совр. биол. – 1991. – Т. 11, вып. 6. – С. 923–931.
3. *Бухало А. С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – К.: Наук. думка, 1988. – 144 с.
4. *Гродзинська Г. А.* Макроміцети – біоіндикатори забруднення радіоцезієм лісових екосистем України / Г. А. Гродзинська, С. О. Сирчин, М. Д. Кучма, В. В. Конішук // Вісник НАН України. – 2008. – № 9. – С. 26–37.
5. *Дудка І. О.* Мікологічний моніторинг як засіб оцінки і прогнозування фітосанітарного стану лісових екосистем / І. О. Дудка, Т. О. Мережко, В. П. Гайова // Укр. ботан. журн. – 1994. – Т. 51, № 6. – С. 53–59.
6. 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.
7. *Ильницкий А. П.* Содержание бенз(а)пирена в сельскохозяйственных растениях / А. П. Ильницкий, П. Н. Краснянская, Л. Г. Соленова // Растения и химические канцерогены: сб. статей. – Л.: Наука, 1979. – С. 139–142.
8. *Капич А. Н.* Антиоксидантные свойства дереворазрушающих базидиомицетов / А. Н. Капич, Л. Н. Шишкина // Микол. и фитопатол. – 1992. – Т. 26, № 6. – С. 486–492.
9. *Капич А. Н.* Процессы перекисного окисления липидов у грибов (биотехнологические аспекты) // Проблемы микробиологии и биотехнологии. – Минск, 1998. – С. 185–188.
10. *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.
11. *Лукачев С. В.* Выброс канцерогенов при сжигании углеводородных топлив / С. В. Лукачев, С. Г. Матвеев, М. Ю. Орлов. – Самара: СГАУ, 2007. – 160 с.
12. *Мелехова О. П.* Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование: учеб. пос.е для студ. вузов / О. П. Мелехова, Е. И. Сарapultьцева, Т. И. Евсева. – М.: Академия, 2007. – 287 с.
13. Патент 57945 України. Спосіб мікотестування забруднення навколишнього середовища фенолом / Федотов О. В., Перцевой М. С. Заявка № u201009019, від 19.07.2010, МПК (2011.01), кл. А01G7/00, А01Н15/00. Бюл. № 6, від 25.03.2011.
14. *Приседський Ю. Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю. Г. Приседський. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.
15. *Стальная И. Д.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили / Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
16. *Федотов О. В.* Колекція культур шапинкових грибів – основа мікологічних

досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів / О. В. Федотов, О. В. Чайка, Т. Є. Волошко, А. К. Велигодська // Вісник Донецького національного університету. Сер. А. Природ. науки. – 2012. – № 1. – С. 209–213.

17. Федотов О. В. Мікотестування забруднення навколишнього середовища фенолом / О. В. Федотов, М. С. Перцевой // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2010. – № 1 (10). – С. 208–213.

18. Щеглов А.И. Грибы – биоиндикаторы техногенного загрязнения / А. И. Щеглов, О. Б. Цветнова // Природа. – 2002. – № 11. – С. 13–16.

19. International bioindicators. International conference on environmental bioindicators. – Praha, 2005.

20. Wasser S. P. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective / S. P. Wasser, A. L. Weis // Crit. Rev. Immunol. – 1999. – Vol. 19. – P. 65–96.

Федотов О. В., Чайка А. В., Метрусенко Е. Г. Влияние бенз(а)пирена на интенсивность процессов перекисного окисления липидов штамма *Pleurotus ostreatus* P-107. – Рассмотрены результаты исследования динамики интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) штамма *Pleurotus ostreatus* P-107 на жидких питательных средах и влияния концентраций бенз(а)пирена от 0,001 до 0,15% на содержание продуктов ПОЛ в культуральном фильтрате и мицелии штамма. Установлен порог чувствительности на бенз(а)пирен по интенсивности процессов ПОЛ исследуемого штамма и предложен метод его использования в биоиндикации этого поллютанта.

Ключевые слова: биоиндикация, бенз(а)пирен, перекисное окисление липидов, *Pleurotus ostreatus*, культуральный фильтрат, мицелий.

Fedotov O. V., Chaika O. V., Metrusenko O. G. Effect of benzo(a)pyrene on the intensity of strain *Pleurotus ostreatus* P-107 lipid peroxidation. – The results of the study in dynamics of strain *Pleurotus ostreatus* P-107 lipid peroxidation (LP) intensity at the liquid nutrient media and the effect of benzo(a)pyrene concentrations from 0,001 to 0,15% on the LP products density in the culture filtrate and P-107 strain mycelium are considered. The sensitivity threshold of studied strain for benzo(a)pyrene via the intensity of lipid peroxidation was established and the way for using the strain in biological indication of this pollutant was proposed.

Key words: biological indication, benzo(a)pyrene, lipid peroxidation, *Pleurotus ostreatus*, culture filtrate, mycelium.