

## БИОДЕСТРУКЦИЯ ЭФИРОВ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ ГРИБОМ БЕЛОЙ ГНИЛИ *PENIOPHORA LUCII*

© 2023 г. О. С. Савинова<sup>а</sup>, А. В. Шабаев<sup>а</sup>, Т. В. Федорова<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: fedorova\_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 17.01.2023 г.

Принята к публикации 19.01.2023 г.

Впервые изучена способность гриба белой гнили *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 к деструкции эфиров фталевой кислоты (ЭФК), таких как диэтилфталат (ДЭФ), дибутилфталат (ДБФ), ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ), диизобутилфталат (ДиБФ) и бутилбензилфталат (ББФ). Показано, что ДЭГФ наиболее эффективно подвергался биодеструкции грибом (более 98% на 6 сут культивирования). Остаточное содержание ДБФ и ДиБФ в культуральной жидкости на 10 сут составляло 17–18%. ББФ оказался наиболее трудно деградируемым соединением – его остаточное содержание на 10 сут культивирования *P. lycii* составляло около 40%. ДЭФ был устойчив к биодеструкции и в концентрации 1.5 г/л оказывал токсическое действие: скорость радиального роста гриба на агаризованной среде снижалась в 3 раза по сравнению с контролем, а количество грибной биомассы при жидкофазном глубинном культивировании – примерно в 1.5 раза. В процессе культивирования *P. lycii* на средах с ЭФК было показано увеличение примерно в 2 раза эстеразной и значительное снижение (в 2–4 раза) оксидазной активностей по сравнению с контрольной средой без фталатов.

**Ключевые слова:** биодеструкция, грибы белой гнили, эфиры фталевой кислоты, *Peniophora lycii*

**DOI:** 10.31857/S0026365622600857, **EDN:** FWTPAT

Эфиры фталевой кислоты (ЭФК, фталаты) – токсичные соединения, широко используемые для производства различных полимеров, резин, пластмасс, красок, изделий медицинского назначения, а также продукции для личной гигиены (Weaver et al., 2020; Tran et al., 2022). Попадая в окружающую среду, они оказывают негативное влияние на микробные сообщества почвы, круговорот питательных веществ, а также наносят вред здоровью животных и человека, в частности, приводят к нарушению работы эндокринной системы (т.н. “эндокринные разрушители”) (de Souza Machado et al., 2019; Iqbal et al., 2020). Неблагоприятными последствиями этого может являться изменения фертильности сперматозоидов, нарушения работы половых органов, эндометриоз, раннее половое созревание, дисфункции нервной системы, ослабление иммунитета, аллергии, респираторные и сердечно-сосудистые заболевания и многое другое (Tran et al., 2022). Широкое распространение токсичных эндокринных разрушителей в окружающей среде повышает актуальность исследований, направленных на разработку эффективных способов их удаления из загрязненных объектов. Для удаления фталатов из окружающей среды предложены различные физико-химические (абио-

тические) способы, например, фотохимическое разрушение, фотокаталитическое озонирование, сонолитическое разрушение (под воздействием ультразвука), химическая минерализация и ряд других методов (Das et al., 2021). Однако разрушение фталатов микроорганизмами считается наиболее эффективным, экологически безопасным и экономичным процессом, чем вышеупомянутые абиотические подходы (Boll et al., 2020). При этом биоремедиация ЭФК с использованием грибов (микоремедиация), в т.ч. базидиомицетов, имеет ряд преимуществ перед бактериальной деструкцией фталатов, в первую очередь, из-за большего разнообразия протекающих ферментативных процессов и, как следствие, более выраженной способности грибов к разрушению фталатов (Akerman-Sanchez et al., 2021). Помимо ферментативных процессов значительный вклад в эффективность микоремедиации вносит биосорбция фталатов на поверхности грибного мицелия. Так, ранее сообщалось о высоких скоростях биотрансформации ЭФК, проявляющих сильную сорбцию на поверхности грибных клеток (Hofmann, Schlosser, 2016; Carstens et al., 2020).

В последнее время активно изучаются процессы биодеструкции ЭФК с использованием грибов

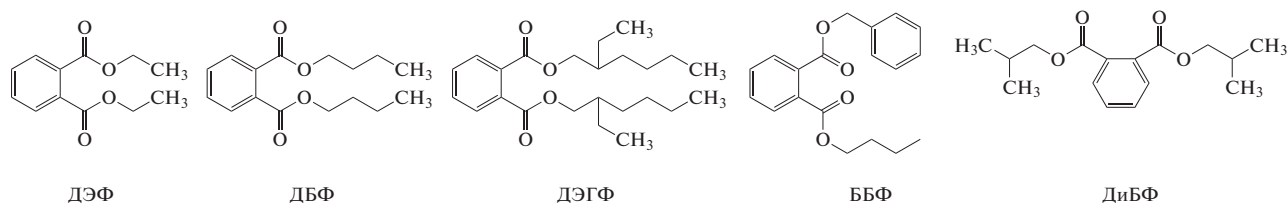


Рис. 1. Структуры соединений эфиров фталевой кислоты (ЭФК).

белой гнили, принадлежащих к различным видам, таких как *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus brumalis*, *Pleurotus eryngii*, *P. djamor*, *P. ostreatus*, *Auricularia polytricha*, *Trametes versicolor* и др. (Naveen et al., 2022). Показано, что способность грибов к биодеструкции ЭФК зависит от штамма, при этом за деградацию фталатов ответственны как внеклеточные, так и внутриклеточные ферменты. Комплекс секретируемых ферментов грибов белой гнили включает гидролитические и неспецифические окислительные ферменты, которые образуют так называемую лигнинолитическую ферментативную систему грибов. Данная система преимущественно представлена марганец пероксидазами, лигнин пероксидазами и лакказами, обладающими широкой субстратной специфичностью и способностью разрушать соединения со сложной химической структурой (Chang et al., 2021). Одними из таких грибов-деструкторов являются представители рода *Trametes* sp., способные разрушать различные токсичные соединения (Moiseenko et al., 2019). Однако известны и другие виды грибов белой гнили, в составе лигнинолитической ферментативной системы которых пероксидазы не обнаружены, например, представители рода *Peniophora* sp. (Brenelli et al., 2019; Ma et al., 2021; Shabaev et al., 2022). В связи с этим оценка эффективности биодegradации ЭФК грибами рода *Peniophora* представляется интересной.

Следует отметить, что внутриклеточная ферментативная система грибов включает белки семейства цитохромов P450 (гемсодержащие монооксигеназы), которые также могут играть важную роль в механизме детоксикации ЭФК (Naveen et al., 2022).

Ранее нами были исследованы несколько видов грибов белой гнили из разных экофизиологических групп и показано, что базидиомицет *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 (первичный дереворазрушающий сапротроф) является одним из перспективных штаммом для биоремедиации ЭФК (Савинова и соавт., 2022). Основными секретируемыми белками данного гриба являются различные пероксидазы и лакказы (Shabaev et al., 2022). Также нами было обнаружено, что лигнинолитическая ферментативная система другого гриба белой гнили, *Peniophora lycii* LE-BIN 2142, характеризуется полным отсутствием пероксидаз, но при этом

включает не описанный ранее белок (FAD-binding domain-containing protein) и лакказу.

Целью исследования было оценить способность гриба белой гнили *P. lycii* LE-BIN 2142 осуществлять процесс биодegradации ЭФК и провести сравнение эффективности данного процесса для *P. lycii* LE-BIN 2142 и *T. hirsuta* LE-BIN 072. В исследовании применялись наиболее опасные соединения из класса фталатов, такие как диэтилфталат (ДЭФ), дибутилфталат (ДБФ), ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ), диизобутилфталат (ДиБФ) и бензилбутилфталат (ББФ) (рис. 1), широко используемые в различных отраслях промышленности (Dutta et al., 2020).

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Реактивы.** В работе использовали ДЭФ, ДБФ, ДЭГФ, ДиБФ и ББФ фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Другие материалы и растворители квалификации “х. ч.” и “ч. д. а.” были приобретены у российских производителей.

**Условия культивирования.** Штамм базидиомицета *P. lycii* LE-BIN 2142 получен из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова (Санкт-Петербург, Россия).

Для оценки роста в присутствии ЭФК и определения общей оксидазной активности грибную культуру выращивали на твердой среде следующего состава (г/л): неохмеленный солодовый экстракт Maltax 10 (“OY Maltax AB”, Финляндия) – 50; агар-агар – 20; pH 6.0. В стерильную охлажденную до 40–50°C среду вносили ЭФК в концентрациях: 0.5, 1.0 и 1.5 г/л. Среды с внесенными ЭФК обрабатывали в ультразвуковой бане при 50°C в течение 5 мин. На подготовленные чашки Петри засевали мицелиальные блоки ( $d = 8$  мм) гриба и инкубировали в термостате при температуре 25°C, измеряя в процессе роста диаметр мицелиального мата.

Инокулят гриба выращивали стационарно в конических колбах объемом 750 мл с фарфоровыми бусами в глюкозо-пептонной среде следующего состава (г/л): пептон – 3.0, глюкоза – 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.6,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0.4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5,  $\text{CaCl}_2$  – 0.5,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0.05,  $\text{ZnSO}_4$  – 0.001,  $\text{FeSO}_4$  – 0.0005, при температуре 25°C в течение

10–14 сут в зависимости от скорости роста гриба. Посевной материал измельчали с помощью бус (20 мин, 180 об./мин) до получения однородной суспензии, которую затем в объеме 10% стерильно вносили в колбы для культивирования.

Грибную культуру выращивали глубинным способом в глюкозо-пептонной среде на роторной качалке при 180 об./мин и температуре 27°C. Выросшие грибные пеллеты отделяли фильтрованием и промывали 0.02%-м стерильным водным раствором Твин 80, после чего 10 г грибной биомассы стерильно переносили в конические колбы объемом 250 мл со 100 мл жидкой минеральной среды следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.6,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5,  $\text{CaCl}_2$  – 0.05,  $\text{MnSO}_4$  – 0.05,  $\text{ZnSO}_4$  – 0.001,  $\text{FeSO}_4$  – 0.0005,  $\text{NaNO}_3$  – 3.0, глюкоза – 10.0, Твин 80 – 0.2. Перед внесением грибной биомассы в колбы стерильно добавляли растворы ЭФК в концентрации 1.0 г/л, инкубировали на роторной качалке при 100 об./мин и температуре 25°C. Образцы культуральной жидкости отбирали на 1, 2, 3, 6 и 10 сут инкубации и хранили при –73°C до проведения эксперимента. Грибную биомассу отделяли фильтрованием и высушивали при температуре  $100 \pm 5^\circ\text{C}$  до постоянной массы.

**Скорость радиального роста ( $u_r$ )** рассчитывали по графику зависимости диаметра колонии от времени роста с анализом линейной регрессии. Диаметр колоний измеряли с помощью линейки с первых суток инкубации до полного покрытия поверхности чашки Петри мицелиальным матом (Suárez-Segundo et al., 2013).

**Общая эстеразная активность.** Оценку эстеразной активности проводили при культивировании грибов в жидкой минеральной среде, содержащей 1.0 г/л фталатов. Активность определяли с использованием спектрофотометра PerkinElmer Lambda 35 (“PerkinElmer”, США), используя *n*-нитрофенил бутират (“Sigma-Aldrich”, США) в качестве субстрата, согласно руководству (Синицын и соавт., 1995). Реакцию проводили в натрий-ацетатном буфере pH 4.5 при температуре 40°C в течение 10 мин. Для остановки реакции использовали натрий-фосфатный буфер (pH 7.3), значение оптической плотности определяли при длине волны 400 нм. Расчет эстеразной активности проводили по формуле:

$$A_{(\text{усл. ед./мл})} = 0.13\Delta A_{400}R_E,$$

где  $R_E$  – предварительное разбавление образца перед внесением в раствор субстрата;

$$\Delta A_{400} = A_{400} - A_{400(S)} - A_{400(E)},$$

$A_{400(S)}$  – контроль, в котором вместо образца использовали воду (~0.05–0.3 опт. ед.);

$A_{400(E)}$  – контроль без внесения в реакционную смесь субстрата.

#### Определение общей оксидазной активности.

Грибную культуру выращивали в жидкой минеральной среде, содержащей 1.0 г/л фталатов. Оксидазную активность определяли с помощью спектрофотометра Lambda 35 (“Perkin Elmer”, США) при длине волны 436 нм в 0.1 М натрий-ацетатном буфере (pH 4.5), как описано в работе (Савинова и соавт., 2022) с использованием раствора 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфокислоты) диаммониевой соли (АБТС) в качестве хромогенного субстрата. За 1 условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

**Газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС).** Оценку скорости биодеструкции ЭФК в процессе культивирования грибной культуры проводили с использованием метода ГХ-МС, как описано ранее (Савинова и соавт., 2022). Для этого получали гексановые экстракты образцов культуральной жидкости (1 : 1; об./об.), которые анализировали методом газо-жидкостной хроматографии в двух режимах: регистрация ионных масс в полном спектре (ТИС, диапазон масс  $m/z$  45–400) и регистрация по характерному для ЭФК основному иону (МИС,  $m/z = 149$  – протонированный фталевый ангидрид).

Анализ проводили с использованием газового хроматографа GC-MS QP 2010 Ultra EI (“Shimadzu”, Япония), снабженного автоматическим устройством ввода пробы и квадрупольным масс-спектрометрическим детектором. Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LabSolutions GCMS-solution (“Shimadzu”, Япония). Использовали колонку MDN-5 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм (“Supelco”, США), подвижная фаза – гелий, скорость потока элюента 1 см<sup>3</sup>/мин, деление потока 1 : 5. Объем вводимой пробы 1 мкл, температура термостата 120°C, температура инжектора 200°C. Температурный градиент: 120°C, выдержка 1 мин; с 120 до 280°C со скоростью 10°C/мин, изотерма 3 мин.

Все измерения проводили в 3-х независимых повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. При статистической обработке данных использовали метод дисперсионного анализа. При обнаружении достоверного значения ( $p < 0.05$ ) F-статистики, различия между индивидуальными средними оценивали с использованием теста множественного сравнения Тьюки ( $p \leq 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние различных концентраций ЭФК в агаризованной среде на рост *P. luscii*.** Известно, что исходная концентрация ЭФК в окружающей среде влияет на способность микроорганизмов к биодegradации фталатов (Suárez-Segundo et al., 2013; González-

**Таблица 1.** Скорость радиального роста ( $u_r$ , мм/сут) гриба белой гнили *P. lycii* на агаризованной среде с разным содержанием ЭФК

| Концентрация ЭФК, г/л | ДЭФ         | ДБФ         | ДЭГФ        | ДиБФ        | ББФ         |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 (контроль)          | 5.85 ± 0.25 | 5.85 ± 0.25 | 5.85 ± 0.25 | 5.85 ± 0.25 | 5.85 ± 0.25 |
| 0.5                   | 5.92 ± 0.23 | 4.68 ± 0.19 | 4.46 ± 0.29 | 3.97 ± 0.32 | 4.16 ± 0.27 |
| 1.0                   | 2.88 ± 0.12 | 4.50 ± 0.18 | 6.01 ± 0.33 | 3.82 ± 0.36 | 4.42 ± 0.24 |
| 1.5                   | 1.46 ± 0.06 | 4.33 ± 0.19 | 6.29 ± 0.31 | 3.80 ± 0.28 | 3.95 ± 0.21 |

Márquez et al., 2015). Экстремальные концентрации загрязняющих веществ трудно поддаются деградации большинством организмов, поэтому было проведено исследование влияния разных концентраций фталатов на ростовые характеристики штамма *P. lycii* LE-BIN 2142. В табл. 1 представлены скорости радиального роста грибной культуры на средах с ДЭФ, ДБФ, ДЭГФ, ДиБФ и ББФ в диапазоне концентраций от 0.5 до 1.5 г/л.

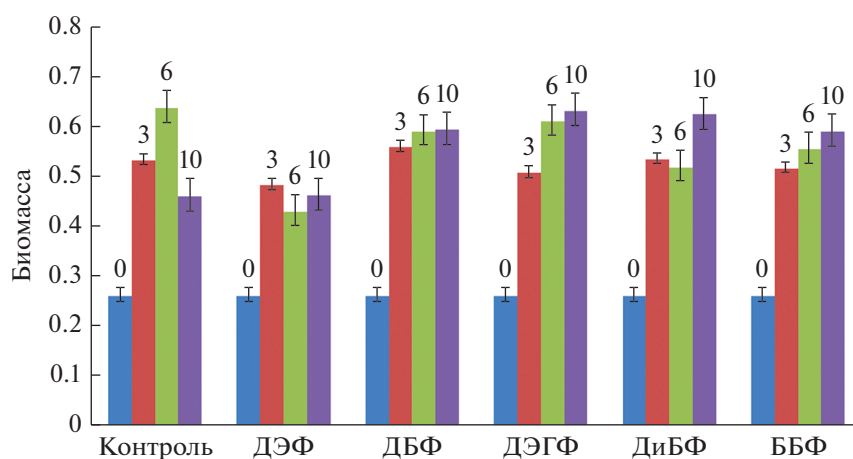
Показано, что с увеличением концентраций большинства ЭФК в среде культивирования наблюдалось замедление скорости роста *P. lycii*. Наибольшее ингибирование роста гриба отмечено на среде с ДЭФ: при концентрации 1.5 г/л скорость роста *P. lycii* снижалась в 4 раза по сравнению с контролем (табл. 1), тогда как увеличение содержания в ростовой среде ДБФ, ДиБФ и ББФ до 1.5 г/л приводило к незначительному снижению скорости роста. Иная картина наблюдалась при росте *P. lycii* на среде с ДЭГФ: скорость роста гриба в присутствии 0.5 г/л ЭФК несколько снижалась по сравнению с ростом на среде без ЭФК. При дальнейшем увеличении концентрации ДЭГФ до 1.0 и 1.5 г/л, напротив, показано увеличение радиальной скорости роста гриба по отношению к контрольной среде. Увеличение скорости роста при повышении содержания ДЭГФ в средах было также отмечено для других видов грибов белой гнили, таких как *Agrocybe praecox*, *Trametes hirsuta*, *Pleurotus pulmonarius*, *P. ostreatus* и *Lentinula edodes* (Suárez-Segundo et al., 2013; González-Márquez et al., 2015; Савинова и соавт., 2022). Выдвинуто предположение, что грибы могут использовать фталаты в качестве источника углерода и энергии для своего роста и развития.

**Влияние ЭФК на рост *P. lycii* при жидкофазном глубинном культивировании в минеральной среде с глюкозой.** На следующем этапе исследовали способность гриба *P. lycii* к биодеструкции фталатов в жидких средах с глюкозой в присутствии фталатов в концентрации 1 г/л. Как было показано выше, данная концентрация не приводила к значительному ингибированию роста гриба. Увеличение биомассы *P. lycii* наблюдалось в течение 10 сут культивирования как на контрольной среде, так и на средах с ЭФК, однако динамика накопления биомассы различалась (рис. 2). Наименьший прирост биомас-

сы был отмечен на среде с ДЭФ: количество биомассы в конце культивирования было в 1.4 раза ниже максимального количества на контрольной среде. На средах с ДБФ, ДЭГФ, ДиБФ и ББФ количество биомассы на 10 сут культивирования составляло около 0.6 г, что соответствовало максимальному значению на контрольной среде на 6 сут роста гриба. Таким образом, в присутствии всех ЭФК наблюдалось замедление прироста биомассы *P. lycii*, по сравнению с контрольной средой. Причем на среде с ДЭФ биомасса увеличивалась к 3 сут, далее практически не менялась, что согласуется с результатами по ингибированию роста гриба на агаризованной среде с ДЭФ. В присутствии других ЭФК рост биомассы *P. lycii* продолжался в течение всего периода культивирования, и на 10 сут количество биомассы достигало максимальных контрольных значений на 6 сут. Причем в конце культивирования (на 10 сут) на контрольной среде наблюдался лизис грибной культуры.

Ранее мы показали, что у гриба *T. hirsuta* в присутствии 1 г/л ДЭФ в аналогичной ростовой среде прирост биомассы не наблюдался в течение всего периода культивирования (10 сут) (Савинова и соавт., 2022), в отличие от гриба *P. lycii*, у которого на 3 сут биомасса увеличивалась в 2 раза и далее до конца культивирования не менялась. В присутствии ДБФ в такой же концентрации биомасса *T. hirsuta* увеличивалась примерно в 1.5 раза к концу периода культивирования, а биомасса *P. lycii* – в 2.3 раза. Аналогичная тенденция наблюдалась и для ДиБФ – прирост биомассы выше у *P. lycii* (увеличивался в 2.5 раза) по сравнению с *T. hirsuta* (в 1.8 раз). Что касается ДЭГФ и ББФ, то здесь у обоих грибов биомасса увеличивалась одинаково (примерно вдвое) к концу культивирования на 10 сут.

**Влияние ЭФК на pH и активность секретируемых ферментов при глубинном жидкофазном культивировании *P. lycii* в минеральной среде с глюкозой.** Известно, что на начальной стадии ключевыми ферментами, участвующими в деградации ЭФК, являются эстеразы (Changet et al., 2021). Они осуществляют гидролитическое расщепление сложноэфирной связи между боковыми алкильными цепями и ароматическим кольцом ЭФК с образо-



**Рис. 2.** Диаграмма накопления биомассы по весу абсолютно сухой биомассы (г АСВ/л) при росте гриба *Peniophora lycii* в средах с ЭФК (1 г/л): К – контрольная среда без добавления ЭФК; 0 – количество внесенной грибной биомассы в расчете на АСВ мицелия в начале культивирования; 3, 6 и 10 – грибная биомасса на 3, 6 и 10 сут культивирования соответственно.

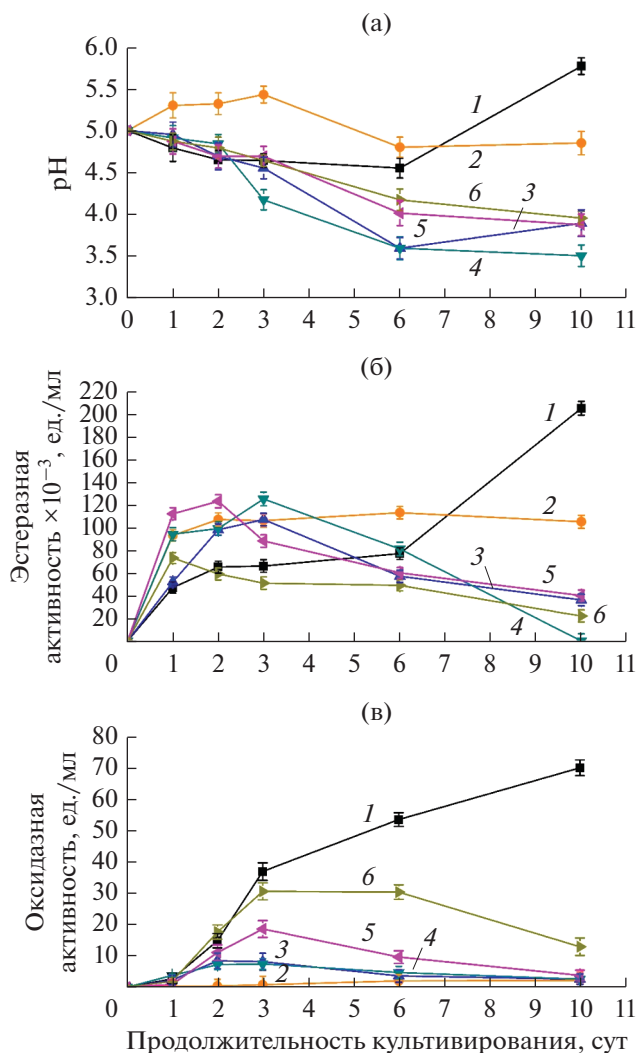
ванием спиртов и моноэфиров. Затем происходит гидролиз последних до фталевой кислоты, после чего бензольное кольцо фталевой кислоты может расщепляться с образованием различных метаболитов. На данной стадии в биодеструкцию могут быть вовлечены такие ферменты, как декарбоксилазы, оксигеназы, оксидазы/дегидрогеназы и др. (Gao, Wen, 2016; Ahmadi et al., 2017; Tang et al., 2017; Ahuactzin-Perez et al., 2018).

В ходе жидкофазного культивирования гриба *P. lycii* в средах с ЭФК, за исключением ДЭФ, наблюдалось постепенное снижение pH (рис. 3а). Наибольшее закисление среды отмечено в среде с ДЭГФ (pH в конце культивирования около 3.5), в средах с ДБФ, ДиБФ и ББФ – pH около 4.0 (рис. 3а). При этом в среде с ДЭФ значение pH культуральной жидкости в первые 3 сут культивирования несколько повышалось (с 5.0 до 5.5); на 6 сут снова снижалось (до 5.0) и далее до конца культивирования не менялось. При этом оксидазная активность в образцах с ДЭФ практически не детектировалась, в то время как эстеразная активность в первые сутки культивирования вырастала до значения 0.1 ед./мл и до конца культивирования оставалась на данном уровне, что превышало контрольные значения эстеразной активности в 2.5 раза (рис. 3б). Самая высокая эстеразная активность детектировалась в средах с ДиБФ и ДЭГФ, пик активности которых приходился на 2 и 3 сут культивирования соответственно, достигая значения около 0.12 ед./мл, после чего активность снижалась. Аналогичная динамика изменения эстеразной активности была в средах с ББФ и ДБФ, с пиками активности на 1 и 3 сут (рис. 3б). Следует отметить, что в целом эстеразная активность штамма возрастала в средах с ЭФК (особенно

но в начале культивирования), а оксидазная активность, наоборот, снижалась (рис. 3в).

Таким образом, для гриба *P. lycii* во всех средах (за исключением ДЭФ) сохранялась общая тенденция к снижению значений pH в процессе культивирования до 3.5–4.0. Этот результат коррелирует с существенным падением эстеразной активности к 10 сут культивирования. Известно, что гидролиз ЭФК в щелочной среде проходит более интенсивно, чем в кислой. Ранее мы показали (Савинова и соавт., 2022), что гриб белой гнили *T. hirsuta* в динамике роста в средах с ЭФК закисляет среду до значений pH 4.3–4.5; при этом отмечается сильная (в 7–8 раз) индукция оксидазной активности по сравнению с контролем (за исключением среды с ДЭГФ), в отличие от *P. lycii*, чья окислительная активность в присутствии фталатов падает. Такое различие в профилях ферментативных активностей говорит о реализации разных механизмов деструкции ЭФК у двух грибов белой гнили *P. lycii* и *T. hirsuta*.

**Эффективность биодеструкции ЭФК грибом *P. lycii* при жидкофазном глубинном культивировании в минеральной среде с глюкозой.** Анализ экстрактов культуральной жидкости *P. lycii* методом ГХ-МС показал, что ДЭФ в концентрации 1 г/л практически не подвергался биодеструкции грибом – остаточное количество данного фталата на 10 сут культивирования составляло ~92–95%. Полученные данные коррелируют со значительным снижением скорости роста *P. lycii* на агаризованной среде и накоплением биомассы в жидкой среде с ДЭФ в концентрации 1 г/л. Существенного убывания ДЭФ во времени не было зафиксировано и при культивировании гриба *T. hirsuta* (Савинова и соавт., 2022). Похожие результаты были получены в работе (Hwang et al., 2008), в которой грибы



**Рис. 3.** Динамика pH (а), оксидазной (б) и эстеразной (в) активностей в процессе жидкофазного культивирования гриба белой гнили *Peniophora lycii* в контрольной среде и средах с добавлением ЭФК (1 г/л). 1 – контрольная среда; 2 – среда с ДЭФ; 3 – с ДБФ; 4 – с ДЭГФ; 5 – с ДиБФ; 6 – с ББФ.

белой гнили *P. ostreatus* и *T. versicolor* менее эффективно деградировали ДЭФ, по сравнению с диметилфталатом и ББФ. Наиболее трудно деградируемым и токсичным для грибов белой гнили, очевидно, является ДЭФ, что подтверждается известными значениями токсичности использованных ЭФК: токсичность убывает в ряду ДЭФ > ДБФ > ДЭГФ (Шкаева и соавт., 2019).

Динамика деструкции ДБФ, ДЭГФ, ДиБФ и ББФ грибом *P. lycii* представлена в табл. 2. Показано, что наиболее эффективно гриб *P. lycii* разрушает ДЭФГ (более 99% на 10 сут), а наименее эффективно – ББФ (около 60% на 10 сут). Эффективность биодеструкции ДБФ и ДиБФ была сопоставима и составляла около 80% на 10 сут

культивирования. Как показали наши предыдущие исследования, эффективность деструкции данных ЭФК грибом *T. hirsuta* была выше, чем при использовании *P. lycii*, особенно в отношении ББФ (табл. 2). При этом скорости деструкции ДБФ и ДЭГФ этими двумя грибами сопоставимы. Показано, что в процессе деструкции ЭФК грибом *P. lycii* участвуют преимущественно гидролитические ферменты (эстеразы, липазы), а грибом *T. hirsuta* – окислительные ферменты (марганец пероксидазы, лигнин пероксидаза и лакказы) (Savinova et al., 2022). Очевидно, что профиль метаболитов у разных грибов должен различаться. Примечательно, что при примерно равной скорости деструкции ДБФ прирост биомассы на 10 сут культивирования у гриба *P. lycii* был выше, чем у *T. hirsuta* (биомасса увеличивается в 2.3 и 1.5 раза соответственно). Схожая картина наблюдалась в присутствии ДиБФ и ББФ. Прирост биомассы у *P. lycii* был выше в присутствии ДиБФ и ББФ по сравнению с *T. hirsuta*, а скорость деструкции фталатов грибами *P. lycii* и *T. hirsuta* ниже – 80 и 95% на 10 сут в среде с ДиБФ, около 60 и почти 100% в среде с ББФ соответственно (табл. 2).

По нашим данным, деструкция ЭФК при участии окислительных лигнолитических ферментов протекает более эффективно, чем при наличии ферментов преимущественно гидролитического действия. Однако образующиеся в результате окислительных реакций метаболиты могут оказаться более токсичными как для окружающей среды, так и для самих грибов. Например, в культуральной жидкости гриба *T. hirsuta*, выращенного в присутствии ДБФ и ДЭГФ, обнаружен 2,6-дитретбутил-4-метилфенол (ионол), отсутствующий в контрольных образцах (Савинова и соавт., 2022). Ионол часто встречается в качестве вторичного метаболита, продуцируемого различными группами организмов, в частности, грибами, однако является аутоксичным (Zhao et al., 2020). Предположительно, индукция биосинтеза ионола грибами является своеобразной защитной реакцией от свободных радикалов, образующихся в результате ферментативного окисления ЭФК. Однако, ввиду своей аутоксичности, накопление ионола в ходе биотрансформации фталатов *T. hirsuta* может приводить к торможению роста гриба.

Таким образом, эффективность биодеструкции ЭФК с помощью грибов разных экофизиологических групп может сильно варьировать, что обусловлено существенными различиями в составе и композиции их секретлируемых и внутриклеточных мультиферментных комплексов. Полученные результаты могут быть использованы для установления механизмов биоразложения ЭФК различными грибами белой гнили. Также результаты могут быть приняты во внимание при отборе

**Таблица 2.** Динамика биодеградации ЭФК (1 г/л) грибами белой гнили *Peniophora lycii* (Pl) и *Trametes hirsuta* (Th) в процессе жидкофазного глубинного культивирования

| Время, сут | Остаточное количество ЭФК*, % |            |            |            |            |             |            |            |
|------------|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
|            | ДБФ                           |            | ДЭГФ       |            | ББФ        |             | ДиБФ       |            |
|            | Pl                            | Th**       | Pl         | Th**       | Pl         | Th**        | Pl         | Th**       |
| 3          | 53.3 ± 1.8                    | 34.0 ± 2.0 | 22.3 ± 1.5 | 60.8 ± 1.9 | 89.2 ± 2.3 | 1.3 ± 0.3   | 60.0 ± 1.8 | 19.0 ± 1.2 |
| 6          | 19.8 ± 1.3                    | 21.7 ± 0.6 | 2.0 ± 0.6  | 7.4 ± 0.2  | 65.5 ± 1.7 | 0.2 ± 0.05  | 38.8 ± 1.5 | 8.0 ± 0.6  |
| 10         | 17.8 ± 0.9                    | 11.8 ± 1.2 | 1.0 ± 0.5  | 0.8 ± 0.5  | 40.5 ± 1.2 | 0.15 ± 0.05 | 19.3 ± 0.8 | 4.8 ± 0.3  |

\* За 100% принято содержание ЭФК в культуральной жидкости в момент внесения 10 г биомассы сырого грибного мицелия.  
\*\* Савинова и соавт., 2022; Savinova et al., 2022.

конкретных штаммов базидиальных грибов для использования с целью биоремедиации.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ № 21-14-00306.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Савинова О.С., Шабаяев А.В., Глазунова О.А., Еремин С.А., Федорова Т.В. Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибами белой гнили // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. С. 484–499.
- Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A., Eremin S.A., Fedorova T.V. Biodestruction of phthalic acid esters by white rot fungi // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 598–612.  
<https://doi.org/10.31857/S0555109922050142>
- Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
- Шкаева И.Е., Солнцева С.А., Никулина О.С., Николаев А.И., Дулов С.А., Земляной А.В. Токсичность и опасность фталатов // Токсикологический вестник. 2019. Т. 159. № 6. С. 3–9.
- Ahmadi E., Yousefzadeh S., Ansari M., Ghaffari H.R., Azari A., Miri M., Nabizadeh A.M.R., Kakavandi B., Ahmadi P., Badi M.Y., Gholami M., Sharafi K., Karimaei M., Ghoochani M., Brahmmand M.B., Mohseni S.M., Sarkhosh M., Rezaei S., Asghar-nia H., Dehghanifard E., Jafari B., Mortezapour A., Moghaddam V.K., Mahmoudi M.M., Taghipour N. Performance, kinetic, and biodegradation pathway evaluation of anaerobic fixed film fixed bed reactor in removing phthalic acid esters from wastewater // Sci. Rep. 2017. V. 7. 41020.  
<https://doi.org/10.1038/srep41020>

- Ahuactzin-Perez M., Tlecuil-Beristain S., García-Davila J., Santacruz-Juárez E., González-Pérez M., Gutiérrez-Ruiz M.C., Sánchez C. Mineralization of high concentrations of the endocrine disruptor dibutyl phthalate by *Fusarium culmorum* // 3 Biotech. 2018. V. 8. № 42. P. 1–10.  
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-1065-2>
- Akerman-Sanchez G., Rojas-Jimenez K. Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants: A bioengineering approach to water treatment // Environ. Adv. 2021. V. 4. 100071.  
<https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100071>
- Boll M., Geiger R., Junghare M., Schink B. Microbial degradation of phthalates: biochemistry and environmental implications // Environ. Microbiol. Rep. 2020. V. 12. P. 3–15.  
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12787>
- Brenelli L.B., Persinoti G.F., Franco Cairo J.P.L., Liberato M.V., Gonçalves T.A., Otero I.V.R., Mainardi P.H., Felby C., Sette L.D., Squina F.M. Novel redox-active enzymes for ligninolytic applications revealed from multiomics analyses of *Peniophora* sp. CBMAI 1063, a laccase hyper-producer strain // Sci. Rep. 2019. V. 9. 17564.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53608-1>
- Carstens L., Cowan A.R., Seiwert B., Schlosser D. Biotransformation of phthalate plasticizers and bisphenol A by marine-derived, freshwater, and terrestrial fungi // Front. Microbiol. 2020. V. 11. 317.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00317>
- Chang B.V., Yang C.P., Yang C.W. Application of fungus enzymes in spent mushroom composts from edible mushroom cultivation for phthalate removal // Microorganisms. 2021. V. 9. 1989.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091989>
- Das M.T., Kumar S.S., Ghosh P., Shah G., Malyan S.K., Bajjar S., Thakur I.S., Singh L. Remediation strategies for mitigation of phthalate pollution: challenges and future perspectives // J. Hazard. Mater. 2021. V. 409. 124496.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124496>
- de Souza Machado A.A., Lau C.W., Kloas W., Bergmann J., Bachelier B.J., Faltin E., Becker R., Görlich A.S., Rillig M.C. Microplastics can change soil properties and affect plant performance // Environ. Sci. Technol. 2019. V. 53. P. 6044–6052.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01339>
- Dutta S., Haggerty D.K., Rappolee D.A., Ruden D.M. Phthalate exposure and long-term epigenomic consequences: a review // Front. Genet. 2020. V. 11. 405.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00405>
- Gao D., Wen Z. Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation, and removal

- during wastewater treatment processes // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 541. P. 986–1001.
- González-Márquez A., Ahuactzin-Pérez M., Sánchez C. *Lentinula edodes* grown on di(2-ethylhexyl)phthalate-containing media: mycelial growth and enzyme activities // *BioResources*. 2015. V. 10. P. 7898–7906. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.7898-7906>
- Hofmann U., Schlosser D. Biochemical and physicochemical processes contributing to the removal of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. P. 2381–2399. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7113-0>
- Hwang S., Choi H.T., Song H. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus* // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 18. P. 767–772.
- Li H., Dai Q., Yang M., Li F., Liu X., Zhou M., Qian X. Unraveling consequences of soil micro- and nano-plastic pollution on soil-plant system: implications for nitrogen (N) cycling and soil microbial activity // *Chemosphere*. 2020. V. 260. 127578. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127578>
- Ma J., Yue H., Li H., Zhang J., Zhang Y., Wang X., Gong S., Liu G. Selective delignification of poplar wood with a newly isolated white-rot basidiomycete *Peniophora incarnata* T-7 by submerged fermentation to enhance saccharification // *Biotechnol. Biofuels*. 2021. V. 14. P. 135. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01986-y>
- Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Shakhova N.V., Savinova O.S., Vasina D.V., Tyazhelova T.V., Psurtseva N.V., Fedorova T.V. Fungal adaptation to the advanced stages of wood decomposition: insights from the *Steccherinum ochraceum* // *Microorganisms*. 2019. V. 7. 527. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110527>
- Naveen K.V., Saravanakumar K., Zhang X. Anbazhagan K., Wang M. Impact of environmental phthalate on human health and their bioremediation strategies using fungal cell factory – a review // *Environ. Res.* 2022. V. 214. 113781. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113781>
- Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A. et al. Benzyl butyl phthalate and diisobutyl phthalate biodegradation by white-rot fungus *Trametes hirsuta* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. Suppl. 1. P. S113–S125. <https://doi.org/10.1134/S0003683822100118>
- Shabaev A.V., Moiseenko K.V., Glazunova O.A. Savinova O.S., Fedorova T.V. Comparative analysis of *Peniophora lycii* and *Trametes hirsuta* exoproteomes demonstrates “Shades of Gray” in the concept of white-rotting fungi // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. 10322. <https://doi.org/10.3390/ijms231810322>
- Suárez-Segundo J.L., Vazquez-Lopez D., Torres-Garcia J.L., Ahuactzin-Perez M., Montiel-Martínez N., Tlecuitl-Beristain S., Sánchez C. Growth of colonies and hyphal ultrastructure of filamentous fungi grown on dibutyl phthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate // *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2013. V. 12. P. 499–504.
- Tang Y., Zhang Y., Jiang L., Yang C., Rittmann B.E. Enhanced dimethyl phthalate biodegradation by accelerating phthalic acid di-oxygenation // *Biodegradation*. 2017. V. 28. P. 413–421. <https://doi.org/10.1007/s10532-017-9805-x>
- Tran H.T., Lin C., Bui H.-T., Nguyen M.K., Cao N.D.T., Mukhtar H., Hoang H.G., Varjani S., Ngo H.H., Nghiem L.D. Phthalates in the environment: characteristics, fate and transport, and advanced wastewater treatment technologies // *Bioresour. Technol.* 2022. V. 344. 126249. <https://doi.org/10.1128/jcm.02479>
- Weaver J.A., Beverly B.E.J., Keshava N. Mudipalli A., Arzuaga X., Cai C., Hoichkiss A.K., Makris S.L., Yost E.E. Hazards of diethyl phthalate (DEP) exposure: a systematic review of animal toxicology studies // *Environ. Int.* 2020. V. 145. 105848. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105848>
- Zhao F., Wang P., Lucardi R.D., Su Z., Li S. Natural sources and bioactivities of 2,4-di-tert-butylphenol and its analogs // *Toxins*. 2020. V. 12. 35. <https://doi.org/10.3390/toxins12010035>

## Biodegradation of Phthalic Acid Esters by the White Rot Fungus *Peniophora lycii*

O. S. Savinova<sup>1</sup>, A. V. Shabaev<sup>1</sup>, and T. V. Fedorova<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: fedorova\_tv@mail.ru

Received December 15, 2022; revised December 17, 2023; accepted December 19, 2023

**Abstract**—The ability of the white rot fungus *Peniophora lycii* to degrade such phthalic acid esters (PAEs) as diethyl phthalate (DEP), dibutyl phthalate (DBP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), diisobutyl phthalate (DiBP), and *n*-butylbenzyl phthalate (BBP) was studied. It was shown that DEHP was most efficiently biodegraded by the fungus (over 98% on day 6 of cultivation). The residual content of DBP and DiBP in the culture liquid of the fungus at the end of cultivation (10 days) was ~17–18%. BBP turned out to be the most difficult-to-degrade compound: its residual content on day 10 of *P. lycii* cultivation was ~40%. DEP was resistant to fungal biodegradation, and exhibited a toxic effect at 1.5 g/L: the rate of radial growth of the fungus on agar decreased threefold compared to the control, and the amount of fungal biomass during liquid-phase deep cultivation decreased by about 1.5 times. During the cultivation of *P. lycii* on media with PAEs, an increase in esterase activity by about 2 times and a significant decrease (by 2–4 times) in oxidase activity was shown compared to the control medium without phthalates.

**Keywords:** phthalic acid esters, biodegradation, white rot fungi, *Peniophora lycii*