

УДК 504.064.2

Т.І. КРИВОМАЗ, О.В. ДЕМЕЦЬКА, В.О. МОВЧАН

ПЕРШИЙ АНАЛІЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ МІКСОМІЦЕТІВ

***Анотація.** Вперше проаналізовано токсичність 16 видів міксоміцетів. На підставі експрес-методу з використанням сперматозоїдів бика було доведено переважну нетоксичність досліджених зразків. Всього три види з проаналізованих можна вважати умовно токсичними: *Fuligo septica* (IT = 150%), *Didyma meyeri* (IT = 123,9%) та *Trichia favoginea* (IT = 121,8%), що, можливо, обумовлено біохімічними особливостями цих міксоміцетів. Порівняння ксилофільних та нівальних видів не виявило суттєвих відмінностей параметрів цитотоксичності в залежності від екологічної групи, оскільки середнє значення IT практично однакове: 104,96% – для нівальних та 104,89% – для ксилофільних. Проте у групі нівальних спостерігається більш рівномірний розподіл параметрів: різниця в граничних показниках IT становить 38,8, натомість, у групі ксилофільних видів ця величина має вдвічі більше значення – 76,3 одиниці. Показники токсичності міксоміцетів носять видоспецифічний характер і не залежать від екологічної спеціалізації, часу колекціонування та місцезростання розглянутих представників цієї групи.*

***Ключові слова:** цитотоксичність, міксоміцети, екологічна безпека, паспортизація.*

Вступ

Живі організми відіграють вирішальну роль в усіх природних процесах [1], тому оцінка токсичності біооб'єктів має велике значення для моніторингу біотичних та абіотичних складових навколишнього середовища у сфері екобезпеки. Постійно ведеться пошук тестових видів для з'ясування параметрів дії несприятливих факторів на довкілля. Обрані біооб'єкти мають відповідати ряду критеріїв, зокрема характеризуватись широким ареалом поширення, невеликими розмірами та відносно нейтральною роллю у циклах взаємовідносин з іншими живими організмами. Саме таким критеріям відповідають представники грибоподібних протистів – міксоміцети (слизовики, Мухомуцетес), які поєднують в собі ознаки грибів та тварин [2]. На вегетативній стадії життєвого циклу, що представлена плазмодієм, вони здатні активно пересуватись, живлячись мікроскопічними організмами та органічними рештками, а на генеративній – утворюють на детритних субстратах плодові тіла (спорофори). Найчисленнішою екологічною групою міксоміцетів справедливо вважають ксилофільні види, що приурочені до відмерлої деревини. Крім того, серед міксоміцетів є особлива екологічна група нівальних видів, які формують спорофори навесні на відкритих гірських схилах поруч з талим снігом. Загалом міксоміцети поширені в усіх кліматичних зонах і здатні пристосовуватись до різноманітних умов існування. У лісовій підстилці та ґрунті слизовики відіграють роль біоконцентраторів, що здатні накопичувати елементи та сполуки в концентраціях, які перевищують їх вміст в навколишньому середовищі [3]. Таким чином, міксоміцетам притаманна властивість акумулювати токсичні сполуки, які можуть проявляти відповідний ефект на різних рівнях: клітинному, видовому, популяційному та екосистемному. Токсичний ефект

сполук на клітинному рівні виявляється безпосередньою дією речовини на структурні елементи клітини [4]. Одним з поширених методів дослідження цих процесів *in vitro* служить процедура виявлення біотоксикантів шляхом біотестування об'єктів навколишнього середовища. Експрес-методи, що включають використання різних тест-організмів (бактерій, водоростей, простіших та ін.), надають попередню інформацію щодо токсичності досліджуваних об'єктів та набувають все більш широкого застосування нарівні з традиційними токсикологічними дослідженнями [5]. У порівнянні з використанням лабораторних тварин, перевагою цих методів є менша собівартість та невелика кількість часу, що витрачається на експеримент. Зокрема, експрес-метод дослідження цитотоксичності використовує доступний, дешевий та стандартний біологічний матеріал (сперматозоїди бика), дозволяє досліджувати нестерильні витяжки та отримувати результат за час, що не перевищує 3 години. Крім того, експрес-методи більш виправдані з позицій біоетики [6]. Дослідження цитотоксичності міксоміцетів допоможе з'ясувати невідомі аспекти їх впливу на інші живі організми, а також виявити залежність токсичних властивостей біооб'єктів від умов довкілля. Дане дослідження є вкладом в комплексний аналіз взаємодії живих організмів у навколишньому середовищі в системі екологічної безпеки та формування екологічних паспортів видів.

Мета дослідження

Метою дослідження є визначення цитотоксичності окремих видів нівальних та ксилофільних міксоміцетів для з'ясування впливу параметрів навколишнього середовища на їх біохімічні властивості.

Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження були 16 видів нівальних та ксилофільних міксоміцетів. Нівальні міксоміцети були зібрані на межі снігу, який щойно розтанув, у травні 2005 р. на території Говерляньського лісництва (зараз – Говерляньське природоохоронне науково-дослідне відділення) Чорногорського масиву Карпатського національного природного парку, розташованого в Яремчанському районі Івано-Франківської обл. Для аналізу було відібрано 7 видів нівальних міксоміцетів: *Diderma meyeræ* H. Singer, G. Moreno, Illana & A. Sánchez, *D. alpinum* (Meyl.) Meyl., *Lamproderma echinulatum* (Berk.) Rostaf., *L. ovoideum* Meyl., *L. splendens* Meyl., *Physarum albescens* Ellis ex T. Macbr. та *Ph. vernum* Sommerf. Зразки ксилофільних видів міксоміцетів були зібрані на території Гідропарку на Трухановому острові в Києві. Ксилотрофні міксоміцети включали 9 видів: *Arcyria obvelata* (Oeder) Onsberg, *A. oerstedii* Rostaf., *Fuligo septica* (L.) F.H. Wigg., *Leocarpus fragilis* (Dicks.) Rostaf., *Lycogala epidendrum* (L.) Fr., *Mucilago crustacea* F.H. Wigg., *Reticularia olivacea* (Ehrenb.) Fr., *Stemonitis fusca* Roth, *Trichia favoginea* (Batsch) Pers. Для видової ідентифікації зразків міксоміцетів використовувався визначник «Les Mухомусcètes» [7]. Дослідження проводились на базі біологічної лабораторії кафедри охорони праці та навколишнього середовища факультету інженерних систем та екології Київського національного університету будівництва і архітектури. Визначення токсичності досліджуваних видів міксоміцетів проводилось в лабораторії токсикології аерозолів та гігієни праці у зварювальному

виробництві ДУ «Інститут медицини праці НАМН України» за допомогою експрес-методу з використанням сперматозоїдів бика. Оцінку ступеня цитотоксичності розраховують за величиною індексу токсичності (ІТ), що дорівнює відношенню параметра рухливості суспензії сперматозоїдів в дослідному зразку до параметра рухливості сперматозоїдів в контрольному зразку та вираженої в процентах. При значенні індексу токсичності від 70% до 120% дослідний розчин вважається нетоксичним [5]. Сутність методики полягає у дослідженні токсичності екстракту із застосуванням як тест-об'єкта сперми бика, що заморожена в парах рідкого азоту. Гранули замороженої бичачої сперми отримують на станціях штучного осіменіння та зберігають у посудинах Дьюара, наповнених рідким азотом. В основі методу лежить спостереження зміни залежності рухової активності сперматозоїдів від часу під впливом хімічних сполук, що містяться в екстракті досліджуваного зразка. В якості вимірюваного параметра використана інтегральна рухливість сперматозоїдів в суспензії m , яка пропорційна концентрації рухливих сперматозоїдів c_m та середньому модулю швидкості руху клітин v :

$$m = c_m v .$$

Інтегральна рухливість сперматозоїдів в суспензії $m = m(t)$ для контрольного і досліджуваного зразків вимірюється за період, поки її величина не стане близькою до нуля. Рухливість сперматозоїдів в суспензії вимірюється аналізатором зображень (АТ-05), принцип роботи якого заснований на автоматичному комп'ютерному аналізі мікроскопічних відеозображень суспензії сперматозоїдів. Для вимірювання були використані наступні засоби, обладнання та реактиви: аналізатор зображень АТ-05 (аналізатор токсичності АТ-05) ТУ 1525-001-2913668-03; пробірки з притертими пробками об'ємом 3–5 мл – 10 шт.; дозатори піпеточні на обсяги 0,5, 0,2 і 0,1 мл; мірні колби з притертими пробками об'ємом 50 мл – 2 шт.; ваги аналітичні з похибкою зважування не більше 1 мг; пінцет анатомічний довжиною 250 мм; посудина Дьюара типу СДС, об'ємом не менше 25 л і діаметром горла не менше 50 мм – 2 шт.; глюкоза та цитрат натрію тризаміщений, чисті; сперма бика, заморожена в рідкому азоті ГОСТ 26030-83 [6].

Результати

Дослідження цитотоксичності міксоміцетів продемонстрували відносно невисоке значення індексу токсичності для всіх 16 видів. Середнє значення ІТ для досліджених зразків міксоміцетів дорівнює 104,9%. Максимальне ІТ у *Fuligo septica* – 150,0%, а мінімальне – у *Lycogala epidendrum* (73,7%).

Загалом аналіз цитотоксичності виявив, що за показниками ІТ досліджені види міксоміцетів нерівномірно розподілились на три групи (рис. 1). До першої групи (ІТ від 70 до 100%) увійшло 6 видів: *Lycogala epidendrum* (73,7%), *Reticularia olivacea* (77,1%), *Diderma alpinum* (85,1%), *Physarum albescens* (85,6%), *Mucilago crustacea* (87,9%) та *Leocarpus fragilis* (94,5%). До другої групи (ІТ від 100 до 120%) належать 7 видів: *Lamproderma splendens* (105,2%), *Physarum vernum* (105,8%), *Arcyria oerstedii* (110,5%), *Stemonitis fusca* (111,7%), *Lamproderma ovoideum* (114,4%), *Lamproderma echinulatum* (114,7%) та *Arcyria obvelata* (116,8%).

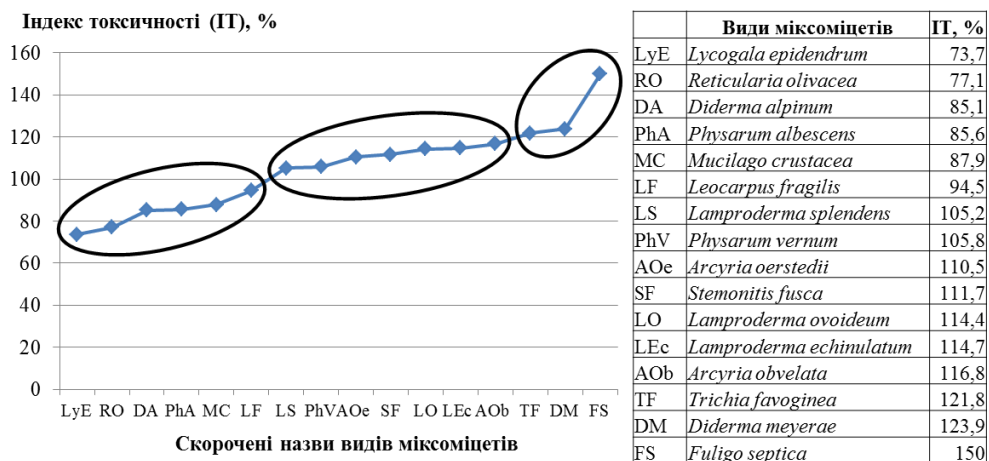


Рис. 1 – Індекс цитотоксичності досліджених зразків міксоміцетів

Таким чином, переважна більшість досліджуваних міксоміцетів (13 видів) не виявили цитотоксичної дії (ІТ від 70 до 120%). І всього три види відносяться до третьої групи міксоміцетів, які за даними досліджень можна вважати умовно токсичними, оскільки ІТ дещо перевищував 120%: *Trichia favoginea* (121,8%), *Diderma meyeræ* (123,9%) та *Fuligo septica* (150%).

Порівняння цитотоксичності ксилофільних та нівальних видів міксоміцетів (рис. 2) не виявило суттєвої залежності параметрів цитотоксичності від екологічної спеціалізації даних груп міксоміцетів, оскільки і для нівальних, і для ксилофільних видів середнє значення індексу токсичності виявилось майже однаковим: 104,96% – для нівальних та 104,89% – для ксилофільних.

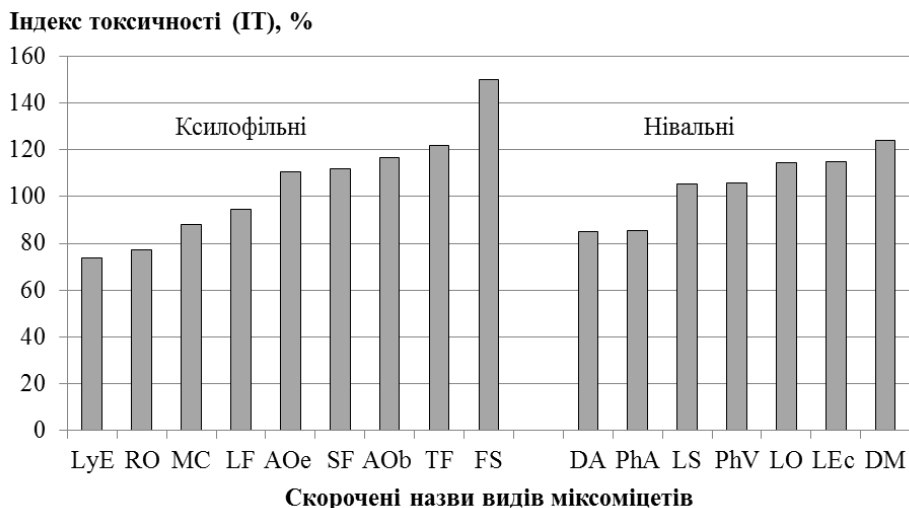


Рис. 2 – Порівняння цитотоксичності ксилофільних та нівальних видів міксоміцетів

Проте у групі нівальних спостерігається більш рівномірний розподіл, тут діапазон значень ІТ коливається від 85,1% у *Diderma alpinum* до 123,9% у *Diderma meyeræ*. Цікаво, що обидва граничні види належать до одного роду

та характеризуються морфологічною схожістю, разом з подібністю екологічної спеціалізації. Натомість, у групі ксилофільних видів різниця в граничних показниках ІТ становить 76,3 одиниці, на відміну від нівальних, де ця величина має вдвічі менше значення – 38,8 одиниці. Така різниця не випадкова, оскільки саме до групи ксилофільних міксоміцетів відносяться види з максимальним та мінімальним значенням цитотоксичності. Загалом, на підставі даних досліджень можна зазначити, що токсичність міксоміцетів носить видоспецифічний характер і не залежить від екологічної спеціалізації, часу колекціонування та місцезростання розглянутих представників грибоподібних протистів.

Обговорення та висновки

Цитотоксичність обумовлена здатністю живих організмів накопичувати певні агресивні сполуки у великих концентраціях. З проаналізованих 16 зразків міксоміцетів експрес-метод виявив найбільший індекс токсичності у *Fuligo septica* (150%), що, очевидно, пов'язано з наявністю в плодовому тілі біоактивних речовин. Проте значно більша кількість вторинних метаболітів відома для *Lycogala epidendrum*, що продемонструвала найменший ступінь токсичності в даному дослідженні. Наприклад, лікогалорубіни та лікогалові кислоти, що входять до переліку хімічних сполук цього виду, проявляють антибіотичну активність стосовно грибів та бактерій, а також передбачають противірусний потенціал [8]. Слід зазначити, що *Fuligo septica* та *Lycogala epidendrum* належать до поширених ксилотрофних міксоміцетів з великими, помітними неозброєним оком плодовими тілами, які можна виявити практично всюди, де наявні детритні рослинні залишки. Обидва види знайдені одночасно, в одному й тому ж місці, тому можна припустити, що різниця цитотоксичних параметрів пов'язана з видоспецифічними біохімічними властивостями. Умовна токсичність *Fuligo septica* можливо обумовлена унікальною здатністю цього міксоміцета до гіперакумуляції Zn [9, 10, 11]. При цьому високі концентрації такого токсичного для живих організмів елемента не завдають шкоди самому *F. septica*, що пояснюється наявністю в плазмодії та еталіях цього слизовика жовтого пігменту фулігорубіну А, який утворює з металами хелати, конвертуючи токсичні елементи в неактивну форму [12]. Очевидно, що біохімія міксоміцетів вивчена недостатньо та нерівномірно. Якщо стосовно хімічного складу ксилофільних міксоміцетів існують хоча б фрагментарні дані, то вивчення вмісту біоактивних сполук у нівальних міксоміцетах не проводилось взагалі. Таким чином, дослідження цитотоксичності міксоміцетів виявляє невідомі раніше аспекти кругообігу речовин в навколишньому середовищі. Здатність деяких видів міксоміцетів накопичувати токсичні елементи відкриває нові перспективи для їх використання у сфері екологічної безпеки.

В результаті дослідження зроблені наступні висновки:

1. На підставі експрес-методу оцінки цитотоксичності з використанням сперматозоїдів бика було доведено переважну нетоксичність 16 досліджених зразків міксоміцетів.

2. Порівняння ксилофільних та нівальних видів міксоміцетів не виявило суттєвих відмінностей параметрів цитотоксичності в залежності від екологічної групи, оскільки середнє значення індексу токсичності виявилось майже однаковим (104,96% – для нівальних та 104,89% – для ксилофільних), проте

у групі нівальних спостерігається більш рівномірний розподіл параметрів: різниця в граничних показниках ІТ становить 38,8 одиниці, натомість, у групі ксилофільних видів ця величина має вдвічі більше значення – 76,3 одиниці.

3. Всього три види з 16 досліджених міксоміцетів можна вважати умовно токсичними, оскільки ІТ перевищував 120%: *Fuligo septica* (150%), *Diderma meyeri* (123,9%) та *Trichia favoginea* (121,8%), що, можливо, обумовлено наявністю біологічно активних сполук в плодових тілах та іншими біохімічними особливостями.

4. Показники токсичності міксоміцетів носять видоспецифічний характер і не залежать від екологічної спеціалізації, часу виявлення та місцезростання розглянутих представників цієї групи.

5. Перші дослідження токсичності міксоміцетів стали вкладом у формування паспорту екологічної безпеки для даної групи організмів та створюють підґрунтя для подальших досліджень в цьому напрямку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кривомаз Т.І. Паспортизація об'єктів біорізноманітності в системі управління екологічної безпеки / Т.І. Кривомаз // Науковий вісник Івано-Франківського національного технічного університету нафти і газу. – 2015. – № 1(11). – С. 149–154.
2. Кривомаз Т.І. Оцінка модельних об'єктів для поетапної розробки «Паспортів екологічної безпеки видів» // Екологічна безпека та природокористування: зб. наук. праць / М-во освіти і науки України, Київ, Нац. ун-т буд-ва і архіт., НАН України, Ін-т телекомунікацій і глобал. інформ. простору. – К., 2014. – Вип. 16. – С. 32–39.
3. Kryvomaz T. The assessment of heavy metal accumulation by myxomycetes // *Motorol* (Польща) / Polish Academy of Sciences – Lublin, 2015. – Vol.17, No. 8. – P. 157–164.
4. Куценко С. А. Основы токсикологии, т. 4. – Санкт-Петербург, 2002. – 395 с.
5. Leonenko N.S., Demetska O.V., Tkachenko T.Yu., Leonenko O.B. Geometry of nanoparticles as a determinant of their cytotoxicity // Український журнал з проблем медицини праці. – 2014. – № 1. – С. 18–22.
6. Демецька О.В., Леоненко Н.С. Експрес-спосіб визначення токсичності наноматеріалів у розчинах *in vitro* з використанням сперматозоїдів великої рогатої худоби як тест-об'єкта. Патент України №101308 від 10.09.2015.
7. Poulain M., Meyer M., Bozonnet J. *Les Myxomycètes*. 2 vol. – Delémont: FMBDS, 2011. – 1119 p., 544 plates.
8. Keller H.W., Everhart S.E. Importance of Myxomycetes in Biological Research and Teaching // *Fungi*. – 2010. – № 3(1). – P. 13–27.
9. Stijve, T., Andrey D. Accumulation of various metals by *Fuligo septica* (L) Wiggers and by some other slime molds (myxomycetes) // *Australasian Mycologist*. – 1999. – № 18(2) – P. 23–26.
10. Stephenson S. L., Mc Quattie C. J. Assessing the potential use of myxomycetes as bio-monitors of heavy metals in the environment // *Proceedings of the West Virginia Academy of Science*. – 2000. – 72. – P. 32–33.
11. Zhulidov, D.A., Robarts R.D., Zhulidov A.V., Zhulidova O.V., Markelov D.A., Rusanov V.A., Headley J.V. Zinc Accumulation by the Slime Mold *Fuligo septica* (L.) Wiggers in the Former Soviet Union and North Korea // *Journal of Environmental Quality*. – 2002. – № 31 (3). – P. 1038–1042.
12. Latowski D., Lesiak A., Jarosz-Krzeminska E., Strzalka K. *Fuligo septica*, as a new model organism in studies on interaction between metal ions and living cells // *Metal Ions in Biology and Medicine*. – 2008. – № 10. – P. 204–209.

Стаття надійшла до редакції 15.12.2015