

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕГРАДАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ КСЕНОБИОТИКОВ ШТАММАМИ ГРИБОВ БЕЛОЙ ГНИЛИ

Д.В. ШЕРШЕНЬ, А.В. ЧАЙКА

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

THE DEGRADATION EFFECTIVENESS OF VARIOUS XENOBIOTICS BY WHITE-ROT FUNGI STRAINS

D.V. SHERSHEN, A.V. CHAIKA

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

Резюме. В работе приведены данные об эффективности деградации различных ксенобиотиков – синтетических красителей культуральным фильтратом глубоких культур ксилотрофных грибов *Trametes hirsuta* Th-11 и *Trametes versicolor* Tv-11-1. Установлено, что культуральный фильтрат исследуемых штаммов способен разрушать некоторые химически стойкие красители. Указанные штаммы обладают значительным потенциалом для использования в биоремедиационных технологиях.

Ключевые слова: ксилотрофные грибы, деградация, ксенобиотики, синтетические красители.

Abstract. The paper deals with the data on the effectiveness of various xenobiotics (synthetic dyes) degradation by culture filtrate of xylophilic fungi *Trametes hirsuta* Th-11 and *Trametes versicolor* Tv-11-1 deep cultures. It is established that the cultural filtrate of the researched strains is capable to destroy some chemically resistant dyes. The researched strains have the considerable potential for use in bioremediation technologies.

Key words: xylophilic fungi, degradation, xenobiotics, synthetic dyes.

Одна из важнейших экологических проблем в настоящее время – загрязнение окружающей среды, то есть неестественное увеличение концентрации каких-либо элементов в среде, или привнесение новых токсических элементов. Это приводит к тому, что нарушаются функции и состав окружающей среды, которые влекут к её изменениям и приводят к неблагоприятным последствиям. Загрязнение касается всех основных составляющих при-

роды – земли, воды и воздуха, его источники охватывают все сферы деятельности человека, от производственной до бытовой. Основные вещества, загрязняющие почву, следующие: химические элементы и соединения (в особенности тяжелые металлы), нефть и нефтепродукты, пестициды, минеральные и органические удобрения, текстильные красители, которые загрязняют сточные воды и впоследствии накапливаются в почве [Глазунов, 2004].

Накопление различных токсических компонентов в почве вызывает изменение её физических, химических и биологических свойств. Всё это неизбежно приводит к снижению и даже полной утрате почвенного плодородия. В результате нарушения почвенного покрова и растительности усиливаются нежелательные процессы – эрозия почв и их деградация.

В связи с этим важной задачей является сохранение и восстановление техногенно-нарушенных экосистем. В настоящее время существует несколько методов очистки почвы и воды от чужеродных веществ и соединений. По принципу действия методы очистки почвы делятся на химические, физические и биологические. При химической очистке почвы от загрязнений используется промывка растворами поверхностно-активных веществ или сильных окислителей (активный кислород, хлорсодержащие соединения, а также щелочные растворы). После очистки промывкой проводят рекультивацию почвы, а также необходима очистка почвы от соединений хлора. Такие методы не подходят для очистки большого объёма грунта.

Физико-химические методы очистки делятся на электрофизические и термические. Электрофизический метод очистки используется для удаления из почвы нефтепродуктов, фенолов и хлорсодержащих углеводородов. В основе метода лежит эффект электролиза воды при прохождении электрического тока через почву. Сложные загрязняющие соединения при таком воздействии активно окисляются и распадаются на менее вредные простые составляющие. Термический метод очистки в зависимости от типа загрязнений может производиться как на воздухе, так и в вакууме – в специальных герметичных установках. Метод применяется для освобождения почвы от нефтепродуктов, масел, бензина, от некоторых цветных металлов, от галогеносодержащих и органических соединений. Углеводороды выгорают при нагреве материала до + 800°C. Восстанавливают свойства почвы после такого воздействия путём добавления компоста и минеральных удобрений.

Как видно, предложенные методы не подходят для очистки большого объёма грунта и являются затратными, по сравнению с естественными методами биологической очистки. Среди них выделяют методы фитостабилизации, биостимуляции и биодеструкции. Так, метод фитоэкстракции заключается в высаживании специально отобранных видов растений, способных поглощать и накапливать в корнях, стеблях и листьях соединения меди, цинка, кобальта, никеля, свинца, хрома, тем самым снижая содержание этих элементов в почве. По завершению процесса фитоэкстракции все растения необходимо собрать и утилизировать. Однако в пепле сохранится высокое содержание токсичных элементов. При этом загрязняющие вещества не уничтожатся, а перенесутся. Эту проблему можно решить с помощью метода биостимуляции и биодеструкции, который заключается в том, что особые организмы способны разрушить пролиски в почву токсиканты. Эффективность микроорганизмов-деструкторов зависит от многих факторов, таких как поддержание влажности, уровня аэрации и температуры почвы [Воронина, 1987].

В настоящее время особенно перспективно применение дереворазрушающих грибов (в большинстве случаев отряда *Basidiomycota*) для рекультивации почв, которые загрязнены самыми различными ксенобиотиками, включая полиароматические углеводороды, полихлорбифенилы, нитроароматические соединения и пестициды. Применение базидиомицетов, и прежде всего, грибов белой гнили, для процессов биоремедиации природных экосистем связано со способностью этих грибов вырабатывать лигнолитические ферменты и вспомогательный комплекс метаболитов, в частности, активные формы кислорода [Древаль, 2011; Капич, 2011]. Кроме того, мицелий высших дереворазрушающих грибов в процессе роста способен обеспечивать доступ кислорода по почвенному профилю, что бла-

гоприятно сказывается на состоянии почвы и развитии почвенной флоры и фауны, процессах восстановления экосистем после негативной техногенной нагрузки [Коканина, 2010].

Исходя из вышеизложенного, целью работы было изучение эффективности деградации различных ксенобиотиков штаммами грибов белой гнили.

Материалом исследования был глубинный мицелий и культуральный фильтрат (КФ) 2 штаммов ксилотрофных грибов белой гнили. Штаммы *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd – Th-11 и *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Quel.-Tv-11-11 принадлежат к порядку *Agaricales* отдела *Basidiomycota*. Штаммы были выделены в чистую культуру из плодовых тел, собранных на территории г. Донецка.

Штаммы культивировали глубинным методом на модифицированной глюкозопептонной среде [Чайка, О. В., 2013] с лигносульфонатом, твин-80 и минеральными элементами по Кирку. Культивирование проводили в течение 6-ти суток при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. В конце срока ферментации мицелий отделяли от культуральной жидкости с помощью плотной капроновой ткани, получая, таким образом, КФ. Сырую и абсолютно сухую биомассу (АСБ) мицелия определяли весовым методом. По полученным данным рассчитывали прирост биомассы [Дудка, 1982].

С целью определения эффективности окислительной деструкции ксенобиотиков культуральным фильтратом штаммов изучали разрушение ряда синтетических красителей. Для этого проводили инкубацию раствора красителя с КФ штаммов в течение 24 часов. Обесцвечивание красителей определяли фотометрически при установленном максимуме светопоглощения в буферном растворе по сравнению с контрольными образцами красителей. Исследовали деструкцию следующих красителей.

Фуксин (солянокислый розанилин) $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Cl}$ – краситель трифенилметанового ряда, имеет вид зелёных кристаллов с металлическим блеском. Ранее использовался в текстильной промышленности, а в настоящее время – при изготовлении карандашей, чернил, копировальной бумаги, паст для шариковых ручек, а также в медицинских и биологических исследованиях. Входит в состав некоторых антисептиков. Ядовит, канцероген. Максимум светопоглощения (в 50% этаноле) 549–552 нм.

Бромтимоловый синий ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$) – кристаллический порошок красноватого цвета. Применяется в аналитической химии, медицине и биологии в качестве кислотно-основного индикатора. Также применяют как краситель биологических сред и ингредиент для получения фотозмульсии в копировальной технике. Максимум поглощения жёлтой окраски находится при длине волны 435 нм, а синей окраски — при 620 нм.

Ксиленоловый оранжевый ($\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}$) – порошок с кристаллами краснокоричневого цвета. Ксиленоловый оранжевый применяется в аналитической химии в качестве индикатора присутствия в растворах многих ионов металлов. Максимум светопоглощения ксиленолового оранжевого – при длине волны 440 нм.

Нильский синий ($\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$) – гистологический краситель, применяемый для дифференцировки жировых веществ и как добавка к питательным средам. Максимум светопоглощения экстракта находится при 645 нм.

Анилиновый голубой (метилловый синий) $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl}$ – относится к группе феноксиазин, нефлюоресцирующий. Широко применяется в биологических и медицинских исследованиях, а также для окрашивания бумаги, хлопка, шелка, шерсти и других отраслей деятельности. Максимум светопоглощения установлен при 660 и 680 нм.

Метилловый оранжевый ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{SNa}$) – синтетический органический краситель, имеет вид порошка, лепестки или чешуйки оранжево-жёлтого цвета. Метилловый оранжевый является одним из самых популярных кислотно-основных индикаторов, в современной текстильной промышленности используется при крашении шерсти, нейлона и шелка. Вещество умеренно токсично. В растворах с pH 2 максимум поглощения приходится на длину волны 505 нм.

Сульфарсазен ($C_{18}H_{14}AsN_6NaO_8S$) – металлоиндикатор, в чистом виде представляет собой красно-коричневые кристаллы. Максимум светопоглощения – в области 415 нм.

Метиловый красный ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) – синтетический анилиновый краситель, кислотно-основной индикатор. Имеет вид фиолетово-бордовых кристаллов. Максимум светопоглощения метиленового красного находится при 730 нм.

Кумасси бриллиантовый синий ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$) – трифенилметановый краситель, разработанный для текстильной индустрии, в настоящее время широко используется в аналитической биохимии для окраски белков. При pH ниже 0 краситель имеет красную окраску и максимум поглощения на длине 470 нм. При pH около 1 краситель зелёный и максимум поглощения составляет 620 нм. При pH выше 2 краситель ярко-синий, максимум поглощения на 595.

Арсенazo I ($(HO)_2OAsC_6H_4N=NC_{10}H_3(OH)_2(SO_3Na)_2$) – представляет собой красно-коричневое вещество, которое хорошо растворимо в воде. Обычно применяют в виде смеси с динатриевой солью и NaCl для фотометрических определений и цветных реакций. Максимум светопоглощения при 580 нм [Андросов, 1989; Шпак, 2000].

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

В результате исследований было установлено, что при глубинном культивировании штаммы показали практически идентичные значения накопления абсолютно сухой биомассы (АСБ). Несколько большие значения прироста АСБ характерны для штамма *T. versicolor* Tv-11-11. по сравнению со штаммом *T. hirsuta* Th-11. Наблюдается определённая зависимость между накоплением АСБ и обесцвечиванием красителей у штамма *T. versicolor* Tv-11-11.

Анализируя полученные данные деструкции красителей штаммами, было выявлено, что КФ штамма *T. hirsuta* Th-11 обесцвечивает следующие виды красителей: бромтимоловый синий, метиловый оранжевый, сульфарсазен, фуксин основной.

При этом наиболее полно в течение 24 часов КФ данного штамма обесцветил следующие красители: метиловый оранжевый ($66,4 \pm 4,02\%$) и бромтимоловый синий ($32,9 \pm 1,9\%$).

В условиях эксперимента не установлено влияния КФ на следующие красители: метиловый синий, силеноловый оранжевый. Наблюдается увеличение оптической плотности растворов следующих красителей: арсенazo I – на 23%, метиловый красный – на 34,1%, кумасси бриллиантовый синий – на 11,8%, нильский синий – на 71,2%.

КФ штамма *T. versicolor* Tv-11-11 в течение 24 часов обесцветил следующие красители: бромтимоловый синий, метиловый оранжевый, сульфарсазен, фуксин основной, арсенazo I, метиловый красный.

Наиболее эффективно обесцвелились следующие растворы: метиловый оранжевый ($61,2 \pm 1,4\%$), фуксин основной ($17,34 \pm 1,68\%$). Для остальных растворов красителей установлено увеличение оптической плотности: силеноловый оранжевый – на 1,9%, кумасси бриллиантовый синий – на 24,2%, нильский синий – на 36,2%.

Влияние КФ данного штамма не установлено для красителя метиловый синий.

Следовательно, исследуемые грибы белой гнили способны разрушать различные синтетические соединения, наиболее полно среди исследуемых красителей подверглись обесцвечиванию метиловый оранжевый, бромтимоловый синий, фуксин основной. Результаты варьировали в зависимости от используемого красителя и штамма гриба.

Высокая эффективность деструкции красителя метилового оранжевого по сравнению с остальными красителями может быть связана с тем, что состав среды и условия культивирования, используемые в эксперименте, были разработаны для увеличения эффективности именно его деструкции. Так, на стандартной глюкозо-пептонной среде (ГПС) окислительная деструкция красителя Methyl Orange составила $3,83 \pm 1,49\%$, а на модифицированной – в 21,5 раз выше этого показателя [Чайка, 2014].

Таким образом, исследуемые штаммы обладают значительным потенциалом для использования в биоремедиационных технологиях (микоремедиации). Их можно рекомендовать в качестве биологических агентов в процессах деструкции красителей и рекультивации деградированных земель. Дальнейшие исследования должны быть направлены на подбор условий культивирования и состава сред с целью повышения эффективности деструкции различных ксенобиотиков.

ЛИТЕРАТУРА

- Андросов В.Ф.** 1989. Синтетические красители в лёгкой промышленности. Москва: Легпромбытиздат: 467 с.
- Воронина А.Д.** 1987. Современные физические и химические методы исследования почв. Москва: Изд-во МГУ: 204 с.
- Глазунов Г.П., Кузнецов М.С.** 2004. Эрозия и охрана почв. Учебник для вузов. Изд. 2-е: Колос МГУ: 352 с.
- Древаль К.Г., Бойко М.І.** 2011. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів *Biotechnology Acta*: 4(1): 87–92.
- 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.
- Коканина А.В., Марченко М.Ю., Барков А.В. и др.** 2010. Возможности использования базидиальных грибов с целью повышения эффективности 25 рекультивации нефтезагрязнённых почв. *Бакирский химический журнал.* 3: 123–129.
- Чайка О.В., Федотов О.В.** 2014. Патент 91407 України. Спосіб індукції окислювальної деструкції барвника Methyl Orange штамом дереворуйнівного базидіоміцета *Trametes Hirsuta* (Wulfen) Lloyd Th-11. Заявка № u201310640, від 03.09.2013, МПК (2014.01), кл. C12N 1/00. Бюл. № 13, від 10.07.2014.
- Чайка О.В.** 2013. Ефективність біодеградації ксенобіотику MethylOrange культурами ксилотрофів у залежності від концентрацій пептону та глюкози. *Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону.* 1(13): 201–208.
- Шпак Н.В.** 2000. Совершенствование процессов крашения пушно-мехового сырья на базе использования химических материалов компании «Lowenstein». Новосибирск: 83 с.