

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ,
БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.22 : 577.151

ДЕЙСТВИЕ БИОЦИДОВ НА АКТИВНОСТЬ РЯДА ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ
ФЕРМЕНТОВ ГРИБОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ТЕХНИЧЕСКИХ ИЗДЕЛИЙ,
ЭКСПЛУАТИРУЕМЫХ В УСЛОВИЯХ ТРОПИЧЕСКОГО
КЛИМАТА (ВЬЕТНАМ)

© 2022 г. В. А. Карпов^{1,*}, В. Ф. Смирнов^{2,**}, О. Н. Смирнова^{2,***}, Н. А. Аникина^{2,****},
Е. А. Захарова^{2,*****}, А. Ю. Шишкин^{2,*****}, А. Е. Иванова^{1,3,*****}, Т. А. Семенова^{1,*****}

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071 Москва, Россия

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород, Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

*e-mail: wtc-karpov@rambler.ru

**e-mail: biodeg@mail.ru

***e-mail: protectfun@mail.ru

****e-mail: undinaf@gmail.com

*****e-mail: zaharova64ea@mail.ru

*****e-mail: uadshi@yandex.ru

*****e-mail: ivanovaane@gmail.com

*****e-mail: tashino@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2022 г.

После доработки 21.02.2022 г.

Принята к публикации 24.02.2022 г.

Исследована активность экстрацеллюлярных ферментов 20 штаммов микроскопических грибов, участвующих в биодеградации технических изделий, эксплуатируемых в условиях тропического климата (Вьетнам). У 19 штаммов обнаружена активность каталазы, у 18 штаммов активность фенолоксидазы и у 8 штаммов протеазная активность. Исследовано влияние промышленных биоцидов на активность данных ферментов. Установлено, что биоциды Биор-1, Bionutral A 10, Bionutral A 101 в разной степени способны подавлять активность различных энзимов. Все биоциды ингибировали активность внеклеточной каталазы большинства исследованных штаммов грибов. Исследованные нами биоциды в меньшей степени подавляли фенолоксидазную и протеазную активность исследованных тест-культур по сравнению с каталазной активностью. Различие ответной реакции на воздействие биоцидов проявлялось на штаммовом уровне, показатели значительно различались даже внутри одного вида. Отмечено, что в ряде случаев под воздействием биоцидов происходит увеличение активности ферментов.

Ключевые слова: активность ферментов, биодеградация, биоциды, микроскопические грибы, экстрацеллюлярные гидролазы, экстрацеллюлярные оксидоредуктазы

DOI: 10.31857/S0026364822030047

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря пластичности метаболических процессов микроскопические грибы способны использовать в качестве источников питания не только природные, но и различные синтетические материалы и изделия из них. Для таких грибов часто используется термин “технофилы” (Alyokhova et al., 2005). Вне всякого сомнения, обмен веществ у технофильных грибов отличается от обмена почвенных микроорганизмов, питающихся классическими субстратами. Технофильные грибы способны быстро адаптироваться к постоянно появляющимся современным материалам и средствам их

защиты. Особенно быстро процессы адаптации происходят в регионах с теплым и влажным климатом.

В связи с этим возникает потребность в изучении особенностей метаболизма микроскопических грибов, участвующих в процессах биоповреждений промышленных материалов и изделий из них.

Известно, что основными экзометаболитами грибов, принимающих участие в процессе биодеградации полимерных материалов, являются экстрацеллюлярные ферменты, главным образом, оксидоредуктазы и гидролазы (Sukharevich et al.,

2009; Covino et al., 2016). Оксидоредуктазы (каталазы, пероксидазы, фенолоксидазы) участвуют в биодеградации промышленных материалов на основе лигноцеллюлоз и ряда пластиков (Couto, Toca-Herrera, 2006; Zamocky et al., 2009; Cázares-García et al., 2013; Makarov et al., 2019). Среди гидролаз в последнее время значительное внимание уделяется протеолитическим ферментам грибов. Это связано с тем, что кроме природных промышленных материалов (кожа, шелк, шерсть и др.) данные ферменты способны участвовать в биодеградации ряда синтетических полимеров, содержащих амидные связи: полиамиды, полимочевины и др. (Shah, 2008; Parvinzadeh et al., 2009; Parvinzadeh et al., 2013; Covino et al., 2016; Shamraychuk et al., 2020). Кроме того, известно, что микробные протеазы обладают эстеразной и амидазной активностью, что расширяет круг промышленных материалов, в деградации которых они могут участвовать (Rao et al., 1998; Pavlyukova et al., 1998; Sanket et al., 2017).

Выявление экзоферментов у грибов-деструкторов, а также количественная оценка их активности позволит прогнозировать возможные механизмы биодеградации материалов и изделий при их эксплуатации, а также целенаправленно и эффективно осуществлять подбор средств защиты (биоцидных препаратов) изделий от биоповреждений, вызываемых микроскопическими грибами (Tsymbal et al., 2013; Zalepkina et al., 2018). Как в России, так и за рубежом арсенал биоцидных средств постоянно претерпевает изменения. Это происходит по ряду причин: экономических (высокая цена, нерентабельность производства, закрытие производства), биологических (появление штаммов микроорганизмов, устойчивых к биоцидным препаратам) и санитарно-гигиенических (негативное влияние на окружающую среду, трансформация биоцидов до высокотоксичных в отношении человека соединений в процессе эксплуатации защищаемых изделий под влиянием климатических факторов).

Необходимо знать механизм ингибирующего действия фунгицидов, что позволит более эффективно осуществлять их подбор и целенаправленное применение, т.к. необходимо в поражаемый грибами материал вводить тот биоцид, который в наибольшей степени подавляет метаболиты грибов, участвующих в биодеструкционных процессах (Tsymbal et al., 2013; Eswayah et al., 2016; Makarov et al., 2019). В наибольшей степени процесс биоповреждений материалов и изделий происходит в условиях тропиков и субтропиков, где более благоприятные условия для роста и развития грибов (Smirnov et al., 2020).

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было изучение активности некоторых экзоферментов грибов, участвующих в биоповреждении технических изделий в условиях тропиче-

ского климата (Вьетнам), а также исследование действия ряда биоцидов на активность данных ферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Активность ферментов определяли у 20 штаммов мицелиальных грибов, выделенных из участков биоповреждений технических изделий, эксплуатируемых в условиях тропического климата (Вьетнам). В основном грибы выделяли с поврежденных синтетических материалов, используемых для защиты технических изделий – это лакокрасочные покрытия, пластиковые оплетки проводов и пр. Выделение микроскопических грибов проводили общепринятыми методами с рассевом на агаризованные питательные среды. Полученные чистые культуры грибов проверяли на способность к росту на различных материалах (лакокрасочные покрытия, резины, герметики). Для этого на поверхность испытуемых материалов наносили водную суспензию спор грибов (концентрация спор 10^6 /мл) и экспонировали при температуре 29°C и влажности 95% в течение 28 суток. По окончании экспозиции оценивали степень застарения, наличие спороношения. Было проверено 92 штамма грибов, 20 наиболее активных штаммов были отобраны для данного исследования.

Идентификация чистых культур грибов до вида осуществлялась на основе культурально-морфологических и физиологических признаков микромитетов с использованием соответствующих определителей, а также с помощью генно-молекулярных методов по анализу участков ITS1, ITS2 ДНК. Для некоторых культур дополнительно секвенировали участки регионов ДНК, кодирующие гены кальмодулина (*CaM*) и бета-тубулина (*BenA*), и рекомендуемых в качестве вспомогательных видовых маркеров при идентификации и филогении. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе Applied Biosystems 31301 Genetic Analyzer в Научно-производственной компании ЗАО “Синтол” (Москва). Современное таксономическое положение видов проверяли по базам данных www.indexfungorum.org и <http://www.mycobank.org>. Данные грибы были депонированы во всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (табл. 1).

Культивирование микроскопических грибов проводили на полной питательной среде Чапека–Докса следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 0.3; KH_2PO_4 – 0.7; $NaNO_3$ – 2.0; KCl – 0.5; $MgSO_4$ – 0.5; $FeSO_4$ – 0.01; сахароза – 20.0. В колбы Эрленмейера емкостью 500 мл вносили по 250 мл среды указанного состава и осуществляли посев микромитетов. Колбы помещали на качалки АПУ-4м

(120 об./мин). Грибы культивировали в темноте при температуре $27 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 7 суток.

В качестве биоцидных средств использовали ряд препаратов, применяемых для биозащиты технических изделий: Биор-1 (производное полигексаметиленгуанидина), Bioneutral A 10 (производное изотиазола), Bioneutral A 101 (производное изотиазола и бронапола).

Фунгицидную активность химических соединений определяли экспериментально и рассчитывали по формуле Эббота (Andreeva, 1984). Концентрации биоцидов подбирались экспериментально и составляли: 0.01% для Биор-1; 0.005% и 0.0025% для Bioneutral A 101 и Bioneutral A 10, соответственно. Биоциды вводили в среду культивирования на четвертые сутки.

Активность оксидоредуктаз определяли в культуральной жидкости (КЖ) гриба спектрофотометрически (UV mini-1240 – Shimadzu, Япония): каталазную – по убыли пероксида водорода (H_2O_2) при $\lambda = 240$ нм (Li et al., 2007), фенолоксидазную активность по окислению *n*-фенилендиамина ($\lambda = 535$ нм) в присутствии H_2O_2 (Flukey et al., 2016). Активность данных ферментов выражали в условных единицах. За единицу активности (ед.) каждого из перечисленных ферментов принимали изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 мин в пересчете на 1 мг белка.

Определение протеолитической активности грибов проводили по методу Ансона (Bilay, 1982). Метод основан на способности белков и продуктов их ферментативного расщепления поглощать свет в УФ-области спектра (при $\lambda = 275\text{--}280$ нм). Удельную активность выражали в мкМ тирозина/(мг белка \times ч).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экзооксидоредуктазы мицелиальных грибов (каталаза и фенолоксидаза) способны принимать участие в биодеструкции полимерных материалов и изделий из них (Kasatova et al., 2017; Smirnov et al., 2020). В табл. 2 представлены результаты исследования активности каталазы и фенолоксидазы грибов, выделенных с поврежденных технических изделий.

Известно, что основным механизмом действия каталазы является разрушение пероксида водорода до воды и кислорода. Многие полимерные композиции в качестве ингредиентов содержат неорганические и органические перекиси, кроме того, пероксид водорода является одним из вторичных метаболитов грибов, который выделяется ими во внешнюю среду. Образующийся в результате действия каталазы кислород чрезвычайно реакционноактивен и способен окислять как органические соединения, так и металлы. Все это приводит к существенным изменениям структуры и состава ма-

Таблица 1. Штаммы исследуемых грибов

Вид	Штамм
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	BKM F-4817D
<i>Aspergillus pseudonomiae</i> Varga, Samson et Frisvad	BKM F-4818D
<i>A. japonicus</i> Saito	BKM F-4819D
“ ”	BKM F-4820D
<i>A. tubingensis</i> Mosseray	BKM F-4821D
“ ”	BKM F-4822D
“ ”	BKM F-4823D
<i>A. niger</i> Tieghem	BKM F-4824D
“ ”	BKM F-4825D
<i>A. terreus</i> Thom	BKM F-4826D
“ ”	BKM F-4827D
<i>Aureobasidium melanogenum</i> (Hermans-Nijhof) Zalar, Gostincar et Gunde-Cim	BKM F-4828D
<i>Cladosporium halotolerans</i> Zalar, de Hoog et Gunde-Cim	BKM F-4829D
<i>C. subuliforme</i> Bensch, Crous et U. Braun	BKM F-4831D
<i>C. tenuissimum</i> Cooke	BKM F-4832D
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	BKM F-4833D
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	BKM F-4834D
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. et Broome) Petch	BKM F-4836D
<i>Penicillium sclerotiorum</i> J.F.H. Beyma	BKM F-4837D
<i>Zasmidium citri-griseum</i> (F.E. Fisher) U. Braun et Crous	BKM F-4830D

териалов, т.е. к процессу их биодеградации (Shah, 2008; Anikina et al., 2016). Активность каталазы была обнаружена у 19 штаммов грибов из 20. Каталазная активность отсутствовала у гриба *Aspergillus pseudonomiae* BKM F-4818D. Максимальная каталазная активность была отмечена для грибов *Fusarium oxysporum* BKM F-4834D, *Aspergillus terreus* BKM F-4827D, *Aureobasidium melanogenum* BKM F-4828D и *Cladosporium subuliforme* BKM F-4831D.

Фенолоксидаза грибов играет важную роль в разрушении материалов на основе фенольных, фенолформальдегидных смол, фенопластов, материалов на основе древесины и др. Активность фенолоксидазы была обнаружена у 18 штаммов грибов из 20. У грибов *Fusarium oxysporum* BKM F-4834D и *Aureobasidium melanogenum* BKM F-4828D фенолоксидазная активность отсутствовала. Максимальная фенолоксидазная активность была отмечена для грибов *Cladosporium tenuissimum* BKM F-4832D и *Zasmidium citri-griseum* BKM F-4830D.

Как уже отмечалось выше, важная роль в биоповреждении многих полимерных материалов

Таблица 2. Активность каталазы и фенолоксидазы штаммов грибов, участвующих в биоповреждении технических изделий

Штаммы грибов	Активность каталазы, у.е.	Активность фенолоксидазы, у.е.
<i>Alternaria alternata</i> F-4817D	105.04	21.69
<i>Aspergillus pseudonomiae</i> F-4818D	0	23.75
<i>A. japonicus</i> F-4819D	123.14	39.27
<i>A. japonicus</i> F-4820D	198.02	25.46
<i>A. tubingensis</i> F-4821D	44.07	13.08
<i>A. tubingensis</i> F-4822D	61.97	18.33
<i>A. tubingensis</i> F-4823D	57.18	24.88
<i>A. niger</i> F-4824D	99.83	20.59
<i>A. niger</i> F-4825D	73.18	18.41
<i>A. terreus</i> F-4826D	153.84	22.20
<i>A. terreus</i> F-4827D	250.45	14.01
<i>Aureobasidium melanogenum</i> F-4828D	254.28	0
<i>Cladosporium halotolerans</i> F-4829D	38.95	15.12
<i>C. subuliforme</i> F-4831D	271.79	28.52
<i>C. tenuissimum</i> F-4832D	61.08	101.88
<i>Curvularia lunata</i> F-4833D	25.06	40.54
<i>Fusarium oxysporum</i> F-4834D	364.97	0
<i>Nigrospora oryzae</i> F-4836D	42.29	36.24
<i>Penicillium sclerotiorum</i> F-4837D	55.73	15.46
<i>Zasmidium citri-griseum</i> F-4830D	151.15	61.05

микромикетами принадлежит микробным экзо-протеазам. Обладая широкой субстратной специфичностью, данные ферменты способны участвовать не только в деструкции материалов, содержащих амидную (пептидную) связь, но и в деструкции полиакриламидов и полиэфиров (Parvinzadeh et al., 2009; Parvinzadeh et al., 2013; Sanket et al., 2017). В работах подробно рассматривается механизм

биодеструкции ряда полиамидов микробными протеазами. Авторами отмечается, что протеазы предпочтительно атакуют полиамидные связи в середине полимерных цепей и последовательно продуцируют концевые группы аминов и карбоновых кислот. Действие протеаз не ограничивается только поверхностью полимеров, они способны проникать внутрь волокна, вызывая потерю веса.

Таблица 3. Активность протеаз штаммов грибов, участвующих в биоповреждении технических изделий

Штаммы грибов	Активность протеазы, у.е.	
	щелочные протеазы	кислые протеазы
<i>Alternaria alternata</i> F-4817D	3.90	0
<i>Aspergillus tubingensis</i> F-4822D	0	9.70
<i>Aureobasidium melanogenum</i> F-4828D	0	22.35
<i>Cladosporium subuliforme</i> F-4831D	0	9.18
<i>C. tenuissimum</i> F-4832D	26.12	0
<i>Curvularia lunata</i> F-4833D	7.29	0
<i>Fusarium oxysporum</i> F-4834D	10.55	0
<i>Zasmidium citri-griseum</i> F-4830D	29.26	0

В табл. 3 представлены результаты исследований протеазной активности выделенных нами штаммов грибов-деструкторов.

Активность протеаз обнаружена у 8 штаммов из 20 исследованных грибов, из которых у 3 штаммов: *Aspergillus tubingensis* ВКМ F-4822D, *Aureobasidium melanogenum* ВКМ F-4828D, *Cladosporium subuliforme* ВКМ F-4831D обнаружены только кислые протеазы, у 5 штаммов – щелочные протеазы: *Alternaria alternata* ВКМ F-4817D, *Zasmidium citri-griseum* ВКМ F-4830D, *Cladosporium tenuissimum* ВКМ F-4832D, *Curvularia lunata* ВКМ F-4833D и *Fusarium oxysporum* ВКМ F-4834D.

Максимальная активность щелочных протеаз была отмечена у грибов *Zasmidium citri-griseum* штамм ВКМ F-4830D и *Cladosporium tenuissimum* ВКМ F-4832D, максимальная активность кислой протеазы у гриба *Aureobasidium melanogenum* ВКМ F-4828D.

Таблица 4. Действие биоцидов на каталазную активность грибов-деструкторов технических изделий

Штаммы грибов	Активность каталазы, у.е. (% к контролю)		
	Биор 1	Bioneutral A 101	Bioneutral A 10
<i>Alternaria alternata</i> F-4817D	22.49 (21.42)	76.47 (72.81)	10.77 (10.26)
<i>Aspergillus pseudonimiae</i> F-4818D	0	0	13.02
<i>A. japonicus</i> F-4819D	18.66 (15.15)	14.55 (11.81)	97.62 (79.27)
<i>A. japonicus</i> F-4820D	39.13 (19.76)	63.03 (31.83)	101.16 (51.08)
<i>A. tubingensis</i> F-4821D	9.60 (21.78)	27.47 (62.33)	50.24 (114.01)
<i>A. tubingensis</i> F-4822D	20.10 (32.43)	39.38 (63.55)	44.98 (72.59)
<i>A. tubingensis</i> F-4823D	12.61 (22.05)	72.20 (126.27)	55.13 (96.41)
<i>A. niger</i> F-4824D	0	7.26 (7.27)	35.25 (35.30)
<i>A. niger</i> F-4825D	10.36 (14.15)	0	27.54 (37.63)
<i>A. terreus</i> F-4826D	13.24 (8.61)	199.70 (129.81)	187.57 (121.93)
<i>A. terreus</i> F-4827D	30.39 (12.14)	217.17 (86.71)	228.31 (91.16)
<i>Aureobasidium melanogenum</i> F-4828D	5.38 (2.12)	41.08 (16.15)	123.57 (48.60)
<i>Cladosporium halotolerans</i> F-4829D	0	16.95 (43.51)	0
<i>C. subuliforme</i> F-4831D	1.49 (2.44)	0	11.98 (19.62)
<i>C. tenuissimum</i> F-4832D	0	90.32 (33.23)	24.27 (8.93)
<i>Curvularia lunata</i> F-4833D	0.91 (3.64)	0.52 (2.08)	8.33 (33.23)
<i>Fusarium oxysporum</i> F-4834D	6.16 (1.69)	218.34 (59.82)	186.94 (51.22)
<i>Nigrospora oryzae</i> F-4836D	6.48 (15.32)	0	0
<i>Penicillium sclerotiorum</i> F-4837D	12.48 (22.39)	19.40 (34.82)	18.32 (32.87)
<i>Zasmidium citri-griseum</i> F-4830D	0	0	5.69 (3.76)

Таким образом, наличие протеазной активности у исследуемых штаммов грибов позволяет считать их потенциально опасными для материалов и изделий из них, содержащих амидную связь.

Следует также отметить, что у всех грибов, у которых была обнаружена протеазная активность, также в определенной степени проявлялась и активность оксидоредуктаз, что позволяет предположить участие данных грибов в биодеструкции более широкого круга материалов, используемых в технических изделиях. В наших экспериментах, исходя из поставленной цели исследования, мы изучали общую активность вышеуказанных ферментов. Это весьма важно с точки зрения прикладной биохимии и микробиологии в плане оценки деструктивной активности микромицетов, рост которых обнаружен на технических изделиях в условиях Вьетнама.

Анализ биохимических экспериментов по оценке активности ферментов показывает, что каждый из штаммов грибов, выделенных с технических изделий, обладает своим, отличным от других, метаболизмом. Исходя из этого, можно предположить, что процессы биодеструкции конкретных материалов и изделий из них в определенной степени зависят и от состава микромицетов-деструкторов. Следовательно, и подбор средств защиты конкретных материалов должен осу-

ществляться на основе учета особенностей метаболизма грибов – активных биодеструкторов.

Влияние ряда биоцидов на активность исследованных нами экзоферментов грибов (каталазы, фенолоксидазы, протеазы) было изучено в серии экспериментальных исследований. Использовали биоциды Биор-1, Bioneutral A10 и Bioneutral A101, широко применяющиеся как для внешней защиты изделий, так и входящие в состав различных материалов и технических изделий.

Результаты воздействия исследуемых биоцидов на активность каталазы и фенолоксидазы тест-культур грибов представлены в табл. 4 и 5. Контролем служил вариант экспериментов на среде без биоцидов (табл. 2). Процент активности фермента по отношению к контролю при введении в среду культивирования грибов того или иного биоцида указан в таблицах в скобках.

Результаты биохимических исследований показали, что все биоциды являются ингибиторами активности внеклеточной каталазы большинства штаммов грибов, выделенных с технических изделий. Для двух штаммов (*Aspergillus tubingensis* ВКМ F-4823D и *A. terreus* ВКМ F-4826D) отмечено повышение активности каталазы при воздействии биоцидов Bioneutral A10 и Bioneutral A101. Отдельно стоит отметить гриб *A. pseudonimiae* ВКМ F-4818D.

Таблица 5. Действие биоцидов на фенолоксидазную активность грибов-деструкторов технических изделий

Штаммы грибов	Активность фенолоксидазы, у.е. (% к контролю)		
	Биор-1	Bioneutral A101	Bioneutral A10
<i>Alternaria alternata</i> F-4817D	19.07 (87.91)	15.43 (71.13)	12.88 (59.35)
<i>Aspergillus pseudonomiae</i> F-4818D	20.88 (87.93)	14.40 (60.63)	15.11 (63.65)
<i>A. japonicus</i> F-4819D	25.83 (65.79)	20.79 (52.94)	30.03 (76.47)
<i>A. japonicus</i> F-4820D	6.19 (24.30)	8.91 (34.99)	7.03 (27.60)
<i>A. tubingensis</i> F-4821D	18.61 (142.24)	11.69 (89.33)	10.67 (81.57)
<i>A. tubingensis</i> F-4822D	24.95 (136.06)	19.69 (107.40)	17.25 (94.08)
<i>A. tubingensis</i> F-4823D	0.66 (2.67)	5.66 (22.75)	7.28 (29.26)
<i>A. niger</i> F-4824D	13.62 (66.12)	10.48 (50.91)	4.91 (23.86)
<i>A. niger</i> F-4825D	9.51 (51.64)	2.01 (10.91)	0.96 (5.22)
<i>A. terreus</i> F-4826D	9.38 (42.26)	3.21 (14.48)	11.18 (50.38)
<i>A. terreus</i> F-4827D	26.46 (188.86)	8.98 (64.06)	9.02 (64.36)
<i>Aureobasidium melanogenum</i> F-4828D	0	15.24 (100)	0
<i>Cladosporium halotolerans</i> F-4829D	4.46 (29.50)	9.07 (59.96)	9.13 (60.34)
<i>C. subuliforme</i> F-4831D	9.60 (33.66)	17.37 (60.89)	10.29 (36.06)
<i>C. tenuissimum</i> F-4832D	27.21 (26.70)	40.90 (40.15)	49.32 (48.41)
<i>Curvularia lunata</i> F-4833D	10.11 (24.95)	25.50 (62.90)	29.14 (71.89)
<i>Fusarium oxysporum</i> F-4834D	0	0	0
<i>Nigrospora oryzae</i> F-4836D	14.86 (41.00)	14.64 (40.40)	13.54 (37.37)
<i>Penicillium sclerotiorum</i> F-4837D	15.88 (102.76)	10.64 (68.84)	17.49 (113.17)
<i>Zasmidium citri-griseum</i> F-4830D	56.07 (91.83)	35.77 (58.60)	23.28 (38.14)

У данного штамма не была обнаружена каталазная активность в условиях контрольного эксперимента, однако, при введении биоцида Bioneutral A 10, этот фермент был обнаружен в культуральной среде и его активность составила 13.02 у.е.

Различия ответной реакции на воздействие биоцидов проявлялось на штаммовом уровне, показатели значительно различались даже внутри одного вида. Это еще раз подтверждает тот факт, что каждый из имеющихся грибов отличается своей спецификой метаболизма. В плане подавления каталазной активности грибов наиболее эффективным показал себя биоцид Биор-1. Данный препарат вызывал ингибирование каталазной активности $\geq 90\%$ у 9 грибов из 20 исследованных.

Исследованные нами биоциды в меньшей степени подавляли фенолоксидазную активность исследованных тест-культур по сравнению с каталазной активностью (табл. 5).

Отмечено, что препарат Bioneutral A 101 увеличивал активность фенолоксидазы *Aspergillus tubingensis* ВКМ F-4822D, Bioneutral A 10 – *Penicillium sclerotiorum* ВКМ F-482237. Кроме того, показано, что *Aureobasidium melanogenum* ВКМ F-4828D, не обладающий фенолоксидазной активностью в контрольных условиях, проявил ее под воздействием Bioneutral A 101.

В табл. 6 представлены результаты исследования действия биоцидов Биор-1, Bioneutral A 101, Bioneutral A 10 на активность кислой и щелочной протеаз грибов. Контролем служил вариант экспериментов на среде без биоцидов (табл. 3).

Анализ экспериментальных данных показал, что все биоцидные препараты ингибировали кислые и щелочные протеазы. Исключение составляет действие препарата Биор-1 на ферментативную активность гриба *Aspergillus tubingensis* ВКМ F-4822D, которое привело к повышению активности кислой протеазы на 36.7%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что снижение ферментативной активности может происходить как в результате изменения структуры фермента, так и вследствие нарушения его синтеза (Bezborodov et al., 2008). На активность экстрацеллюлярных ферментов также могут повлиять изменения скорости их транспорта к местам секреции (Kasatova et al., 2017). В данной статье мы не рассматривали конкретные механизмы изменения ферментативной активности грибов. В задачи наших исследований входило обнаружение у грибов-деструкторов, выделенных в условиях Вьетнама, наличия оксидоредуктаз и гидролаз, способных участвовать в де-

Таблица 6. Действие биоцидов на протеазную активность грибов-деструкторов технических изделий

Штаммы грибов	Протеаза	Активность протеазы, у.е. (% к контролю)		
		Биор 1	Bioneutral A 101	Bioneutral A 10
<i>Alternaria alternata</i> F-4817D	щелочная	1.2 (30.77)	1.44 (36.92)	1.42 (36.41)
<i>Aspergillus tubingensis</i> F-4822D	кислая	13.26 (136.70)	7.32 (75.46)	6.71 (69.18)
<i>Aureobasidium melanogenum</i> F-4828D	кислая	15.06 (67.38)	8.73 (39.06)	3.64 (16.29)
<i>Cladosporium subuliforme</i> F-4831D	щелочная	5.11 (19.56)	7.04 (26.95)	4.89 (18.72)
<i>C. tenuissimum</i> F-4832D	щелочная	5.49 (59.80)	6.09 (66.34)	8.01 (82.25)
<i>Curvularia lunata</i> F-4833D	щелочная	2.93 (40.19)	3.44 (47.19)	4.32 (59.26)
<i>Fusarium oxysporum</i> F-4834D	щелочная	6.59 (62.46)	7.42 (70.33)	5.33 (50.52)
<i>Zasmidium citri-griseum</i> F-4830D	кислая	6.58 (22.49)	8.21 (28.06)	8.64 (29.79)

струкции материалов и изделий с последующим подбором ингибиторов активности данных энзимов для предотвращения процессов биоповреждений.

Механизм ингибирующего действия большинства соединений, исследуемых в качестве средств защиты материалов и изделий от микробиологических повреждений, недостаточно исследованы. Относительно данных биоцидов известно, что препарат Биор-1 – четвертичное аммониевое соединение и основной механизм его действия связан с нарушением проницаемости цитоплазматической мембраны в результате ее дезинтеграции, а именно с расслоением белково-липидного слоя. Тогда как производные тиазола, к которым относятся препараты Bioneutral A 10 и Bioneutral A 101, обладают электрофильной активностью и вступают в реакцию с белками микроорганизмов, содержащих тиольные группы, прерывая, таким образом, ряд метаболических процессов. Антимикробная активность бронопола, входящего в состав Bioneutral A 101, в основном обусловлена наличием в молекулах электронодефицитных атомов брома, которые проявляют окислительные свойства. Механизм антимикробного действия бронопола состоит из сшивания сульфогидрильных групп ферментов дегидрогеназ, в частности дегидрогеназ ЦТК.

Таким образом, полученные нами результаты расширили имеющиеся на сегодня представления о механизмах ингибирующего действия препаратов Биор-1, Bioneutral A 101, Bioneutral A 10 в плане возможности этих соединений подавлять экстрацеллюлярную каталазу, фенолоксидазу и протеазы микромицетов – активных деструкторов материалов и изделий, что, несомненно, имеет практическую значимость при разработке средств для целенаправленной и планомерной защиты материалов и изделий от биоповреждений.

Следует обратить внимание на отмеченный нами факт, что под действием ряда биоцидных соединений имело место не снижение, а увеличение активности экзоферментов (см. табл. 4, 5 и 6). Это

также необходимо учитывать при защите материалов и изделий с помощью биоцидов. При недостаточной концентрации биоцида, не приводящей к полной гибели грибов-деструкторов, могут остаться наиболее устойчивые штаммы и стимулироваться активность экзоферментов. В результате такого неправильного подбора увеличение синтеза и активности агрессивных метаболитов грибов, участвующих в деструктивном процессе, может усугубить процесс биоповреждения материала этими микромицетами.

Результаты биохимических исследований, приведенные в данной статье, подтверждают сформулированное нами положение, что подбор биоцидных препаратов (средств защиты технических изделий от биоповреждений) должен носить индивидуальный характер, т.е. подавлять именно те агрессивные метаболиты, которые участвуют в биодеструкции конкретных материалов и изделий. В этом случае гриб не будет способен использовать в качестве источника питания определенный полимерный материал. Это обеспечит не только быстрый поиск и эффективность биозащиты, но и снизит экологическую нагрузку биоцидов на окружающую среду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alyokhova T.A., Alexandrova A.A., Novozhilova T.B. et al.* Monitoring of microorganisms-destroyers on manned orbital complexes. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. V. 41 (4). P. 435–443 (in Russ.).
- Andreeva E.I.* Methodical tests to determine the fungicidal activity of new compounds. Cherkassy, 1984 (in Russ.).
- Anikina N.A., Smirnov V.F., Smirnova O.N. et al.* Biological damages of paint coating systems caused by microfungus. *Ecology and Industry of Russia.* 2016. V. 20 (6). P. 26–29 (in Russ.).
<https://doi.org/10.18412/1816-0395-2016-6-26-29>
- Bezborodov A.M., Zagustina N.A., Popov V.O.* Enzymatic processes in biotechnology. Nauka, Moscow, 2008 (in Russ.).
- Bilay V.I.* Methods of experimental mycology. Naukova Dumka, Kyiv, 1982 (in Russ.).

- Cázares-García S.V., Vázquez-Garcidueñas M.S., Vázquez-Marrufo G. Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: A bioinformatic approach. PLoS One. 2013. V. 8 (1). e55295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055295>
- Couto S.R., Toca-Herrera J.L. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnol Adv. 2006. V. 5 (24). P. 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>
- Covino S., Stella N., Cajthaml T. Mycoremediation of organic pollutants: opportunities, and pitfalls. Fungal applications in sustainable environmental biotechnology. 2016. P. 185–213. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42852-9_8
- Eswayah A.S., Smith T.J., Gardiner P.H.E. Microbial transformations of selenium species of relevance to bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82 (16). P. 4848–4859. <https://doi.org/10.1128/AEM.00877-16>
- Flukey W.H., Ratcliff B., Lopez L. et al. Differentiation of fungal tyrosinases and laccases using selective inhibitors and substrates. Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82 (16). P. 4848–4859. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0600.ch006>
- Kasatova E.S., Struchkova I.V., Anikina N.A. et al. The effect of a weak low-frequency electromagnetic field on the activity of extracellular oxidoreductases of *Trichoderma virens*. Mikologiya i fitopatologiya. 2017. V. 51. P. 99–103 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0026365619010063>
- Li Y., Shellhorn H.E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. J. Biomol. Tech. 2007. V. 18 (4). P. 185–187. <https://doi.org/10.1093/jn/137.10.2171>
- Makarov I.O., Klyuev D.A., Smirnov V.F. et al. The effect of a low-frequency pulsed magnetic field and low-intensity laser radiation on the activity of oxidoreductases and the growth of micromycetes – active destructors of polymer materials. Microbiology. 2019. V. 88 (1). P. 83–90 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0026365619010063>
- Parvinzadeh M., Assefipour R., Kiumarsi A. Biohydrolysis of nylon 6,6 fiber with different proteolytic enzymes. Polymer Degradation and Stability. 2009. V. 94 (8). P. 1197–1205. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.04.017>
- Parvinzadeh M., Assefipour R., Kiumarsi A. et al. Enzymatic surface hydrolysis of polyamide 6,6 with mixtures of proteolytic and lipolytic enzymes. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2013. V. 43. P. 798–814. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.805623>
- Pavlyukova E.B., Belozersky M.A., Dunaevsky Ya.E. Extracellular proteolytic enzymes of mycelial fungi (Review). Biochemistry. 1998. V. 63 (8). P. 1059–1089 (in Russ.).
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. P. 597–635.
- Sanket J.J., Raeid M.M.A. Biodegradation of polyacrylamide and its derivatives. Environ. Process. 2017. V. 4. P. 463–476. <https://doi.org/10.1007/s40710-017-0224-0>
- Shah A.A. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnol. Adv. 2008. V. 26. P. 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shamraychuk I.L., Belyakova G.A., Eremina I.M. et al. Proteolytic enzymes of fungi and their inhibitors as promising biocidal agents of antifungal action. Vestnik Moskovskogo universiteta Seriya 16. Biologiya. 2020. V. 75 (3). P. 123–130 (in Russ.).
- Smirnov V.F., Smirnova O.N., Anikina N.A. et al. The effect of biocides on the content of organic acids in fungi – destructors of technical products operated in a tropical climate (Vietnam). Corrosion: materials, protection. 2020. V. 6. P. 39–48 (in Russ.). <https://doi.org/10.31044/1813-7016-2020-0-6-39-48>
- Sukharevich V.I., Kuzikova I.L., Medvedeva N.G. Protection from bio-damage caused by fungi. SPb., 2009 (in Russ.).
- Tsymbal O.A., Pankratov A.N., Tsvileva O.M. et al. On the question of the methodology for assessing the potential of fungicidal activity of edible fungi during the introduction of organic selenides. Uspekhi meditsinskoy mikologii. 2013. V. 11. P. 310–313 (in Russ.).
- Zalepkina S.A., Smirnov V.F., Smirnova O.N. et al. Fungicidal effect of 2-selenyl-1-pyridine-1-oxide and its derivatives and their effect on the activity of oxidoreductases and the growth of *Aspergillus oryzae*. Mikologiya i fitopatologiya. 2018. V. 52 (4). P. 267–276 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0026364818040050>
- Zamocky M., Furtmuller P., Obinger Ch. Two distinct groups of fungal catalase/peroxidases. Biochem. Soc. Trans. 2009. V. 37 (4). P. 772–777. <https://doi.org/10.1042/BST0370772>
- Алехова Т.А., Александрова А.А., Новожилова Т.Б. и др. (Alekhova et al.) Мониторинг микроорганизмов-деструкторов на пилотируемых орбитальных комплексах // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 4. С. 435–443.
- Андреева Е.И. (Andreeva) Методические испытания по определению фунгицидной активности новых соединений. Черкассы: НИИТЭХИМ, 1984. 34 с.
- Аникина Н.А., Смирнов В.Ф., Смирнова О.Н. и др. (Anikina et al.) Биоповреждение систем лакокрасочных покрытий, вызываемых микроскопическими грибами // Экология и промышленность России. 2016. Т. 20. № 6. С. 26–29.
- Безбородов А.М., Загустина Н.А., Попов В.О. (Bezborodov et al.) Ферментативные процессы в биотехнологии. М.: Наука, 2008. 335 с.
- Билай В.И. (Bilay) Методы экспериментальной микологии. Справочник под ред. В.И. Билай. Киев: Наукова думка, 1982. 552 с.
- Залепкина С.А., Смирнов В.Ф., Смирнова О.Н. и др. (Zalerpkina et al.) Фунигицидный эффект 2-селенил-1-пиридин-1-оксида и его производных и их действие на активность оксидоредуктаз и рост *Aspergillus oryzae* // Микология и фитопатология. 2018. Т. 52. № 4. С. 267–276.
- Касатова Е.С., Стручкова И.В., Аникина Н.А. и др. (Kasatova et al.) Действие слабого низкочастотного электромагнитного поля на активность экстрацеллюлярных оксидоредуктаз *Trichoderma virens* // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51. С. 99–103.
- Макаров И.О., Клюев Д.А., Смирнов В.Ф. и др. (Makarov et al.) Действие низкочастотного импульсного маг-

нитного поля и низкоинтенсивного лазерного излучения на активность оксидоредуктаз и рост микроскопических — активных деструкторов полимерных материалов // Микробиология. 2019. Т. 88. № 1. С. 83–90.

Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е. (Pavlyukova et al.) Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов (Обзор) // Биохимия. 1998. Т. 63. № 8. С. 1059–1089.

Смирнов В.Ф., Смирнова О.Н., Анкина Н.А. и др. (Smirnov et al.) Действие биоцидов на содержание органических кислот у грибов — деструкторов технических изделий, эксплуатируемых в условиях тропического климата (Вьетнам) // Коррозия: материалы, защита. 2020. № 6. С. 39–48.

Сухаревич В.И., Кузикова И.Л., Медведева Н.Г. (Sukharevich et al.) Защита от биоповреждений, вызываемых грибами. СПб.: ЭЛБИ-СПБ, 2009. 207 с.

Цымбал О.А., Панкратов А.Н., Цивилева О.М. и др. (Tsymbal et al.) К вопросу о методике оценки потенциала фунгицидной активности съедобных грибов при интродукции органических селенидов // Успехи медицинской микологии. 2013. Т. 11. С. 310–313.

Шамрайчук И.Л., Белякова Г.А., Еремина И.М. и др. (Shamraychuk et al.) Протеолитические ферменты грибов и их ингибиторы как перспективные биоцидные средства антифунгального действия // Вестн. Моск. ун-та. сер. 16. Биология. 2020. Т. 75. № 3. С. 123–130.

The Action of Biocides on the Activity of Some Extracellular Enzymes of Fungal Destructors of Technical Products Exploited under a Tropical Climate (Vietnam)

V. A. Karpov^{a, #}, V. F. Smirnov^{b, ##}, O. N. Smirnova^{b, ###}, N. A. Anikina^{b, ####}, E. A. Zakharova^{b, #####}, A. Yu. Shishkin^{b, #####}, A. E. Ivanova^{a, c, #####}, and T. A. Semenova^{a, #####}

^aSevertsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bLobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

^cLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[#]e-mail: wtc-karpov@rambler.ru

^{##}e-mail: biodeg@mail.ru

^{###}e-mail: protectfun@mail.ru

^{####}e-mail: undinaf@gmail.com

^{#####}e-mail: zaharova64ea@mail.ru

^{#####}e-mail: uadshi@yandex.ru

^{#####}e-mail: ivanovaane@gmail.com

^{#####}e-mail: tashino@mail.ru

The activity of extracellular enzymes of 20 strains of microscopic fungi involved in the biodegradation of technical products exploited in a tropical climate (Vietnam) was studied. Catalase activity was detected in 19 strains, phenol oxidase activity in 18 strains and protease activity in 8 strains. The effect of industrial biocides on the activity of these enzymes has been studied. It has been established that the biocides Bior-1, Bionneutral A 10, Bionneutral A 101 are able to suppress the activity of various enzymes to varying degrees. All biocides inhibited the activity of extracellular catalase of most of the studied strains of fungi. The biocides studied by us suppressed the phenol oxidase and protease activity of the test cultures studied to a lesser extent compared with the catalase activity. The difference in the response to the effects of biocides was manifested at the strain level, the indicators differed significantly even within the same species. It is noted that in some cases, under the influence of biocides, an increase in the activity of enzymes occurs.

Keywords: biodegradation, biocides, enzyme activity, extracellular hydrolases, extracellular oxidoreductases, microscopic fungi