

УДК 579.66

БИОДЕСТРУКЦИЯ ЭФИРОВ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ ГРИБАМИ БЕЛОЙ ГНИЛИ

© 2022 г. О. С. Савинова¹, А. В. Шабаев¹, О. А. Глазунова¹, С. А. Еремин^{1, 2}, Т. В. Фёдорова^{1, *}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 25.11.2021 г.

После доработки 10.12.2021 г.

Принята к публикации 14.12.2021 г.

Изучена способность грибов белой гнили из разных экофизиологических групп (*Trametes hirsuta* — первичный дереворазрушающий сапротроф, *Steccherinum ochraceum* — вторичный дереворазрушающий сапротроф, *Crucibulum laeve* — подстилочный сапротроф, и *Agrocybe praecox* — гумусовый сапротроф) к деградации эфиров фталевой кислоты (ЭФК). Показано, что диэтилгексилфталат (ДЭГФ), с более длинными и разветвленными углеводородными цепями, быстрее подвергался биодеструкции дереворазрушающими сапротрофами такими, как *T. hirsuta* и *S. ochraceum*, с эффективностью более 99%. Дибутилфталат (ДБФ), менее гидрофобный с более короткими углеводородными звеньями, наиболее эффективно трансформировался подстилочным сапротрофом *C. laeve* (до 96.5%). Диэтилфталат (ДФ) оказался наиболее токсичным для всех грибов. Из всех исследованных грибов *T. hirsuta* проявлял наибольшую устойчивость к повышенным концентрациям ДЭФ в среде. Показано, что грибы разрушают ЭФК с образованием различных метаболитов в зависимости от состава мультиферментного комплекса гриба. Среди вторичных метаболитов обнаружен ионол — антиоксидант, образуемый грибами при внесении ЭФК в среду.

Ключевые слова: эфиры фталевой кислоты, деградация, биодеструкция, базидиомицеты, грибы белой гнили

DOI: 10.31857/S0555109922050142

Проблема утилизации устойчивых токсичных органических загрязнителей в последнее время становится все более актуальной. К таким распространенным ксенобиотикам относятся эфиры фталевой кислоты (ЭФК, фталаты) — маслянистые жидкости без цвета и запаха, широко используемые для придания гибкости пластмассам, при изготовлении резины, полимеров, красок и топлива, в продуктах медицинского назначения, а также присутствующие в широком спектре продукции для личной гигиены [1]. ЭФК ковалентно не связаны с содержащей их продукцией, поэтому легко высвобождаются и попадают в различные биологические системы (реки, почву, воздух), оказывая серьезное негативное влияние не только на микробные сообщества почвы и круговорот питательных веществ [2, 3], но и нанося вред здоровью животных и человека, попадая в организм при вдыхании, перорально или трансдермальном всасывании [4–6]. ЭФК и их производные признаны потенциально опасными, так как оказывают негативное влияние на эндокринную систему млекопитающих, токсичны для пе-

чени и могут оказывать тератогенное и канцерогенное действие. Показано также негативное влияние ЭФК как на мужскую [1], так и на женскую [7] репродуктивную систему. ЭФК обнаруживаются и в пищевых продуктах, которые становятся источником попадания этих ксенобиотиков в организм человека [8, 9]. Все это свидетельствует о важности их удаления из окружающей среды.

Возможные пути разложения таких соединений в природе — гидролиз, фоторазложение и микробная деградация. Процесс гидролиза в основном происходит в водной среде, однако не всегда сопровождается полной деградацией ЭФК. Фоторазложение происходит очень медленно, а период полураспада составляет от нескольких лет до нескольких столетий. Таким образом, в настоящее время биодеструкция ЭФК с помощью ферментных систем микроорганизмов считается основным перспективным путем их деградации в окружающей среде за относительно короткое время [10]. Так, были изучены и подробно описаны различные виды бактерий, способные к деградации ЭФК [11–14]. Однако немногие способны к пол-

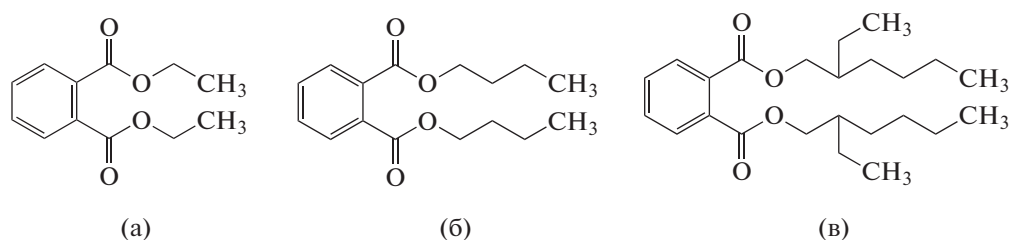


Рис. 1. Структура диэтилфталата, ДЭФ (а); дибутилфталата, ДБФ (б); диэтилгексилфталата, ДЭГФ (в).

ной минерализации этих соединений и могут быть использованы в практических целях. Базидиальные грибы являются более перспективными объектами, благодаря их способности эффективно разрушать труднодеградируемые соединения [15]. При этом разработка стратегий, основанных на применении как самих грибных культур, так и синтезируемых ими ферментов, требует четкого понимания механизмов биodeградации каждого ксенобиотика. Известно, что способность к разложению ЭФК различная у разных штаммов грибов и зависит от синтезируемого ими комплекса ферментов и факторов окружающей среды. В литературе представлено значительное количество работ, которые показывают, что грибы, благодаря своим богатым и разнообразным мультиферментным комплексам, являются перспективными биодеструкторами различных поллютантов, в том числе ЭФК [15–18]. Таким образом, скрининг штаммов на способность к деградации ЭФК и изучение процесса их деградации является важным направлением современных исследований.

В качестве объектов для изучения деградации использованы диэтиловый эфир фталевой кислоты (ДЭФ, рис. 1а), дибутиловый эфир фталевой кислоты (ДБФ, рис. 1б) и диэтилгексилфталат (ДЭГФ, рис. 1в) — широко распространенные токсичные органические загрязнители, которые при попадании в организм человека могут нарушить работу эндокринной системы. Их относят к соединениям, нуждающимся в приоритетном контроле [19].

Цель работы — изучение биодеструкции ДЭФ, ДБФ и ДЭГФ грибами белой гнили из различных экофизиологических групп.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе были использованы следующие реактивы: диэтилфталат, дибутилфталат, диэтилгексилфталат фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Другие материалы и растворители квалификации “х. ч.” и “ч. д. а.” были приобретены у российских производителей.

Культуры и условия культивирования. Штаммы базидиомицетов *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, *Stec-*

cherinum ochraceum LE-BIN 3174, *Crucibulum laeve* LE-BIN 1700 и *Agrocybe praecox* LE-BIN 2506 получены из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова (Санкт-Петербург, Россия).

Для оценки роста в присутствии ЭФК и определения общей оксидазной активности (ОА) грибы культивировали на твердой среде Мальтекс-агар, следующего состава (г/л): неохмеленный солодовый экстракт Maltax 10 (“ОУ Maltax АВ”, 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 засеивали мицелиальные блоки (d = 8 мм) грибов белой гнили и инкубировали в термостате при 25°C, измеряя в процессе роста диаметр мицелиального мата.

Инокулят грибов выращивали стационарно в 750 мл конических колбах с фарфоровыми бусами на глюкозо-пептонной (ГП) среде следующего состава (г/л): пептон — 3.0, глюкоза — 10, KH_2PO_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, CaCl_2 — 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0.05, ZnSO_4 — 0.001, FeSO_4 — 0.0005, при 25°C 10–14 сут в зависимости от скорости роста гриба. Перед засевом инокулят измельчали бусами 20 мин при 180 об./мин до получения однородной суспензии, которую затем стерильно вносили в колбы для культивирования в объеме 10%.

Для изучения накопления биомассы и способности к биодеструкции ЭФК грибы выращивали глубинным способом на ГП среде на роторной качалке при 180 об./мин и 27°C. Выросшие грибные пеллеты отделяли фильтрованием и промывали 0.02%-ным стерильным водным раствором Твин 80, после чего 10 г грибной биомассы стерильно переносили в конические колбы на 250 мл со 100 мл жидкой минеральной среды следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 0.6, K_2HPO_4 — 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5, CaCl_2 — 0.05, MnSO_4 — 0.05, ZnSO_4 — 0.001, FeSO_4 — 0.0005, NaNO_3 — 3.0, глюкоза — 10.0, Твин 80 — 0.2. Перед внесением грибной биомассы в опытные колбы добавляли растворы ЭФК в концентрации 1.0 г/л, инкубировали на ро-

торной качалке при 100 об./мин и 25°C. Образцы культуральной жидкости (**КЖ**) отбирали на 3, 6, 10 сут инкубации и хранили при –73°C до проведения анализа. Грибную биомассу отделяли фильтрованием и высушивали при температуре $100 \pm 5^\circ\text{C}$ до постоянной массы.

Скорость радиального роста (u_r). Скорость радиального роста рассчитывали по графику зависимости диаметра колонии от времени роста с анализом линейной регрессии. Диаметр измеряли линейкой с первых суток инкубации до момента, когда гриб полностью покрывает поверхность чашки Петри [20].

Общая эстеразная активность (ЭА). Оценку эстеразной активности в КЖ проводили при культивировании на жидкой минеральной среде с содержанием фталатов 1.0 г/л. Активность определяли спектрофотометрически на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (“PerkinElmer”, США), используя *n*-нитрофенил бутират в качестве субстрата. Реакцию проводили в натрий ацетатном буфере, pH 4.5 при 40°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали натрий фосфатным буфером, pH 7.3, оптическую плотность определяли при длине волны $\lambda = 400$ нм. Расчет эстеразной активности проводили по формуле:

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

где R_E — предварительное разбавление КЖ перед внесением в раствор субстрата;

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

$A_{400(\text{S})}$ — контроль, в котором вместо КЖ использовали воду; $A_{400(\text{E})}$ — контроль без внесения в реакционную смесь субстрата.

Определение общей оксидазной активности (ОА). ОА определяли в КЖ при выращивании грибов на жидкой минеральной среде с содержанием фталатов 1.0 г/л. Активность определяли спектрофотометрически на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 при длине волны $\lambda = 436$ нм в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, pH 4.5, как описано в работе [21] с использованием раствора 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиоизолин-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.

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Качественную оценку содержания ЭФК в КЖ грибов в процессе культивирования проводили методом ТСХ. Для этого 3 мл КЖ экстрагировали равным объемом дихлорметана (ДХМ), процедуру повторяли трижды. Полученный экстракт упаривали досуха и перерастворяли в 200 мкл ДХМ. По 10 мкл полученного экстракта наносили на пластину для аналитической хроматографии TLC Silica gel 60 F254 (“Merck”, Германия). В качестве

контроля использовали растворы коммерческих ЭФК в ДХМ (по 10 мкг на точку). Элюцию проводили восходящим методом, используя в качестве подвижной фазы: 1) смесь ДХМ и гексана (2 : 1 об./об.) для предварительной оценки наличия ЭФК и продуктов деградации; 2) ДХМ для визуализации продуктов деградации, более полярных, чем исходные ЭФК. Визуализацию проводили в УФ-свете при длине волны 254 нм. Пластины обрабатывали 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном водном растворе HClO_4 и проявляли при температуре 100–110°C. Чувствительности метода ТСХ было достаточно для наблюдения за убыванием исходных ЭФК в процессе культивирования, а также визуализации в основном полярных продуктов биодеструкции.

Для разделения смеси полярных продуктов с целью их идентификации использовали препаративную ТСХ. Для этого сухой остаток, полученный после упаривания экстракта КЖ, растворяли в минимальном объеме ДХМ, наносили раствор на пластинки для ТСХ полосой на линии старта и хроматографировали восходящим методом в ДХМ. В УФ-свете пластинку делили на зоны по различным значениям R_f . Соединения элюировали отдельно из каждой зоны с использованием ДХМ. Элюаты упаривали досуха. Для контроля полученных элюатов проводили ТСХ. Идентификацию продуктов в образцах проводили с помощью ГХ-МС анализа.

Газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС). Оценку степени и скорости биодеструкции ЭФК в процессе культивирования грибов белой гнили проводили после анализа КЖ с использованием метода ГХ-МС. Для этого получали гексановые экстракты образцов КЖ (1 : 1 об./об.) и анализировали методом газо-жидкостной хроматографии в двух режимах: регистрация ионных масс в полном спектре (TIC, диапазон масс m/z 45–400) и регистрация по характерному для ЭФК основному иону (MIS, $m/z = 149$ — протонированный фталевый ангидрид).

Анализ проводили на газовом хроматографе GC-MS QP 2010 Ultra EI (“Shimadzu”, Япония), снабженном автоматическим устройством ввода пробы и квадрупольным масс-спектрометрическим детектором. Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LabSolutions GCMSsolution (“Shimadzu”, Япония). Использовали колонку MDN-5 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм (“Supelco”, США), в качестве подвижной фазы — гелий, скорость потока элюента — 1 см³/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.

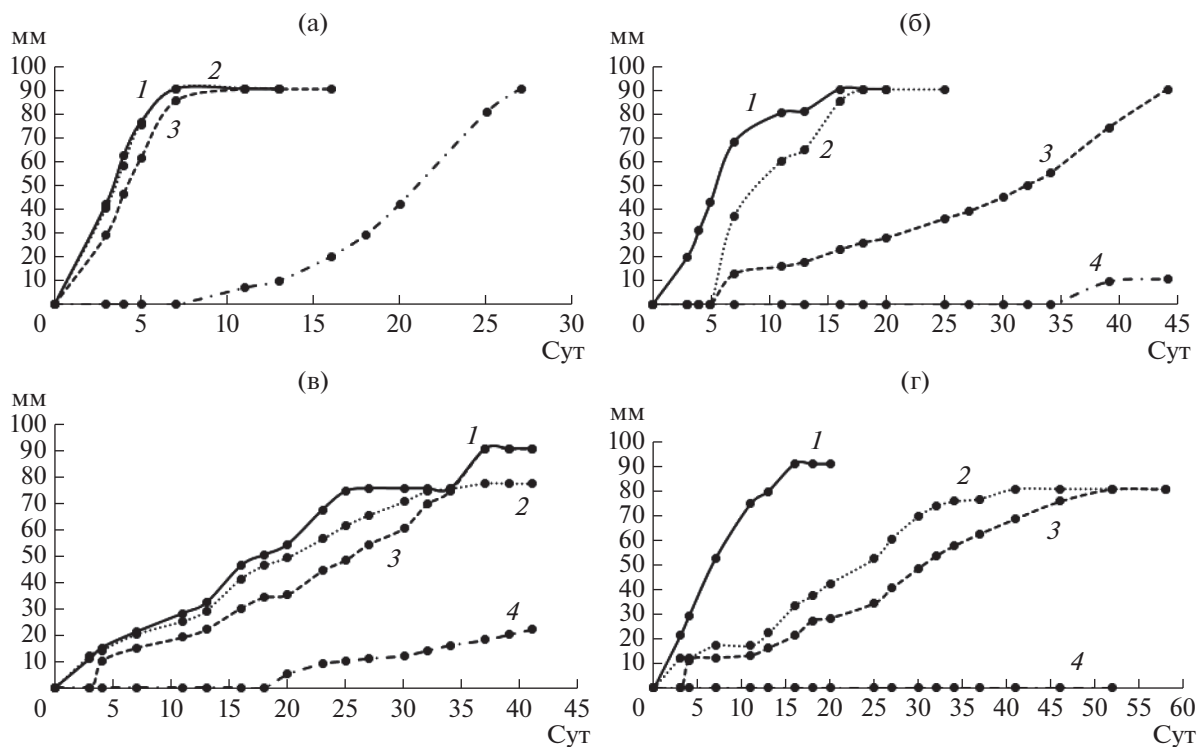


Рис. 2. Кривые роста грибов на агаризованной среде с ДЭФ. а — *T. hirsuta*, б — *S. ochraceum*, в — *C. laeve*, г — *A. praecox*; 1 — контрольная среда без ЭФК, 2 — среда с 0.5 г/л ДЭФ, 3 — среда с 1 г/л ДЭФ, 4 — среда с 1.5 г/л ДЭФ.

Все измерения проводили в 3 биологических повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая обработка данных проводилась с использованием метода дисперсионного анализа. При обнаружении достоверного значения ($p < 0.05$) F-статистики, различия между индивидуальными средними были оценены с использованием теста множественного сравнения Тьюки ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что базидиальные грибы белой гнили могут использоваться для биоремедиации сточных вод и почв, загрязненных различными органическими соединениями. Благодаря своему уникальному комплексу секретируемых ферментов, они способны модифицировать даже такие труднодеградируемые полимеры, как лигнин, входящий в состав древесины. Известно, что такая высокая эффективность обусловлена существенными различиями в составе и композиции секретируемых мультиферментных комплексов (содержащих такие ферменты, как лакказа, лигнинпероксидаза, Mn-зависимая пероксидаза) у грибов из разных экофизиологических групп, участвующих на разных стадиях разложения древесины [22]. Этот факт позволил предположить, что такие различия могут

обуславливать особенности деградации ЭФК разными представителями базидиомикетов. В настоящей работе был проведен сравнительный анализ способности грибов белой гнили — представителей различных экофизиологических групп, а именно: *Trametes hirsuta* (первичные дереворазрушающие сапротрофы), *Steccherinum ochraceum* (вторичные дереворазрушающие сапротрофы), *Crucibulum laeve* (подстилочные сапротрофы), *Agrocybe praecox* (гумусовые сапротрофы), к деградации трех распространенных ЭФК.

Влияние ЭФК на рост грибов белой гнили. Хорошо известно, что начальная концентрация ЭФК может влиять на способность к их биодegradации различными организмами [18, 20]. Экстремальные концентрации загрязняющих веществ трудно поддаются деградации большинством организмов. Для того, чтобы определить рабочий диапазон концентраций ЭФК, в данном исследовании была проведена предварительная оценка способности выбранных для исследования грибов к росту на агаризованных средах, содержащих разные концентрации фталатов. На рис. 2–4 приведены кривые роста грибных культур на среде с ДЭФ, ДБФ и ДЭГФ, в табл. 1 представлены скорости радиального роста грибов.

Эксперимент показал, что при увеличении концентрации ДЭФ в среде скорость роста всех штаммов замедлялась, причем на среде с кон-

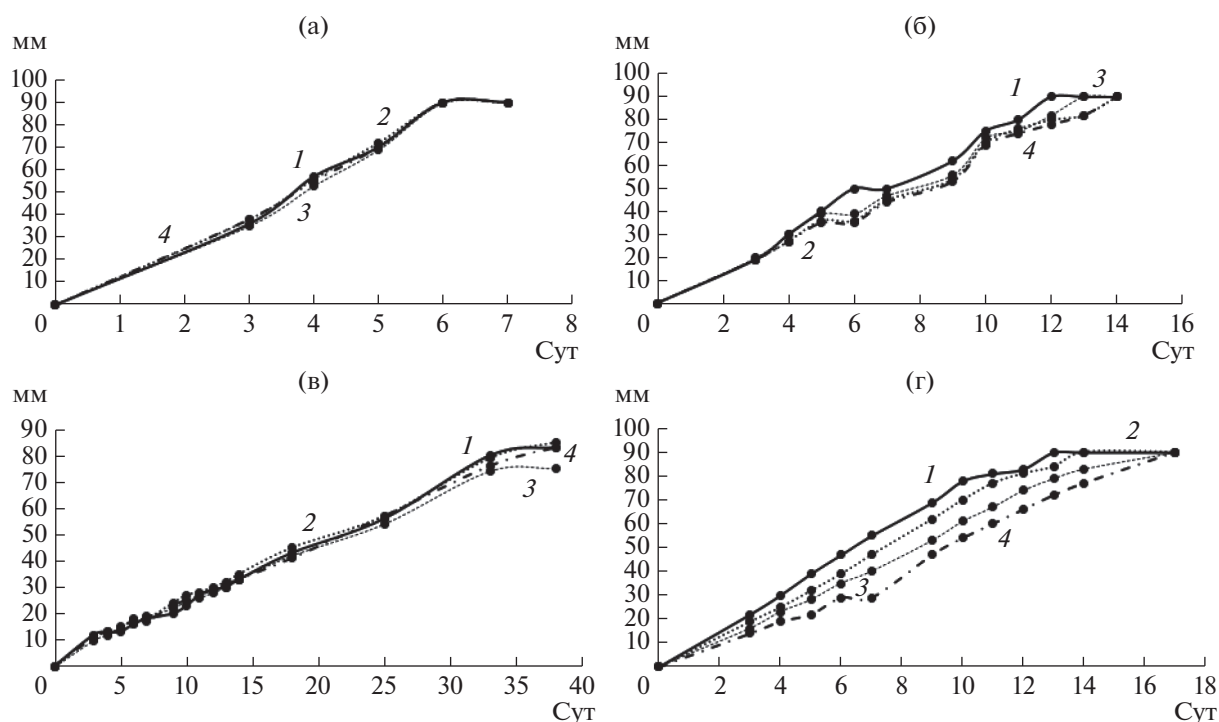


Рис. 3. Кривые роста грибов на агаризованной среде с ДБФ. а – *T. hirsuta*, б – *S. ochraceum*, в – *C. laeve*, г – *A. praecox*; 1 – контрольная среда без ЭФК, 2 – среда с 0.5 г/л ДБФ, 3 – среда с 1 г/л ДБФ, 4 – среда с 1.5 г/л ДБФ.

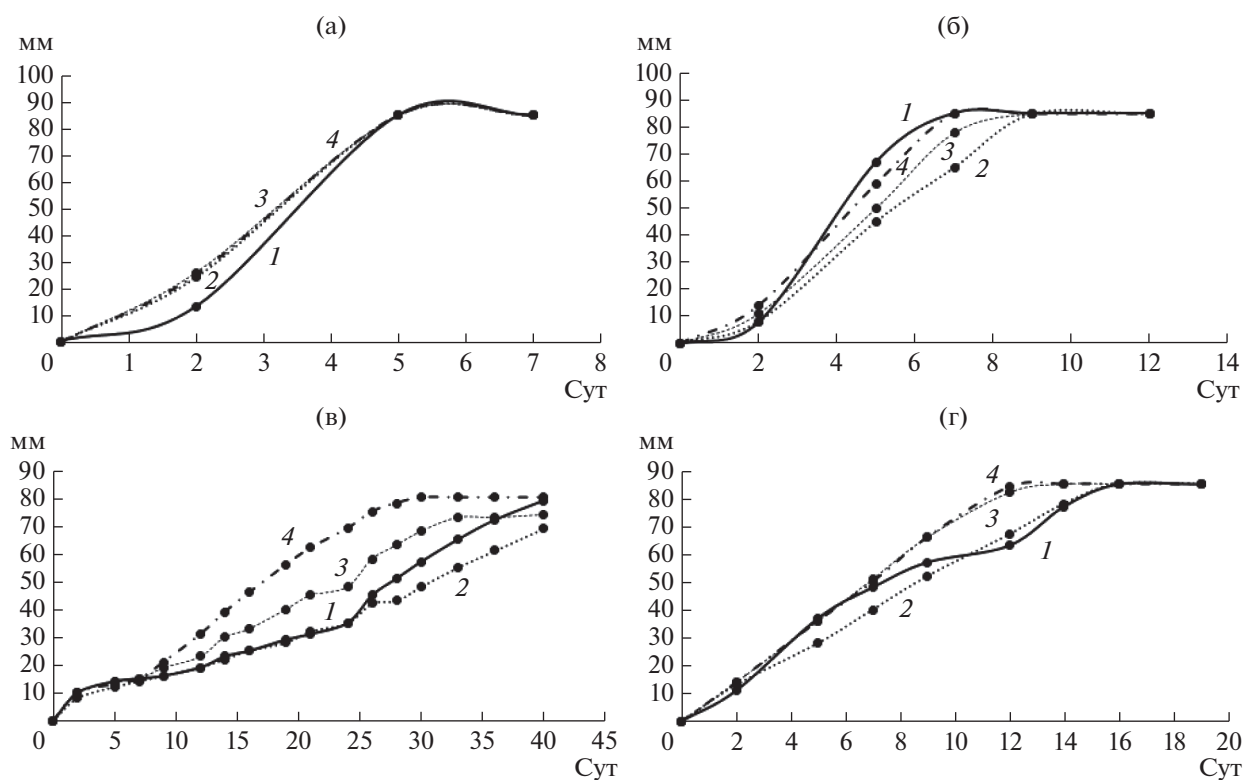


Рис. 4. Кривые роста грибов на агаризованной среде с ДЭГФ. а – *T. hirsuta*, б – *S. ochraceum*, в – *C. laeve*, г – *A. praecox*; 1 – контрольная среда без ЭФК, 2 – среда с 0.5 г/л ДЭГФ, 3 – среда с 1 г/л ДЭГФ, 4 – среда с 1.5 г/л ДЭГФ.

Таблица 1. Скорость радиального роста штаммов, u_r

ЭФК	Концентрация, г/л	u_r (мм/сут)			
		<i>T. hirsuta</i>	<i>S. ochraceum</i>	<i>C. laeve</i>	<i>A. praecox</i>
ДЭФ	0	13.4 ± 0.6	6.6 ± 0.3	5.7 ± 0.2	2.4 ± 0.05
	0.5	13.3 ± 0.6	6.2 ± 0.3	1.6 ± 0.05	2.1 ± 0.05
	1.0	12.4 ± 0.6	1.7 ± 0.08	1.2 ± 0.05	2.3 ± 0.05
	1.5	0.6 ± 0.03	0.1 ± 0.005	Нет роста	0.5 ± 0.01
ДБФ	0	14.9 ± 0.7	7.4 ± 0.2	7.1 ± 0.3	2.2 ± 0.05
	0.5	14.9 ± 0.7	6.7 ± 0.2	6.7 ± 0.3	2.2 ± 0.05
	1.0	14.8 ± 0.7	6.8 ± 0.2	5.8 ± 0.3	2.0 ± 0.05
	1.5	14.8 ± 0.7	6.5 ± 0.2	5.6 ± 0.2	2.1 ± 0.05
ДЭГФ	0	17.6 ± 0.9	13.3 ± 0.7	4.7 ± 0.2	1.9 ± 0.05
	0.5	17.3 ± 0.9	9.9 ± 0.5	5.2 ± 0.2	1.6 ± 0.05
	1.0	17.2 ± 0.9	10.4 ± 0.5	6.4 ± 0.3	2.0 ± 0.05
	1.5	17.2 ± 0.9	12.6 ± 0.6	6.4 ± 0.3	2.9 ± 0.05

центрацией ДЭФ 1.5 г/л существенная задержка роста по сравнению с контролем наблюдалась у *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *A. praecox* (в 22, 66 и 5 раз соответственно), а гриб *C. laeve* не рос на среде с такой концентрацией ДЭФ. Следует отметить, что наиболее устойчивыми к присутствию ДЭФ в среде оказались *T. hirsuta* и *A. praecox* – их рост на контрольной среде и среде с 0.5 г/л ДЭФ не отличался, а на среде с ДЭФ в концентрации 1 г/л и выше рост гриба *T. hirsuta* замедлялся в большей степени, по сравнению с *A. praecox*. Все штаммы хорошо росли на среде с ДБФ. Наличие этого фталата в среде не оказывало влияния на рост *T. hirsuta*, на рост *S. ochraceum* и *A. praecox* влияние было незначительное, при этом рост *C. laeve* замедлялся при возрастании концентрации ДБФ в среде.

При выращивании грибов на среде с ДЭГФ наблюдали увеличение скорости роста *T. hirsuta*, по сравнению с контрольной средой, увеличение концентрации ДЭГФ в среде также ускоряло рост грибов *A. praecox* и *C. laeve*, но замедляло рост *S. ochraceum* по сравнению с контролем. Увеличение скорости радиального роста на средах с добавлением ДЭГФ было ранее отмечено также для таких грибов белой гнили как *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus* и *Lentinula edodes* [18, 20], причем увеличение содержания ДЭГФ приводило к увеличению скорости роста. Авторы предположили, что грибы могут использовать фталаты в качестве источника углерода и энергии, так как наблюдалась четкая корреляция между диаметром гиф и концентрацией фталатов в среде.

Таким образом, для последующих экспериментов была выбрана концентрация ЭФК 1 г/л,

которая, как было показано выше, не приводила к значительному ингибированию роста грибов.

На следующем этапе исследовали способность грибов к биодеструкции ДЭФ, ДБФ и ДЭГФ в жидких средах. При культивировании на минеральной среде с глюкозой и ЭФК в концентрации 1 г/л, наблюдали увеличение биомассы *T. hirsuta* как на контрольной среде, так на среде с ДЭГФ (рис. 5а), причем прирост биомассы продолжался вплоть до 10 сут культивирования. На среде с ДБФ биомасса увеличивалась к 6 сут, но далее не менялась. Биомасса *S. ochraceum* на среде с ДБФ и ДЭГФ увеличивалась к 3 сут на 8.1 и 22.6% соответственно, по сравнению с контрольной средой, но к 10 сут мицелий разрушался, причем более интенсивно в присутствии ДБФ (рис. 5б). Однако при культивировании как первичных, так и вторичных сапротрофов в присутствии ДЭФ количество биомассы оставалось на уровне исходного значения (рис. 5а, б), что согласуется с результатами по ингибированию роста этих грибов на агаризованных средах с ДЭФ (рис. 2а, б).

Наиболее чувствительным к присутствию ЭФК оказался подстилочный сапротроф *C. laeve*. Так, в присутствии ДБФ прирост биомассы не наблюдался, а в присутствии ДЭФ – мицелий гриба вовсе разрушался в ходе культивирования. На среде с ДЭГФ прирост биомассы наблюдался к 3 сут, далее биомасса резко уменьшалась (рис. 5в). Для гумусового сапротрофа *A. praecox* максимум биомассы на минеральных средах с ЭФК наблюдали на 3 сут культивирования, в отличие от контрольной среды (6 сут), но при этом он не превышал максимума биомассы в контроле (рис. 5г). На минеральной среде с ДЭФ был отмечен все же не-

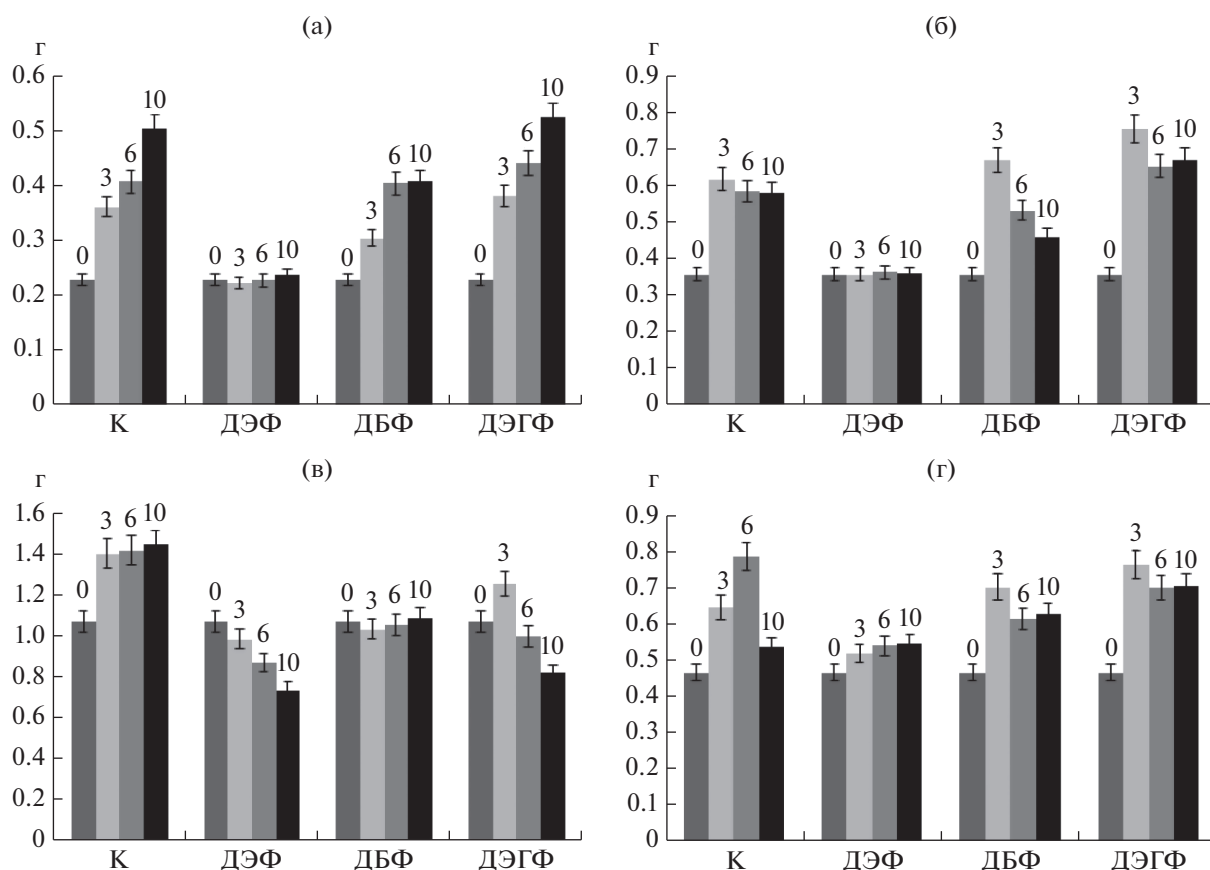


Рис. 5. Диаграмма накопления биомассы (по сухому весу) при росте на среде с ЭФК (1 г/л). К — контрольная среда без ЭФК, 0 — исходная биомасса в расчете на сухой вес мицелия, 3 — биомасса на 3 сут, 6 — на 6 сут, 10 — на 10 сут культивирования. а — *T. hirsuta*, б — *S. ochraceum*, в — *C. laeve*, г — *A. praecox*.

значительный прирост биомассы *A. praecox* в ходе культивирования, которого не наблюдали у *T. hirsuta* и *S. ochraceum*.

Таким образом, в присутствии ЭФК, максимальный прирост биомассы грибов был отмечен на среде с ДЭГФ, однако только у *S. ochraceum* он был больше, чем на контрольной среде. В работе [23] показано, что биомасса *Fusarium culmorum* увеличивалась в присутствии ДБФ, по сравнению с контролем. Авторы предположили, что это связано с использованием фталата в качестве источника углерода, что, однако зависело от используемого организма и сложности структуры фталата.

Необходимо отметить существование различий в характере роста грибов на богатой среде Мальтекс-агар и жидкой минеральной среде. Так, в присутствии 1 г/л ДЭГФ скорость роста *S. ochraceum* на агаризованной среде замедлялась по сравнению с контролем, а в жидкой среде, наоборот, прирост биомассы был больше, по сравнению с контролем. У *C. laeve* на Мальтекс-агаре скорость роста увеличивалась, а на жидкой среде биомассы было значительно меньше, чем в контроле. Таким образом, характер роста *S. ochraceum* и *C. laeve* менялся в за-

висимости от состава среды культивирования. Для *T. hirsuta* и *A. praecox* такой зависимости не было выявлено. Скорость роста и накопление биомассы у *T. hirsuta* на обеих средах не отличалось от контроля, а у *A. praecox* скорость роста и прирост биомассы увеличивались в присутствии ДЭГФ.

Различия в характере роста грибных культур на разных средах в присутствии ЭФК могут быть связаны, в первую очередь, с синтезом ими специфического комплекса ферментов, который может сильно отличаться в зависимости от вида гриба и состава среды культивирования, а также, с различными путями деградации фталатов [20, 24–27].

Кроме того, в ходе жидкофазного культивирования грибов на средах с ЭФК наблюдали различия в изменении pH по сравнению с контрольной средой (рис. 6). Так, например, при культивировании *S. ochraceum* с ДЭФ к 10 сут pH резко снижался до 3.7 (по сравнению с исходным значением pH среды 4.9), в то время как на средах с другими ЭФК, а также контрольной, pH возрастал в процессе культивирования (рис. 6б). У грибов

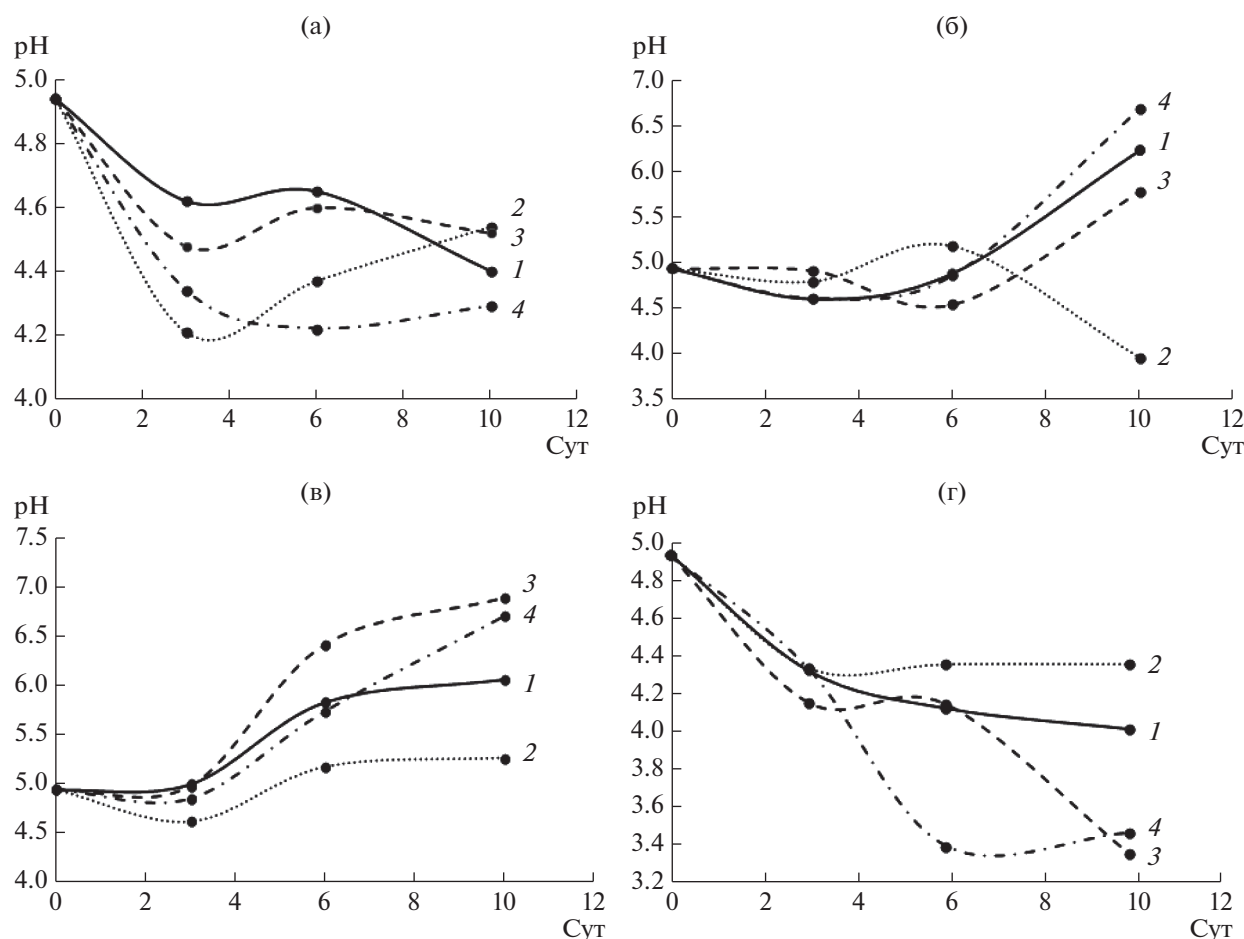


Рис. 6. Изменение pH при жидкофазном культивировании грибов *T. hirsuta* (а), *S. ochraceum* (б), *C. laeve* (в), *A. praecox* (г): 1 – контрольная среда, 2 – ДЭФ, 3 – ДБФ, 4 – ДЭГФ.

C. laeve и *A. praecox* также различалась динамика изменения pH на среде с ДЭФ, однако при этом показатель практически не менялся по сравнению с остальными вариантами эксперимента (рис. 6в, 6г). Для гриба *T. hirsuta* на всех средах сохранялась общая тенденция к снижению значения pH в процессе культивирования (рис. 6а), причем наиболее резкое падение происходило на 3 сут в присутствии ДЭФ.

Защелачивание среды в процессе ферментативной деградации ЭФК можно объяснить образованием продуктов гидролиза. Их присутствие тормозит деградацию ЭФК (эфиры гидролизуются в щелочной среде более интенсивно, чем в более кислой). Предыдущие исследования показали, что разложение ДЭФ и ДБФ зависит от значения pH. Так, скорость деградации ДЭГФ штаммом *Pseudomonas sp.* быстро увеличивалась, когда pH среды увеличивался до 8.5 [13], то же показано для ДБФ штаммом *Agrobacterium sp.* при увеличении pH с 5 до 8 [28].

Было показано, что *T. hirsuta* и *A. praecox* в динамике закисляли среду до 4.3–4.5 и 3.4–4.4 соответственно, что коррелировало с существенным падением у этих грибов ЭА к 10 сут культивирования. У *S. ochraceum* и *C. laeve*, напротив, наблюдалось защелачивание среды в ходе культивирования и соответствующее этому постепенное нарастание эстеразной активности. Однако, не смотря на различную динамику pH и ЭА, для всех 4 грибов на 10 сут степень деградации ДБФ и ДЭГФ составляла 86–99%. Вероятно, в процессах биодеструкции у разных грибов участвуют разные ферменты и механизмы. Так, например, при действии марганец пероксидаз, которые могут принимать участие в деградации ЭФК, отмечается образование свободных радикалов при низких pH, в то время как гидролитическое расщепление сложноэфирной связи между алкильными цепями и ароматическим кольцом ЭФК с образованием сложных моноэфиров, а затем и фталевой кислоты под действием эстераз эффективнее происходит в щелочных условиях.

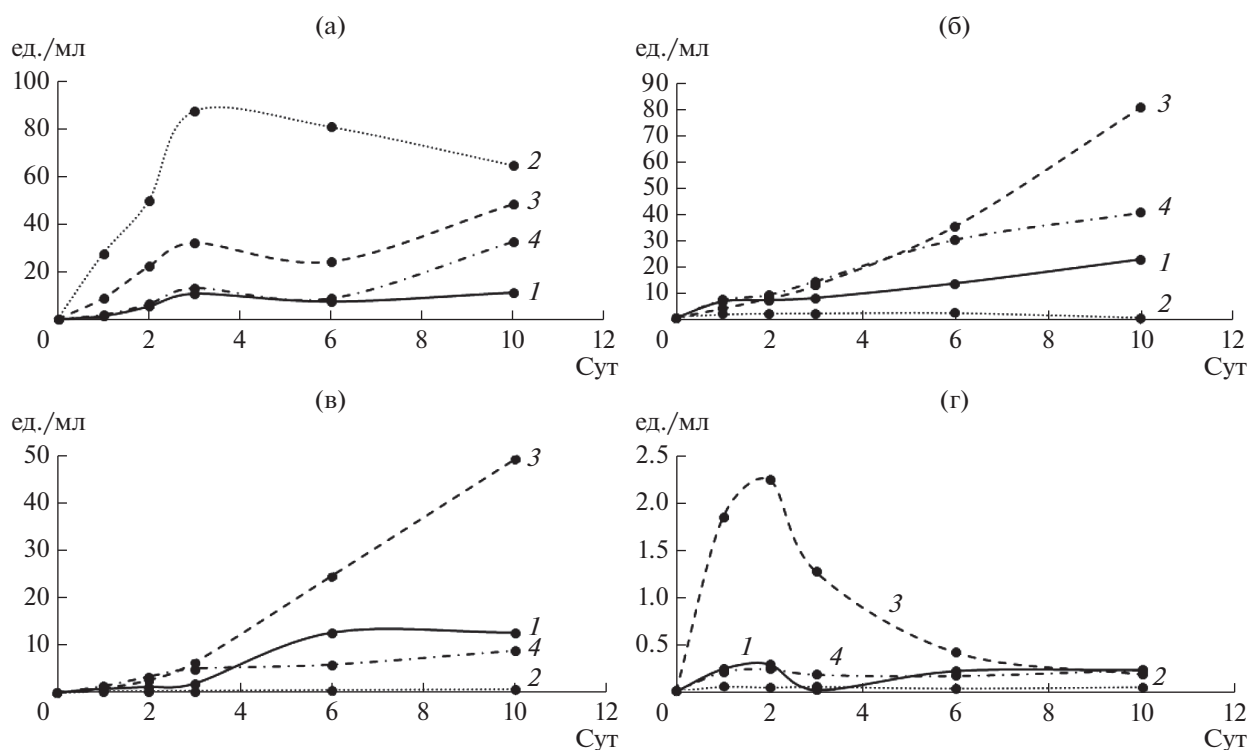


Рис. 7. Общая оксидазная активность КЖ грибов: 1 — контрольная среда, 2 — среда с ДЭФ, 3 — среда с ДБФ, 4 — среда с ДЭГФ; а — *T. hirsuta*, б — *S. ochraceum*, в — *C. laeve*, г — *A. praecox*.

Определение активности ферментов в КЖ грибов. Известно, что от метаболических особенностей штамма, субстрата и условий культивирования зависит уровень экспрессии ферментов. При выращивании гриба *L. edodes* авторы [20] показали увеличение активности внутри- и внеклеточных лакказ и эстераз на среде с ДЭГФ, причем активность лакказы была выше по сравнению с активностью эстеразы при всех концентрациях ДЭГФ. При этом, для других грибов, в частности *P. ostreatus*, выращенных в присутствии бутилбензилфталата, а также ДЭГФ, напротив, активность лакказы была ниже ЭА [24, 25]. Аналогичные результаты были получены для аскомицетов *Fusarium culmorum* и *Trichoderma harzianum* в присутствии ДЭГФ [16]. Таким образом, соотношение секретируемых ферментов может непосредственно влиять на эффективность деградации того или иного ЭФК. Поскольку ЭА и ОА играют важную роль в способности грибов к деструкции сложнодеградируемых соединений, была проведена их оценка при культивировании грибов на жидкой минеральной среде (рис. 7, 8).

Показано, что у *T. hirsuta* максимальная ЭА достигалась в 1 сут в присутствии всех ЭФК, далее на 3 сут культивирования происходило увеличение ОА, особенно в присутствии ДЭФ. После 3 сут ОА *T. hirsuta* в присутствии ДБФ и ДЭГФ продолжала постепенно расти, а в среде с ДЭФ,

наоборот, уменьшаться, что могло быть связано с токсичностью ДЭФ для гриба.

Для *S. ochraceum* пик ЭА достигался на 2–3 сут, при этом ОА возрастала плавно к 10 сут. Напротив, для *C. laeve* и *A. praecox* пики ЭА и ОА совпадали и приходились на 10 и 2 сут соответственно. Наибольшая ЭА достигалась в присутствии ДБФ для грибов *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *A. praecox*, в то время как для *C. laeve* — в присутствии ДЭГФ. При этом максимальные значения ЭА были получены для *C. laeve* (0.16 усл. ед./мл) и *A. praecox* (0.09 усл. ед./мл) в присутствии ДЭГФ и ДБФ соответственно. Биосинтез ферментов может индуцироваться увеличением концентраций ЭФК в среде [18]. Показано, что присутствие ДБФ индуцирует ЭА у гриба *Fusarium culmorum* [27], что согласуется с результатами настоящей работы для всех грибов, кроме *C. laeve*. Однако для *P. ostreatus* также была показана индукция ЭА в присутствии ДЭГФ [25], что аналогично результату, полученному в настоящей работе для *C. laeve*.

В присутствии ДЭФ ОА уменьшалась у всех грибов, по сравнению с контролем, кроме *T. hirsuta*, в КЖ которого активность в присутствии ДЭФ наоборот, существенно увеличивалась. Это согласуется с данными по скорости роста *T. hirsuta* на среде с ДЭФ и с вышеописанными результатами по накоплению биомассы. Таким образом, гриб *T. hirsuta* — наиболее устойчив к присут-

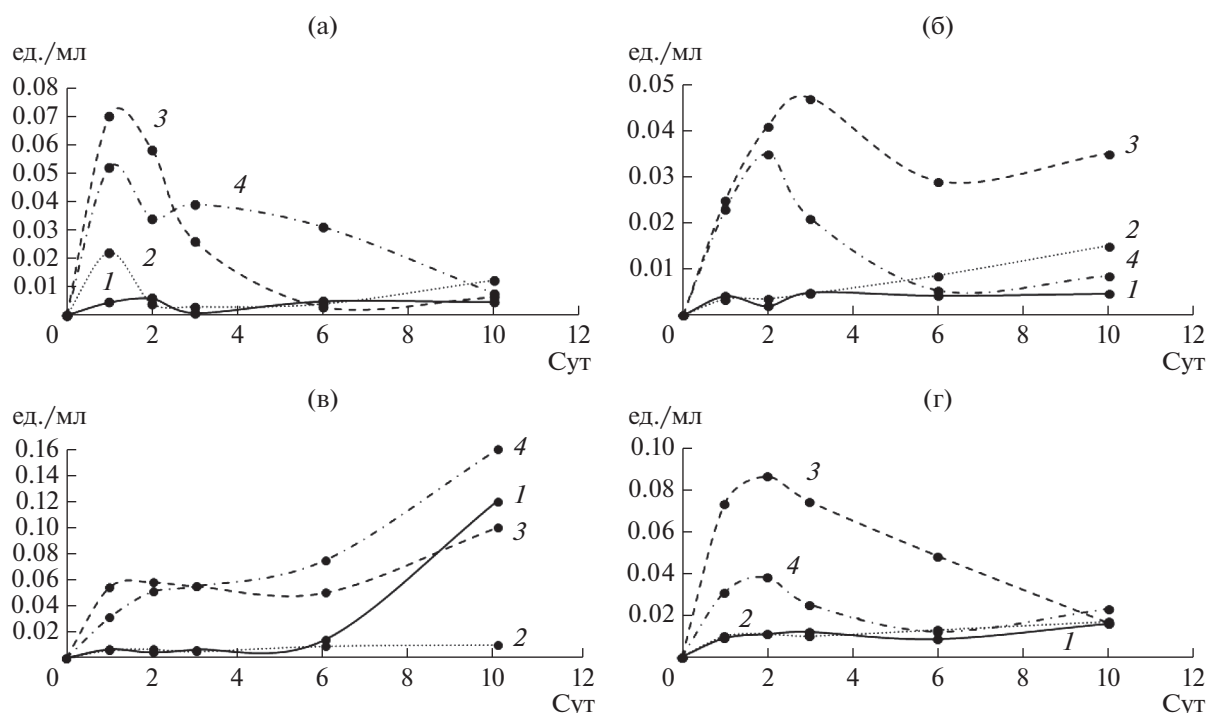


Рис. 8. Общая эстеразная активность КЖ грибов: 1 – контрольная среда, 2 – среда с ДЭФ, 3 – среда с ДБФ, 4 – среда с ДЭГФ; а – *T. hirsuta*, б – *S. ochraceum*, в – *C. laeve*, г – *A. praecox*.

ствию ДЭФ по сравнению с остальными, вероятно, за счет более эффективного комплекса секретируемых оксидаз или других вспомогательных ферментов.

Известно, что на начальной стадии деградации ЭФК ключевыми ферментами являются эстеразы [29], осуществляющие гидролитическое расщепление сложноэфирной связи между алкильными цепями и ароматическим кольцом ЭФК с образованием сложных моноэфиров, а затем фталевой кислоты (ФК) и спиртов. Далее может происходить расщепление бензольного кольца ФК с образованием метаболитов, образующихся при разложении ФК и спиртов. Во вторую стадию могут быть вовлечены такие ферменты, как декарбоксилазы, оксигеназы и оксидазы/дегидрогеназы [26, 27, 30, 31].

Анализ продуктов деструкции ЭФК. Качественный анализ экстрактов КЖ штаммов грибов методом ТСХ показал, что скорость биоразложения ДЭФ у всех грибов была значительно ниже, по сравнению с другими ЭФК, что коррелирует со скоростью их роста на твердой агаризованной среде и накоплением биомассы на жидкой среде с ДЭФ. Существенного убывания ДЭФ во времени не было зафиксировано, продукты реакции не были визуализированы (результаты не представлены), вероятно по причине их крайне низкого содержания. Очевидно, что самым трудно деградируемым и токсичным для грибов белой гнили

оказался ДЭФ, что подтверждается известными значениями токсичности использованных ЭФК: токсичность убывает в ряду ДЭФ > ДБФ > ДЭГФ [6]. Похожие результаты были получены в работе [15], в которой грибы белой гнили *P. ostreatus* и *T. versicolor* менее эффективно деградировали ДЭФ, по сравнению с диметилфталатом и бутилбензилфталатом. Результаты анализа экстрактов КЖ грибов с ДБФ и ДЭГФ методом ТСХ приведены на рис. 9.

Показано, что у всех грибов в процессе культивирования с ДБФ и ДЭГФ менялось количественное соотношение продуктов реакции, а также их спектр. Поскольку, согласно результатам ТСХ, скорость деградации ЭФК убывала в порядке ДЭГФ > ДБФ > ДЭФ, и для ДЭФ скорость была очень низкая, а продукты не визуализировались, количественную оценку биодеструкции ЭФК с использованием метода ГХ-МС в дальнейшем проводили только для ДБФ и ДЭГФ. Результаты представлены в табл. 2.

Полученные результаты показали высокую эффективность разложения ДЭГФ (более 98%) грибами *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *A. praecox*, а ДБФ (более 96%) – *C. laeve* за 10 сут.

Несмотря на то, что в литературе описано снижение скорости биодегradации фталатов с увеличением длины алкильной цепи, а также зависимость от ее разветвленности [15, 19, 23, 32], в настоящей работе показано, что у гриба *S. ochraceum*

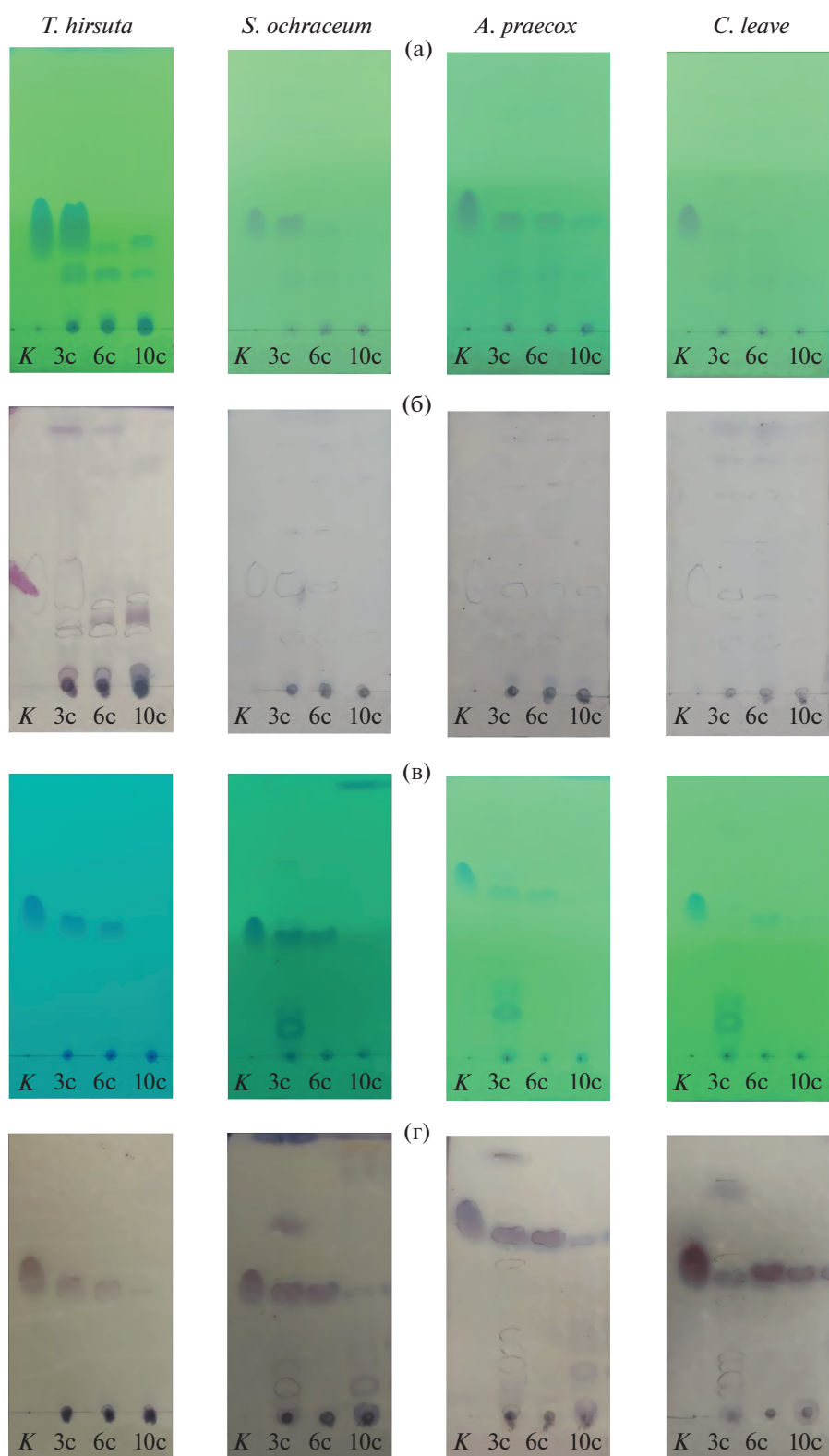


Рис. 9. ТСХ экстрактов КЖ грибов *T. hirsuta*, *S. ochraceum*, *C. leave* и *A. praecox* на 3, 6, и 10 сут культивирования на среде с ДБФ (а, б) и ДЭГФ (в, г): К- ДБФ коммерческий; а, в — визуализация в УФ-свете, б, г — проявление ванилином.

Таблица 2. Динамика биодеградации ДБФ и ДЭГ (1 г/л) грибами белой гнили

Штамм	Деградация, %					
	ДБФ			ДЭГФ		
	3 сут	6 сут	10 сут	3 сут	6 сут	10 сут
<i>T. hirsuta</i> 072	65.9 ± 2.0	78.3 ± 0.6	88.2 ± 1.2	39.2 ± 1.9	92.6 ± 0.2	99.2 ± 0.5
<i>S. ochraceum</i> 3174	0.2 ± 0.05	57.7 ± 0.3	87.3 ± 0.2	45.0 ± 0.8	96.5 ± 0.4	99.7 ± 0.3
<i>C. laeve</i> 1700	85.5 ± 1.5	94.9 ± 0.3	96.5 ± 0.5	52.3 ± 0.2	68.6 ± 2.0	88.7 ± 1.2
<i>A. praecox</i> 6205	74.8 ± 0.8	85.5 ± 0.6	86.1 ± 1.0	12.6 ± 1.2	41.4 ± 0.5	99.0 ± 0.3

скорость деградации ДЭГФ была существенно выше, чем ДБФ (табл. 2). Для остальных грибов скорость деградации ДБФ на 3 сут была выше, чем ДЭГФ, но все же к 10 сут для грибов *T. hirsuta* и *A. praecox* более высокая степень деградации была получена для ДЭГФ. Только результаты с *C. laeve* согласовались с данными литературы. При этом увеличение концентрации ДБФ в среде в небольшой степени ингибировало рост *C. laeve* (рис. 3в), в отличие от гриба *P. ostreatus*, рост которого не ингибировался повышением концентрации ДБФ в среде (до 1000 мг/л) [23].

Поскольку скорость биодеградации ДЭГФ была выше у дереворазрушающих сапротрофов, а ДБФ — у подстилочных сапротрофов (более 90% на 6 сут, табл. 2), по 1 представителю этих групп (*T. hirsuta* и *C. laeve*) было выбрано с целью определения продуктов биодеградации ЭФК. Для накопления продуктов деградации ЭФК в количествах, необходимых для их идентификации, предварительно проводили разделение экстрактов методом препаративной ТСХ, после чего элюаты анализировали методом ГХ-МС. Для анализа в этом случае использовали экстракты КЖ *C. laeve* на 3 сут для обоих субстратов, а *T. hirsuta* — на 3 сут с ДБФ и 6 сут с ДЭГФ (образцы, где продукты деградации ЭФК визуализировались методом ТСХ).

В результате ГХ-МС-анализа в контрольных образцах *C. laeve* (при отсутствии фталатов) был обнаружен более широкий спектр метаболитов (всего 24), по сравнению с контрольными образцами *T. hirsuta* (всего 13 и 19 на 3 и 6 сут соответственно), представленный в основном эфирами карбоновых кислот, а также спиртами и альдегидами (рис. 10).

Следует отметить, что на 6 сут культивирования в КЖ *T. hirsuta* расширялся спектр синтезируемых грибом спиртов и эфиров бензойной кислоты. В присутствии фталатов образование большинства характерных для грибов метаболитов прекращалось: на 3 сут в образце КЖ *C. laeve* с ДБФ и ДЭГФ было обнаружено 7 и 11 соединений соответственно, а на 3 и 6 сут в образцах *T. hirsuta* с ДБФ и ДЭГФ — 5 и 3 соединения соответствен-

но (табл. 3). Причем всего 3 соединения из контрольных образцов были идентифицированы в опытных образцах с фталатами, а именно: пентадециловый эфир акриловой кислоты, обнаруженный в контрольных образцах КЖ обоих грибов, идентифицирован в КЖ и *C. laeve* с ДЭГФ, и *T. hirsuta* с ДБФ и ДЭГФ; пентадециловый эфир пропионовой кислоты, найденный в контрольном образце *T. hirsuta*, также идентифицирован в КЖ *T. hirsuta* с ДБФ; 4-пропилбензальдегид, найденный в контрольном образце КЖ *C. laeve* — идентифицирован в КЖ *C. laeve* с обоими ЭФК. В присутствии ЭФК для *C. laeve* было характерно появление кетонов и отсутствующих в контрольных КЖ спиртов (табл. 3).

В КЖ грибов *T. hirsuta* и *C. laeve* обнаружен 2,6-дитретбутил-4-метилфенол (ионол), отсутствующий в контрольных образцах. Это соединение применяется в качестве антиоксиданта при производстве пищевых продуктов (пищевая добавка Е321), а также является исходным соединением для синтеза различных пространственно затруднённых фенолов, многие из которых обладают биологической активностью [33]. Ионол часто встречается в качестве вторичного метаболита, продуцируемого различными группами организмов, в частности грибами, однако является аутоксичным [34]. Имеющиеся на сегодняшний день данные не объясняют, почему организмы вырабатывает такой аутоксичный метаболит. Вероятно, индукция биосинтеза ионولا грибами является своеобразной защитной реакцией грибов от свободных радикалов, образующихся при ферментативном окислении в ходе деградации ЭФК. Однако, ввиду своей аутоксичности, накопление этого соединения в ходе биотрансформации ДБФ может приводить к торможению роста гриба.

Кроме того, при культивировании грибов в присутствии ДБФ и ДЭГФ в КЖ грибов был обнаружен ДЭФ, из чего можно сделать вывод, что он являлся промежуточным продуктом биотрансформации этих ЭФК обоими грибами. В работе [23] при изучении пути деградации ДБФ дереворазрушающим грибом белой гнили *P. ostreatus* не было обнаружено ДЭФ в качестве промежуточно-

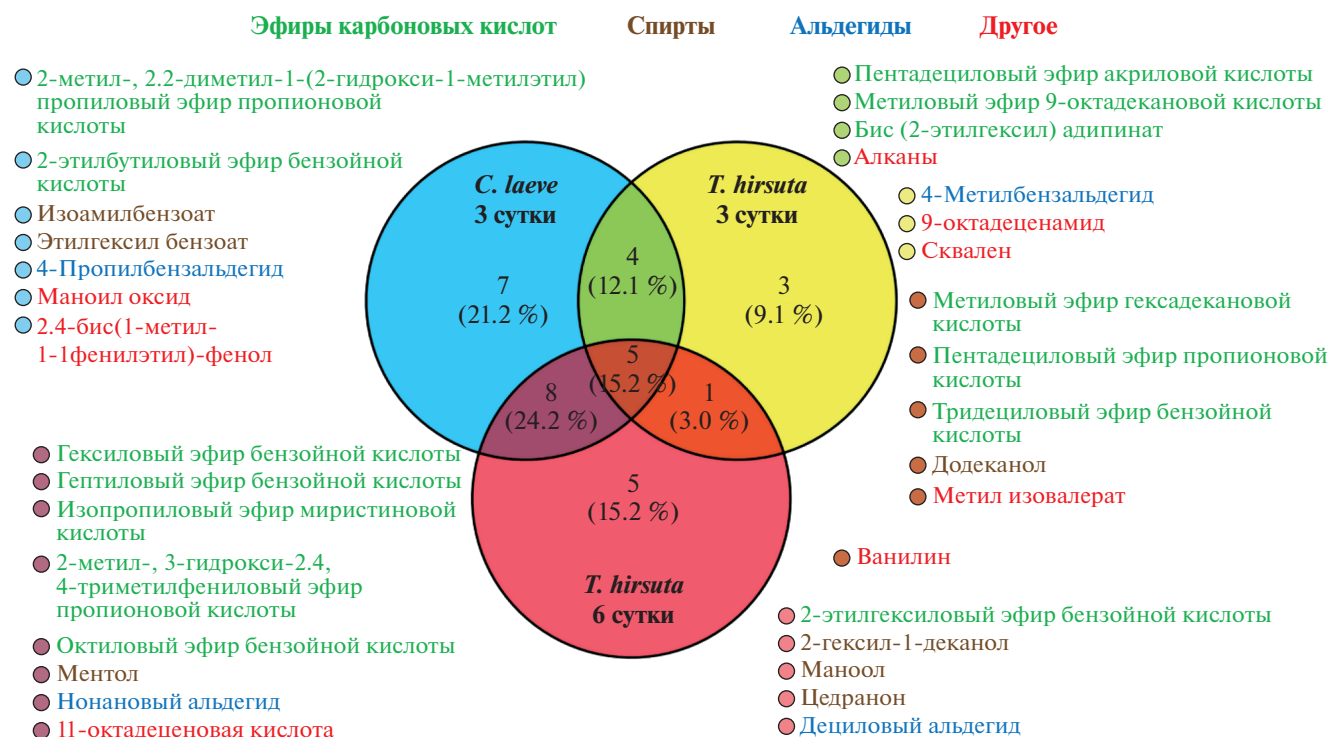


Рис. 10. Диаграмма Венна для метаболитов, обнаруженных в контрольных образцах КЖ *C. laeve* и *T. hirsuta* методом ГХ-МС.

го метаболита, однако при бактериальной трансформации этого фталата показана возможность его образования из ДБФ [32]. Вероятно, замедление роста грибных культур при выращивании на среде с ДБФ, может быть также связано с образованием в качестве промежуточного трудно деградируемого ДЭФ из-за его высокой токсичности, особенно в условиях высоких концентраций ЭФК.

В работе [35] в качестве основного метаболита при биодеструкции ДБФ бактериями *Pseudomonas* sp. и *Comatopas* sp. также был идентифицирован ДЭФ, который может быть получен путем реакции переэтерификации с участием липаз. Однако авторам, как и в настоящей работе, не удалось обнаружить такой основной метаболит деструкции ЭФК как фталевая кислота, предположительно, из-за короткого периода полураспада этого соединения.

Ранее показан возможный механизм деструкции ЭФК с помощью эстераз, приводящий к образованию 1,3-изо-бензофурандиона (ИБФ) при гидролизе сложного эфира с последующим спонтанным образованием оксомостики и дальнейшее превращение ИБФ в различные моноэфиры путем переэтерификации при наличии в среде спиртов [36]. Перечень возможных продуктов превращения ИБФ зависит от спектра синтезируемых грибами ферментов. Возможно, именно таким путем происходит образование ДЭФ при трансформа-

ции ДБФ и ДЭГФ. В КЖ гриба *C. laeve* на 3 сут ЭА преобладала над ОА. Вероятно, идентифицированные в ней соединения, могут быть продуктами реакций переэтерификации моноэфиров, например 1-гидроксициклогексил фенил кетон. Поскольку одновременно с ЭА все же фиксируется и ОА, то параллельно могут проходить свободнорадикальные реакции с образованием целого спектра разнообразных соединений (подобно 2-гидрокси-изо-бутирофенону у *C. laeve*), некоторые из которых трудно идентифицировать (вероятно, таким соединением может являться не идентифицированное соединение с RT2126, обнаруженное в КЖ *T. hirsuta*).

Таким образом, исследование показало, что грибы белой гнили являются перспективными биодеструкторами широко распространенных токсичных ЭФК, различающихся структурой и гидрофобностью. Полученные результаты подтвердили, что механизмы разрушения ЭФК различаются у грибов в зависимости от экофизиологической группы. Различия в путях деградации ЭФК грибами белой гнили могут быть связаны с секрецией уникальных ферментных комплексов, участвующих в процессах биодеструкции. Показано, что в процессе культивирования динамика ОА и ЭА *T. hirsuta* ближе к *A. praecox*, а *S. ochraceum* — к *C. laeve*. Очевидно, что присутствие ЭФК изменяло метаболический профиль гриба. Вероятно, вторичные

Таблица 3. Метаболиты, идентифицированные в КЖ *C. leave* и *T. hirsuta* на средах с ЭФК методом ГХ-МС

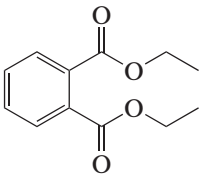
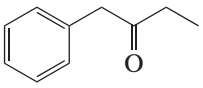
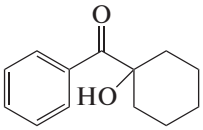
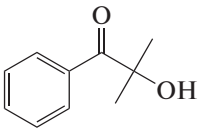
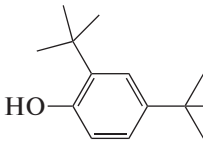
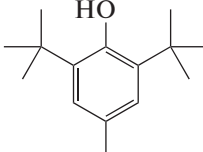
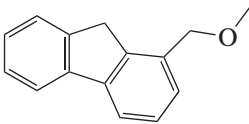
Метаболит	<i>C. leave</i> + + ДБФ (3 сут)	<i>C. leave</i> + + ДЭГФ (3 сут)	<i>T. hirsuta</i> + + ДБФ (3 сут)	<i>T. hirsuta</i> + + ДЭГФ (6 сут)
Фталаты				
Диэтилфталат (ДЭФ), $C_{12}H_{14}O_4$ 	+	+	+	+
Эфиры карбоновых кислот				
Тридецил акрилат, $C_{16}H_{30}O_2$	+	—	—	—
Спирты				
Гексадеканол, $C_{16}H_{33}OH$	—	+	—	—
Октадеканол, $C_{18}H_{38}O$	—	+	—	—
Кетоны				
Бензил этил кетон, $C_{10}H_{12}O$ 	—	+	—	—
1-Гидроксициклогексил фенил кетон, $C_{13}H_{16}O_2$ 	+	+	—	—
2-Гидрокси-изо-бутирофенон, $C_{10}H_{12}O_2$ 	+	+	—	—
Фенолы				
2,4-Ди-трет-бутилфенол, $C_{14}H_{22}O$ 	+	—	—	—
2,6-Дитретбутил-4-метилфенол (ионол), $C_{15}H_{24}O$ 	+	—	+	+
Другие				
Сквален	—	+	—	—

Таблица 3. Окончание

Метаболит	<i>C. leave</i> + + ДБФ (3 сут)	<i>C. leave</i> + + ДЭГФ (3 сут)	<i>T. hirsuta</i> + + ДБФ (3 сут)	<i>T. hirsuta</i> + + ДЭГФ (6 сут)
1-метокси-метилфлуорен, C ₁₅ H ₁₄ O 	—	+	—	—
Неидентифицированное соединение с RT2126	—	—	+	—

ксилотрофы могут быть ближе по своему метаболизму к гумусовым и подстилочным грибам, в отличие от первичных ксилотрофов.

Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований, направленных на установление механизмов биоразложения ЭФК различными грибами, а также при отборе конкретных штаммов базидиальных грибов для использования с целью биоремедиации загрязненных фталатами сред.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 21-14-00306.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weaver J.A., Beverly B.E.J., Keshava N., Mudipalli A., Arzuaga X., Cai C. et al. // Environ. Int. J. 2020. V. 145. № 105848. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105848>
- de Souza Machado A.A., Lau C.W., Kloas W., Bergmann J., Bachelier J.B., Faltin E., Becker R. et al. // Environ. Sci. Technol. 2019. V. 53. P. 6044–6052. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01339>
- Iqbal S., Xu J., Allen S.D., Khan S., Nadir S., Arif M.S., Yasmeen T. // Chemosphere. 2020. V. 260. № 127578. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127578>
- Wormuth M., Scheringer M., Vollenweider M., Hungerbühler K. // Risk Analysis. 2006. V. 26. № 3. P. 803–324. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2006.00770.x>
- Clark K.E., David R.M., Guinn R., Kramarz K.W., Lampi M.A., Staples C.A. // Hum. Ecol. Risk Assess. (HERA). 2011. V. 17. P. 923–965. <https://doi.org/10.1080/10807039.2011.588157>
- Шкаева И.Е., Солнцева С.А., Никулина О.С., Николаев А.И., Дулов С.А., Земляной А.В. // Toxicol. Rev. 2019. V. 159. № 6. P. 3–9.
- Toft G., Jönsson B.A.G., Lindh C.H., Jensen T.K., Hjelund N.H., Vested A., Bonde J.P. // Environ Health Perspect. 2012. V. 120. № 3: 458–463. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103552>
- Kinnear E.J.C., Miller K.Y., Tong A.Z. // Food Additives & Contaminants: Part A. 2021. P. 1–12. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1940307>
- Edwards L., McCray N.L., VanNoy B.N., Yau A., Geller R.J., Adamkiewicz G., Zota A.R. // J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41370-021-00392-8>
- Ястребова О.В., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 378–385. <https://doi.org/10.1134/S0555109919040159>
- Jin D., Baia Z., Chang D., Hoefelc D., Jin B., Wang P., Wei D., Zhuang G. // J. Hazard. Mater. 2012. V. 221–222. P. 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.010>
- He Z., Niu C., Lu Z. // J. Hazard. Mater. 2014. V. 273. P. 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.033>
- Tao Y., Li H., Gu J., Shi H., Han S., Jiao Y., et al. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 173. P. 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.055>
- Feng N., Feng Y., Liang Q., Chen X., Xiang L., Zhao H. et al. // Sci Total Environ. 2021. № 761:143208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143208>
- Hwang S., Choi H.T., Song H. // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. № 4. P. 767–772
- Aguilar-Alvarado Y., del Rosario Baez-Sanchez M., Martinez-Carrera D. C., Ahuactzin-Perez M., Cuamatzi-Mucos M., Sanchez C. // Pol. J. Environ. Stud. 2015. V. 24. № 5. P. 1897–1902. <https://doi.org/10.15244/pjoes/58808>
- Jegade D.O., Adewuyi G.O., Gbadamosi M.R., Oladoye P.O., Ogunneye A.L., Oyewola O.J. // Nigerian J. Chemical Research. 2019. V. 24. № 2. P. 77–89.
- González-Márquez A., Ahuactzin-Pérez M., Sánchez C. // Bioresources. 2015. V. 10. № 4. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.7898-7906>
- Chen Y., Zhang W., Chen J., Wang N., Chen C., Wang Y. et al. // J. Diabetes Res. 2021. Article ID 4027380. <https://doi.org/10.1155/2021/4027380>
- Suárez-Segundo J.L., Vázquez-López D., Torres-García J.L., Ahuactzin-Pérez M., Montiel-Martínez N., Tlecuítl-Beristain S., Sánchez C. // Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2013. V. 12. № 3. P. 499–504.
- Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. // Biochimie. 2017. V. 142. P. 183–190.
- Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Shakhova N.V., Savinova O.S., Vasina D.V., Tyazhelova T.V. et al. // Micro-

- organisms. 2019. V. 7. P. 527.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7110527>
23. Ahuactzin-Perez M., Tlecuitl-Beristain S., García-Davila J., Santacruz-Juarez E., Gonzalez-Perez M., Concepcion Gutierrez-Ruiz M., Sanchez C. // Fungal Biol. 2018. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.001>
24. Hwang S., Kim H., Ka J., Song H. // J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 22. № 2. P. 239–243.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1107.07050>
25. Cordoba-Sosa G., Gonzalez-Marquez A., Luis Torres J., Ahuactzin-Perez M., Diaz-Godinez G., Diaz R., Sanchez C. // Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8). Ed. II. New Delhi: ICAR-DMR, SOLAN HP& WSMBMP, 2014. P. 231–237.
26. Gao D., Wen Z. // Sci. Total Environ. 2016. V. 541. P. 986–1001.
27. Ahuactzin-Perez M., Tlecuitl-Beristain S., García-Davila J., Santacruz-Juarez E., Gonzalez-Perez M., Concepcion Gutierrez-Ruiz M., Sanchez C. // 3 Biotech. 2018. V. 8. № 42. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-1065-2>
28. Wu X., Wang Y., Liang R., Dai Q., Jin D., Chao W. // Process Biochemistry. 2011. V. 46. P. 1090–1094.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.031>
29. Chang B., Yang C., Yang C. // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 1989.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091989>
30. Tang Y., Zhang Y., Jiang L., Yang C., Rittmann B.E. // Biodegradation. 2017.
<https://doi.org/10.1007/s10532-017-9805-x>
31. Ahmadi E., Yousefzadeh S., Ansari M., Reza Ghaffari H., Azari A., Miri M., et al. // Sci. Rep. 2017. 7:41020.
<https://doi.org/10.1038/srep41020>
32. Liang D., Zhang T., Fang H.H.P., He J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 80. P. 183–198.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
33. Zarudii F.S., Gil'mutdinov G.Z., Zarudii R.F., Myshkin M.A., Gershanov F.B., Novikov T.A. // Pharm. Chem. J. 2001. V. 35. P. 162–168.
<https://doi.org/10.1023/A:1010414130628>
34. Zhao F., Wang P., Lucardi R.D., Su Z., Li S. // Toxins. 2020. V. 12. P. 35.
<https://doi.org/10.3390/toxins12010035>
35. Kumar V., Sharma N., Maitra S.S. // Biotechnol Rep (Amst). 2017. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.04.002>
36. Chatterjee S., Karlovsky P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. P. 61–73.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2570-y>

Biodestruction of Phthalic Acid Esters by White Rot Fungi

O. S. Savinova^a, A. V. Shabaev^a, O. A. Glazunova^a, S. A. Eremin^{a, b}, and T. V. Fedorova^{a, *}

^a Bach Institute of Biochemistry, Biotechnology Research Center of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^b Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

The ability of white rot fungi from different ecophysiological groups (*Trametes hirsuta*, primary wood-destroying saprotroph; *Steccherinum ochraceum*, secondary wood-destroying saprotroph; *Crucibulum laeve*, litter saprotroph; and *Agrocybe praecox*, humus saprotroph) to biodegrade phthalic acid esters (PAE) was studied. It has been shown that diethylhexyl phthalate (DEHP) with longer and branched hydrocarbon chains is more rapidly biodegraded by wood-destroying saprotrophs such as *T. hirsuta* and *S. ochraceum*, with an efficiency of more than 99%. At the same time, DEHP can be used by fungi as a source of nutrition for growth and development. Dibutyl phthalate (DBP), with shorter hydrocarbon units and less hydrophobic, is most efficiently transformed by the litter saprotroph *C. laeve* (up to 96.5%). The most toxic for all fungi is a lower molecular weight PAE – diethyl phthalate (DEP). *T. hirsuta* showed the greatest resistance to elevated DEP concentrations in the medium. It has been shown that fungi destroy PAE with the formation of various metabolites, depending on the composition of the multienzyme complex of the fungus. Among the secondary metabolites, ionol was found, an antioxidant secreted by fungi when PAE is added to the medium.

Keywords: phthalic acid esters, degradation, biodestruction, basidiomycetes, white rot fungi