

АКТИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ШТАММОВ КСИЛОТРОФНЫХ ГРИБОВ

А.В. ЧАЙКА, Ю.А. МОЛОДЦОВА

ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», Донецк (alexander.v.chaika@gmail.com)

THE FREE RADICAL LIPID PEROXIDATION ACTIVITY OF XYLOTROPHIC FUNGI STRAINS

A.V. CHAIKA, Yu.A. MOLODTSOVA

SEI HPE «Donetsk National University», Donetsk (alexander.v.chaika@gmail.com)

Резюме. В работе приведены данные об активности свободнорадикального перекисного окисления липидов в мицелии и культуральном фильтрате штаммов ксилотрофных грибов *Pleurotus eryngii* P-er и *Daedalea quercina* Dq-08 при глубинном культивировании. Установлено значительное изменение активности перекисного окисления липидов как в мицелии, так и в культуральном фильтрате штаммов.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, ксилотрофные базидиомицеты, глубинное культивирование.

Abstract. The paper deals with the data on the activity of free radical lipid peroxidation in mycelium and culture filtrate of xylotrophic fungi strains *Pleurotus eryngii* P-er and *Daedalea quercina* Dq-08 during the submerged cultivation. A significant alteration in lipid peroxidation activity both in the strains' mycelium and culture filtrate has been established.

Key words: lipid peroxidation, xylotrophic basidiomycetes, submerged cultivation.

В связи со значительным уровнем антропогенного давления на природную среду, возникает необходимость оценки степени загрязнения, установка градаций предельно до-

пустимых норм концентрации вредных веществ в почве, воде, воздухе. Кроме того, необходима разработка эффективных, экологически чистых технологий переработки отходов различных отраслей промышленности.

Среди методов, позволяющих оценить степень загрязнения окружающей среды, наиболее перспективным методом является биоиндикация. Нередко биоиндикаторы дают более точную оценку загрязнения по сравнению с физико-химическими методами анализа. В целях ранней диагностики нарушений предпочтительнее использовать биохимические и физиологические параметры живых организмов, так как они реагируют на очень незначительные концентрации стрессора. Это даёт возможность применять биоиндикацию в областях с загрязнённостью от низкой до средней, где наблюдать видимые повреждения организмов ещё невозможно [Кусова, 2012].

Чрезвычайно чувствительным ко всякому изменению факторов внешней среды является процесс свободнорадикального перекисного окисления липидов в клетках живых организмов. Это сложный многостадийный цепной процесс окисления липидных субстратов, главным образом полиненасыщенных жирных кислот, включающий стадии взаимодействия липидов со свободнорадикальными соединениями и образования свободных радикалов липидной природы [Капич, 2011]. Перекисное окисление липидов играет важную роль в жизнедеятельности живых организмов. Многие физиологические процессы разнообразных организмов в норме и при патологических изменениях протекают с участием свободных радикалов, образующихся в результате окислительно-восстановительных реакций. Однако при избыточном образовании свободных радикалов, не соответствующем физиологическим потребностям, реализуется их негативное воздействие. В клетках происходит нарушение регуляторных и защитных функций. Внедряясь в билипидный слой цитолеммы, свободные радикалы инициируют реакции перекисного окисления липидов мембраны, тем самым нарушая её функционирование и вызывая гибель клетки [Владимиров, 2000].

У ксилотрофных грибов с активностью перекисного окисления липидов связано функционирование лигнолитических ферментов. Благодаря этому они являются наиболее эффективными биодеструкторами в природе, что открывает широкие перспективы использования ксилотрофных грибов в качестве деструкторов различных загрязнителей антропогенного происхождения в технологиях биоремедиации окружающей среды. С другой стороны, при функционировании лигнолитической системы, ксилотрофные грибы сами постоянно подвергаются воздействию перекисных радикалов, что может приводить к нарушению метаболических процессов и гибели клеток [Капич, 2011].

В связи с этим, чрезвычайно важной задачей является изучение прооксидантно-антиоксидантного равновесия культур ксилотрофных грибов, вовлечённых в различные экологические биотехнологии.

Целью работы была оценка активности свободнорадикального перекисного окисления липидов штаммов ксилотрофных грибов.

Материалом исследования был глубинный мицелий и культуральный фильтрат (КФ) штаммов *Pleurotus eryngii* (Jacq.) P. Kumm. *P-er* и *Daedalea quercina* (L.) Pers. Dq-08. Штамм *P. eryngii P-er* относится к порядку *Agaricales* и является возбудителем белой гнили. Такой тип гнили поражает и целлюлозу, и лигнин, тем самым обесцвечивая древесину. Штамм *D. quercina* Dq-08 относится к порядку *Polyporales* и вызывает бурую гниль, поражающую преимущественно целлюлозу. При этом окисленный тёмный лигнин остаётся нетронутым, и поражённая древесина приобретает трещиноватую призматическую структуру.

Штаммы культивировали глубинным методом на модифицированной глюкозо-пептонной среде с минеральными элементами по Кирку [Kirk T.K., 1987], лигносульфонатом и твин-80 [Чайка, 2014]. Культивирование проводили в течение 11-ти суток при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Сырую и абсолютно сухую биомассу (АСБ) мицелия определяли весовым методом. По полученным данным рассчитывали прирост биомассы [Дудка, 1982].

Активность свободнорадикального перекисного окисления липидов глубинных культур ксилотрофов оценивали по уровню самопроизвольной и индуцированной интенсивности процессов перекисного окисления липидов в мицелии и КФ. Интенсивность процессов самопроизвольной липидной перекисации (ПОЛс) определяли модифицированным методом по содержанию продуктов ПОЛ, активных к тиобарбитуровой кислоте. Для создания условий индукции ПОЛ использовали инкубацию микологического материала в прооксидантной среде (ПОЛ_и). По этим показателям рассчитывали коэффициенты прооксидантной активности (ПОА) и равновесия прооксидантно-антиоксидантных процессов (К_р) мицелия и культурального фильтрата исследуемых культур [Чайка, 2017].

Эксперименты проводили в трёхкратной повторности. Полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием Microsoft Excel и пакета программ для проведения статистической обработки результатов биологических экспериментов.

Полученные показатели ПОЛс в мицелии и культуральном фильтрате исследуемых штаммов представлены на рисунке 1, а ПОЛ_и – на рисунке 2.

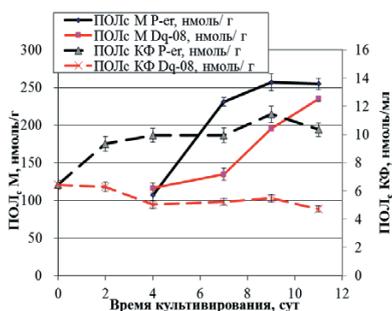


Рис. 1. Динамика интенсивности самопроизвольного ПОЛ в мицелии и культуральном фильтрате штаммов *P. eryngii* P-er и *D. quercina* Dq-08.

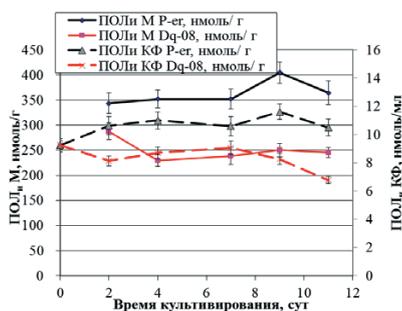


Рис. 2. Динамика интенсивности индуцированного ПОЛ в мицелии и культуральном фильтрате штаммов *P. eryngii* P-er и *D. quercina* Dq-08.

Можно отметить, что максимальные показатели ПОЛс и ПОЛ_и мицелия штамма *P. eryngii* P-er были зафиксированы на 9-е сутки культивирования. На графиках видно, что интенсивность ПОЛ в мицелии возрастает более чем в 2 раза с 4-х по 7-е сутки культивирования, в то время как уровень липидной перекисации при индукции остаётся на одном уровне. Интенсивность ПОЛс КФ штамма растёт на протяжении срока культивирования. Был получен коэффициент корреляции r между уровнем ПОЛс КФ и временем культивирования, который составил $0,81 \pm 0,1$. Установлено, что в КФ показатели ПОЛс практически совпадают с ПОЛ_и на 7–11-е сутки, а наибольшие отличия наблюдаются в начале культивирования, где разница составляет 31%.

По полученным значениям ПОЛс и ПОЛ_и были рассчитаны показатели прооксидантной активности мицелия и культурального фильтрата штамма *P. eryngii* P-er. Установлено, что во время культивирования прооксидантная активность как мицелия, так и КФ возрастает. Коэффициенты корреляции между этими параметрами и временем культивации составляют $0,89 \pm 0,09$ и $0,88 \pm 0,07$, соответственно. Возрастающие прооксидантной активности мицелия и КФ культуры может быть связано со снижением уровня антиоксидантов или ингибированием антиоксидантных ферментов, а также блокированием поставляющих водород процессов, например, при накоплении в среде продуктов метаболизма и истощении необходимых для роста веществ.

Анализ коэффициентов равновесия прооксидантно-антиоксидантных процессов в мицелии и КФ штамма *P. eryngii* P-ег показал, что в мицелии данный показатель значительно ниже, чем в КФ на протяжении всего срока культивирования. Причиной этого может быть высокая активность антиоксидантных систем в мицелии. K_p мицелия существенно возрастает в период с 4-х по 7-е сутки культивирования, но далее колебаний практически не испытывает, в то время как K_p культурального фильтрата имеет резкий скачок после 7-х суток культивирования с $15,45 \pm 1,73$ до $63,80 \pm 0,48$ ед.

Было установлено, что с течением времени культивирования в мицелии штамма *D. quercina* Dq-08 происходит увеличение интенсивности ПОЛс, а в КФ наблюдается обратная зависимость. Наибольшая разница между уровнями ПОЛс и ПОЛн мицелия данного штамма зафиксирована на 7-е сутки (49%). При этом уровень ПОЛн мицелия штамма во время культивирования постепенно растёт, наиболее интенсивно – в период 7-9-е сутки. Наивысшая интенсивность процессов ПОЛ при индукции в мицелии штамма *D. quercina* Dq-08 установлена на 11-е сутки культивирования.

Как видно на рисунке, максимальная интенсивность перекисного окисления в КФ штамма *D. quercina* Dq-08 отмечена в начале культивирования, а далее наблюдалось её постепенное снижение ($r = -0,82 \pm 0,1$). Максимальная разница показателей ПОЛс и ПОЛн в КФ данной культуры составила 42% на 7-9-е сутки культивирования, а наименьшая – в начале, а также на 11-е сутки культивирования.

В культуральном фильтрате исследуемого штамма наибольшие значения прооксидантной активности установлены на 2-е сутки культивирования. Наименьшие значения данного показателя получены на 4-е сутки культивирования.

Для мицелия штамма *D. quercina* Dq-08 характерен линейный рост значений ПОА в период с 4 по 11-е сутки культивирования. Это говорит об усилении прооксидантных процессов в мицелии исследуемой культуры с течением времени культивирования. Такая зависимость ПОА мицелия и срока культивирования была подтверждена статистически: коэффициент корреляции этих параметров r составляет $0,95 \pm 0,04$.

На протяжении всего срока культивирования, коэффициент равновесия K_p в культуральном фильтрате штамма *D. quercina* Dq-08 колебался в пределах $1,36-3,43$ ед., максимальные значения были установлены в начале культивации.

В мицелии максимальный уровень K_p приходится на 11-е сутки культивирования, причём до 9-х суток культивирования значения K_p изменяются незначительно, а в период с 9-х по 11-е сутки – возрастают более чем в 6 раз.

Сравнивая показатели перекисного окисления в мицелии штаммов белой (*P. eryngii* P-ег) и бурой (*D. quercina* Dq-08) гнили отметим, что уровень процессов ПОЛ выше у штамма *P. eryngii* P-ег, ксилотрофа белой гнили. При этом в мицелии исследуемых штаммов достоверно установлено постепенное смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону прооксидации на протяжении культивирования (коэффициенты корреляции r составляют $0,89 \pm 0,09$ для *P. eryngii* P-ег и $0,96 \pm 0,04$ для *D. quercina* Dq-08). Фазы наиболее резкого усиления процессов ПОЛ в мицелии наблюдаются у штамма *P. eryngii* P-ег в период с 4-х по 7-е сутки, а у штамма *D. quercina* Dq-08 – в период 7–11-е сутки. Что касается культурального фильтрата исследуемых штаммов, то здесь показатели интенсивности перекисного окисления липидов в начале культивирования находятся на одном уровне, а с течением времени отмечается постепенное усиление процессов липидной перекисации у штамма *P. eryngii* P-ег и первоначальное ослабление с последующим незначительным усилением – у штамма *D. quercina* Dq-08.

Таким образом, в течение культивирования исследуемых штаммов ксилотрофных грибов имеет место значительное изменение активности свободнорадикального перекисного окисления липидов как в мицелии, так и в КФ, что может быть отражением изменения физиологического состояния культур под влиянием накопления продуктов распада и истощения питательной среды.

ЛИТЕРАТУРА

- Владимиров Ю.А.** 2000. Свободные радикалы в биологических системах. *Сорос. образоват. журн.* 12: 13–19.
- Дудка И.А.** 1982. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наук.думка: 550 с.
- Капич А.Н.** 2011. Сопряжение перекисного окисления липидов с деградацией лигнина у дереворазрушающих базидиомицетов. *В кн.: Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Сборник научных трудов.* 3: 316–335.
- Кусова Н.Х., Оказова З.П., Маргиева М.С., Дзуццати Т.А.** 2012. Биоиндикация как метод контроля состояния окружающей среды. *В кн.: География: история, современность, перспективы.* Краснодар: Изд-во ФГБОУВПО «Кубанский государственный университет»: 228–232.
- Чайка О.В.** 2014. Оцінка екологічного стану довкілля з використанням прооксидантно-антиоксидантної активності культур базидіоміцетів. *Біоресурси і природокористування:* 6(1–2): 5–11.
- Чайка О.В.** 2017. Патент 114311 України. Спосіб визначення рівноваги прооксидантно-антиоксидантних процесів мікологічного матеріалу. Заявка № u201607936, від 18.07.2016, МПК (2006.01), кл. А01G 1/04, G01N 33/52. Бюл. № 5, від 10.03.2017.
- Kirk T.K., Farrell R.L.** 1987. Enzymatic «combustion»: the microbial degradation of lignin. *Annal. Rev. Microbiol.* 41: 465–505.