

УДК 532.122.2:528.282

БИОДЕГРАДАЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ АСКОМИЦЕТАМИ *Microdochium nivale*[§]

© 2025 г. Е. П. Ветчинкина^{1,*}, В. Ю. Горшков²¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ Саратовский научный центр РАН
410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13, Россия²Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН
420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31, Россия

*E-mail: elenavetrus@yandex.ru

Установлена способность природных изолятов фитопатогенного микромицета *Microdochium nivale* (Ascomycota), вызывающего снежную плесень у сельскохозяйственных растений, к биодegradации красителей антрахинонового, антрацено-подобного и диамино-трифенилметанового типа при культивировании в погруженной культуре. Степень биодegradации зависела от типа красителя и штаммовой принадлежности грибной культуры, наибольшую способность к биодegradации наблюдали в отношении малахитового зеленого, обесцвечивание красителя составляло до 65%. Нейтральный красный обесцвечивался под действием ферментов исследованных аскомицетов на 28–40%, ремазол бриллиантовый синий – максимум на 26%. Наиболее интенсивная биодegradация красителей диамино-трифенилметанового и антрацено-подобного типа отмечена в первые 4 сут после внесения красителей в среду выращивания (8-суточные культуры *M. nivale*). Обесцвечивание красителя антрахинонового ряда проходило постепенно с 1-х по 28-е сут культивирования. Корреляционная зависимость между динамикой биодegradации красителей штаммами *M. nivale* и активностью ферментов лигнинолитического комплекса данного аскомицета указывала на ключевую роль в процессе внеклеточных лигнин- и Mn-пероксидаз. Учитывая повсеместное распространение грибов из отдела Ascomycota, высокую активность фенолоксиляющих ферментов и их потенциал в разложении широкого спектра ароматических соединений, микромицеты могут стать активными объектами в промышленной биоконверсии лигноцеллюлозы, лакокрасочной и текстильной промышленности, а также применяться для биоремедиации окружающей среды.

Ключевые слова: *Microdochium nivale* (Ascomycota), фитопатогенные грибы, синтетические красители, биодegradация поллютантов, ферменты лигнинолитического комплекса.

DOI: 10.31857/S0002188125020115, **EDN:** VAOYTA

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к лигнинолитическим грибам обусловлен не только их способностью к разложению и минерализации лигнина, но и способностью к дegradации широкого спектра устойчивых ароматических соединений с химической структурой, подобной структурам веществ, образующихся в процессе биосинтеза или дegradации лигнина. Например, синтетических красителей – опасных поллютантов, попадающих в окружающую среду из стоков лакокрасочной и текстильной промышленности. Обнаружено, что лигнинолитические грибы обесцвечивают, разрушая хромофорную часть молекулы, и минерализуют целый ряд природных и синтетических красителей,

относящихся к различным химическим группам, снижая токсичность красителей в процессе дegradации [1]. Хорошо изучена способность к биодegradации различных поллютантов у грибов “белой гнили” – ксилотрофных Basidiomycota, обладающих мощной ферментной системой с широкой субстратной специфичностью [2, 3]. В состав лигнинолитического ферментного комплекса базидиальных грибов в качестве основных входят катализирующие дegradацию лигнина оксидоредуктазы: лигнин-пероксидазы (лигниназы, EC1.11.1.14), Mn-зависимые пероксидазы (Mn-пероксидазы, EC1.11.1.13) и полифенолоксидазы (лакказы, EC1.10.3.2 и тирозиназы, EC1.14.18.1). Все лигнинолитические базидиомицеты способны продуцировать в той или иной мере данные ферменты, принимающие участие в дegradации различной ароматики, гораздо менее изучена эта способность у аскомицетных грибов.

[§] Работа выполнена при поддержке научно-исследовательской темы ИБФРМ РАН, № гос. регистрации 1022040700963-8.

Исследования последних лет позволяют предположить у аскомицетных грибов в этом плане значительный потенциал. Поэтому актуальной проблемой является поиск микромицетных грибов из отдела Ascomycota, вызывающих мягкую гниль древесины, с высоким уровнем лигнинолитической активности для расширения диапазона организмов с потенциальным промышленным применением. Например, изучение аскомицетного гриба *Paraconiothyrium variable*, часто выделяемого с листьев, стволов, ветвей разных растений с некрозом древесины, показало, что он продуцирует комплекс внеклеточных лигнинолитических ферментов (лакказы, Mn-пероксидазы, лигнинпероксидазы). Исследователи характеризуют аскомицет *P. variable* как эффективный деструктор древесины, с высокой способностью к разложению модельных соединений лигнина, гваякола, полимерных красителей анилина синего и фенолового красного, производных антрацена при твердофазном культивировании [4]. Способность к биодegradации щелочного лигнина была обнаружена у 2-х потенциальных лигнинолитических грибов-аскомицетов *Aspergillus flavus* и *Emericella nidulans*, выделенных из почвы. Во время разложения щелочного лигнина наблюдали активность Mn-пероксидазы, лигнинпероксидазы и лакказы [5]. При скрининговом исследовании 16-ти видов микроскопических грибов, изолированных из почвы, компоста и гнилой древесины, было выявлено более 50-ти штаммов аскомицетных грибов, способных к синтезу внеклеточных фенолоксиляющих ферментов, в том числе лигнинпероксидаз, способных к биодegradации постиндустриального лигнина и красителя ализаринового синего [6]. При твердофазном культивировании из 6-ти протестированных красителей была отмечена способность аскомицетов *Chaetomium* и *Epicoccum* обесцвечивать только Reactive Black, для штаммов *Alternaria* данная способность не подтвердилась [7]. При изучении способности к разложению лигноцеллюлозы и секреции внеклеточных оксидоредуктаз микромицетами *Xylaria polymorpha* и *Xylaria hypoxylon* при колонизации твердой древесины бука было показано, что лакказа была единственной оксидоредуктазой, секретируемой данными грибами, и отмечена неспособность данных аскомицетов к продукции пероксидаз (лигнинпероксидазы и Mn-пероксидазы) [8]. Также, при изучении процессов разложения фармацевтических соединений, была установлена способность аскомицетных грибов *Neopestlosiopsis* sp., принадлежащих к отряду *Xylariales* (одному из крупнейших представителей Ascomycota), к делигнификации древесных и недревесных лигноцеллюлозных биомасс с помощью внеклеточных лигноцеллюлолитических ферментов. Авторы показали взаимосвязь активности фермента лакказы от присутствия в среде разных типов лигноцеллюлозных субстратов. Однако утверждали, что ферментов лигнинпероксидаз и Mn-пероксидаз не было

обнаружено [9]. Исключение составила работа, в которой представлены данные об обнаружении пероксидазы (DyP-пероксидазы) у ксилариевого аскомицета *Xylaria grammica*: в ней, упоминали о предположительной способности к биодegradации лигнина и обесцвечиванию красителей у данных представителей Ascomycota [10]. Также следует иметь в виду наше предыдущее исследование вирулентности фитопатогенных штаммов *M. nivale*, где была установлена способность данных аскомицетов к синтезу комплекса высокоактивных фенолоксиляющих ферментов (лигнинпероксидаз, Mn-пероксидаз, лакказы и тирозиназы) и к биодegradации лигнина [11].

Таким образом, на сегодняшний день известны только несколько работ, посвященных исследованию ферментов лигнинолитического комплекса у ксилариевых аскомицетов, к которым относится объект настоящего исследования — фитопатогенный гриб *M. nivale*, вызывающий снежную плесень у сельскохозяйственных растений. Авторы показали способность к разложению лигноцеллюлозы аскомицетами мягкой гнили, однако способность у *Xylariaceae* к биодegradации синтетических красителей, которые являются опасными поллютантами окружающей среды, не была исследована. Также в некоторых работах показано, что лакказа является единственной оксидоредуктазой, а лигнинпероксидаз и Mn-пероксидаз обнаружено не было, кроме того не установлена роль ферментов лигнинолитического комплекса, секретируемых ксилариевыми аскомицетами в процессе биодegradации ксенобиотиков.

Цель работы — определение лигнинолитического потенциала ряда штаммов *Microdochium nivale* (Ascomycota) и оценка их способности к биодegradации синтетических красителей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования взяты природные изоляты фитопатогенного гриба *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels and I.C. Hallett (Ascomycota), вызывающего снежную плесень сельскохозяйственных культур, которые были собраны на поле Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, расположенного в Лесостепной зоне Поволжья, Лаишевский р-н Республики Татарстан, Россия. На поле выращивали озимую рожь (*Secale cereale* L.) сорта Огонек, имеющую умеренную восприимчивость к снежной плесени, при едином агрономическом приеме (удобрения, гербициды и т.п.) для производства озимой ржи. Шесть изолятов *M. nivale* поддерживали на чашках со средой следующего состава (г/л): картофель — 200, сахароза — 30 и агар-агар — 20 (рН 6.2) при 4°C в коллекции высших грибов лаборатории микробиологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов ФИЦ Саратовский научный центр РАН.

Грибы выращивали методом погруженного культивирования на синтетической среде следующего состава (г/л): D-глюкоза — 3, L-аспарагин — 0.3, KH_2PO_4 — 2, K_2HPO_4 — 3, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 2.5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.03 (pH 6.0). Рост осуществлялся при 26°C в течение 30 сут в колбах емкостью 100 мл, содержащих 50 мл среды. Для инокуляции использовали 10-суточные культуры, выращенные на синтетической среде с агаром при 26°C (один диск $d = 5$ мм на 10 мл среды). После 4-суточного культивирования в колбы вносили синтетические красители до конечной концентрации 0.03 г/л. В работе использовали красители ремазол бриллиантовый синий (Remazol Brilliant Blue R, RBBR, Reactive Blue 19), малахитовый зеленый (Malachite Green, N,N,N',N'-тетраметил-4,4'-диаминотрифенилкарбениум хлорид) и нейтральный красный, Neutral Red (3-амино-7-диметиламино-2-метилфеназин гидрохлорид) (Sigma-Aldrich, Швеция).

Спектрофотометрические измерения проводили на планшетном фотометре BioTek (BioTek Instruments, Inc. США) в 96-луночных полистироловых плоскостонных планшетах (“МиниМед”, Россия). Для определения способности к биодegradации исследованных красителей из колб отбирали аликвоты (2 мл) через определенные промежутки времени (через 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 и 28 сут). Процесс обесцвечивания синтетических красителей контролировали по изменению (убыли) спектров поглощения при следующих длинах волн: нейтральный красный — 525 нм, ремазол бриллиантовый синий — 595 нм и малахитовый зеленый — 600 нм, и рассчитывали по формуле [12]. Контролем служила среда, не инокулированная грибами.

Активность внеклеточных ферментов лигнинолитического комплекса грибов (лигнинпероксидазы, Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы) измеряли в 1-, 4-, 8-, 12- и 16-суточных культурах 6-ти штаммов *M. nivale*, выращенных методом глубинного культивирования на синтетической среде вышеописанного состава. Культуральную жидкость грибов отделяли от мицелия центрифугированием при 12 000 g в течение 20 мин и фильтровали, супернатант использовали для определения внеклеточной ферментативной активности. Активность ферментов определяли при 18°C спектрофотометрическим методом на планшетном фотометре BioTek (BioTek Instruments, Inc. США) в 96-луночных полистироловых плоскостонных планшетах (“МиниМед”, Россия). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка.

Активность лакказы определяли по скорости окисления 0.2 мМ 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) (АБТС; (Sigma-Aldrich, Швеция) в 50 мМ Na-тарtratного буфера (pH 4.5) до устойчивого катион-радикала и измеряли по увеличению поглощения при

длине волны 436 нм ($\epsilon = 29\,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [13]. Активность тирозиназы определяли по скорости окисления 2 мМ L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА; Sigma-Aldrich, Швеция) в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7.5) до ДОФА-хинона и измеряли по увеличению поглощения при 475 нм ($\epsilon = 3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [14]. Активность Mn-пероксидазы определяли по скорости окисления 1 мМ 2,6-диметоксифенола (Acros-Organics, США) в 50 мМ Na-тарtratном буфере (pH 4.5) при длине волны 468 нм ($\epsilon = 30.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [15]. В состав реакционной смеси входил 1 мМ $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, реакцию начинали добавлением 1 мМ H_2O_2 . Активность лигнинпероксидазы определяли по скорости окисления 2 мМ вератрилового спирта (Acros-Organics, США) в 100 мМ Na-тарtratного буфера (pH 3.0) с 0.4 мМ H_2O_2 до вератральдегида [16]. Накопление вератральдегида ($\epsilon = 9.3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) измеряли при 310 нм. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда при 595 нм [17].

Микрофотографии грибных препаратов получали на световом микроскопе Leica DM6000B (Leica Microsystems, Германия) с увеличением $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$, в том числе с использованием иммерсионных масляных линз. Эксперименты по микроскопии проводили на базе центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”.

Эксперименты были проведены в пятикратной повторности в 5-ти независимых экспериментах. Статистическую обработку результатов проводили общепринятым методом при помощи ПК с использованием статистического пакета анализа данных программы Excel Microsoft Office XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе изучили способность к биодegradации синтетических красителей ряда штаммов фитопатогенного гриба *M. nivale*, определили их лигнинолитический потенциал и роль внеклеточных фенолоксиляющих ферментов, секретируемых ксилариевыми аскомицетами, в данном процессе. Чтобы проверить, действительно ли выделенные штаммы принадлежат к *Microdochium* sp. и чтобы отнести штаммы к конкретным видам, были секвенированы фрагменты из 164 п.н. областей ITS2 (внутренний транскрибируемый спейсер) для всех собранных изолятов. Анализ последовательности ITS2 подтвердил принадлежность всех штаммов к *M. nivale* [18]. Особенности и скорость роста изолятов были исследованы на чашках Петри и в колбах на картофельной среде, пивном сусле, различных минеральных средах с добавлением и без добавления растительных экстрактов. Надо отметить, что один и тот же штамм на разных средах мог расти по-разному,

разные штаммы “отдавали предпочтения” разным субстратам. Колонии на картофельно-декстрозном агаре были с обильным паутинистым воздушным мицелием в белых, бледно-оранжевых, бледно-розовых тонах. Нам удалось в лабораторных условиях получить анаморфы (конидиальные спороношения) *M. nivale*. На фотографиях световой микроскопии можно видеть гифы (рис. 1а), конидиеносцы, собранные в спородохии (рис. 1б), и четырехклеточные изогнутые серповидные конидиоспоры (рис. 1в, г).

Химические свойства различных ксенобиотиков и их доступность для биodeградации микроорганизмами зависят от размера молекулы, количества и расположения ароматических колец. На основании структур использованных красителей они могут быть разделены на 3 группы: антрахиноновые красители (ремазол бриллиантовый голубой), антрацено подобные красители, содержащие конденсированные кольца, но не структуру антрахинона (нейтральный красный) и диамино трифенилметановые красители (малахитовый зеленый). Было установлено, что все изученные в данном эксперименте штаммы аскомицета *M. nivale* метаболизировали антрахиноновые, антрацено подобные и диамино

трифенилметановые красители при культивировании в погруженной культуре (рис. 2, 3).

Степень биodeградации зависела от типа красителя и штаммовой принадлежности грибной культуры. Обесцвечивание красителя антрахинонового ряда ремазол бриллиантовый синий проходило постепенно с 1-х по 28-е сут у штаммов 1, 3, 4, 5 и 6, а для штамма 2 отмечено резкое увеличение биodeградации начиная с 4-х сут от начала эксперимента. Изменение (убыль) спектров поглощения от 1-х до 28-х сут составило от 0.07 до 0.11 ед. Доля деколоризации относительно контроля (в %) у разных штаммов составила 10–15%, для штамма 2 – 26% (с 4-х по 12-е сут – на 12% и с 16-х по 28-е сут – еще на 14%) (рис. 2, 3а). Трансформация антрацено подобного красителя нейтральный красный проходила несколько иначе: в первые 4 сут от внесения в среду культивирования красителя убыль спектров поглощения изменилась на 0.23–0.3 ед. В долевом соотношении относительно контроля это составило от 28 до 40% и в последующее время (с 4-х по 28-е сут) мало изменялось, в пределах 5%; для штамма 5 с 4-х по 20-е сут – на 10% (рис. 2, 3б). Наиболее интенсивное обесцвечивание красителей штаммами *M. nivale* наблюдали относительно

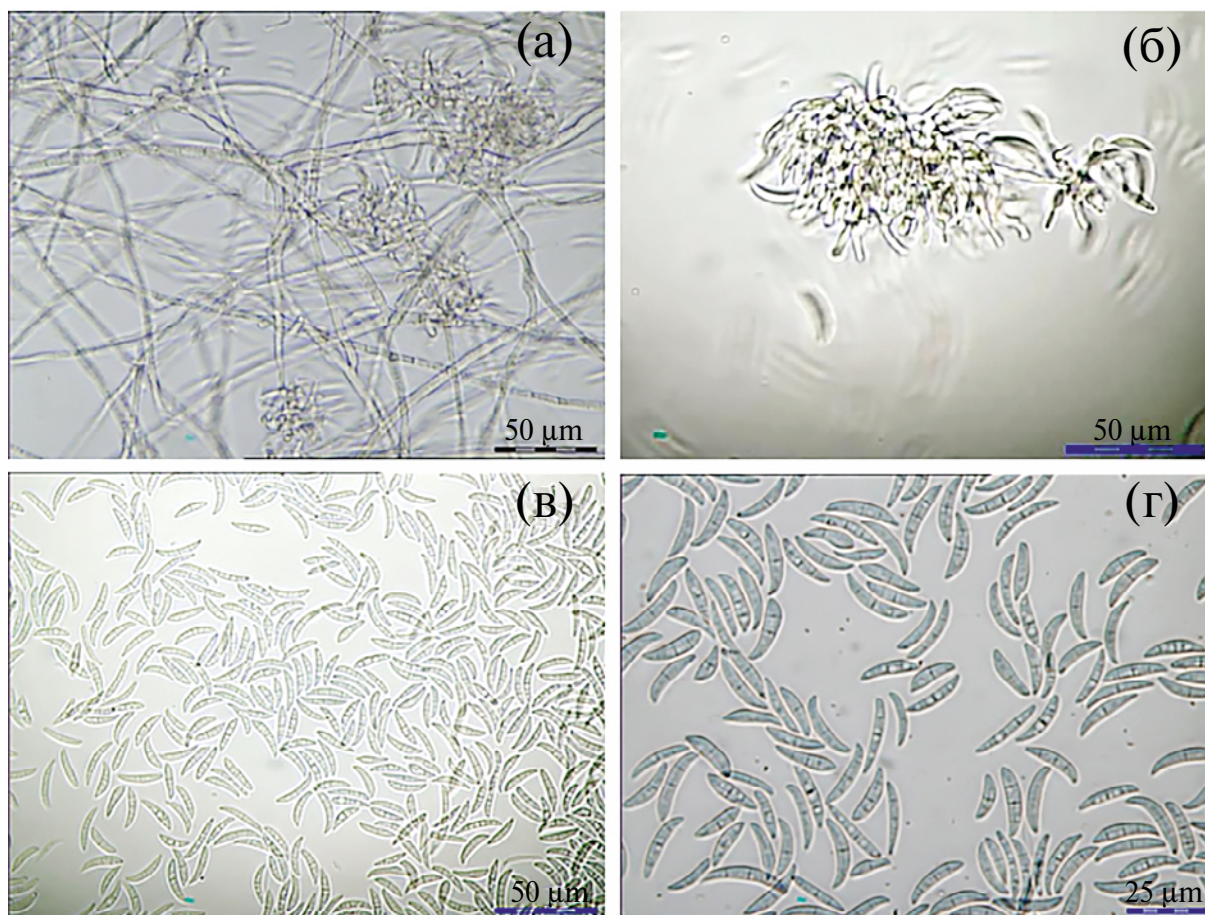


Рис. 1. Световая микроскопия септированного мицелия (а), конидиеносцев (спородохий) (б), четырёхклеточных конидиоспор (в, г) аскомицета *M. nivale*.

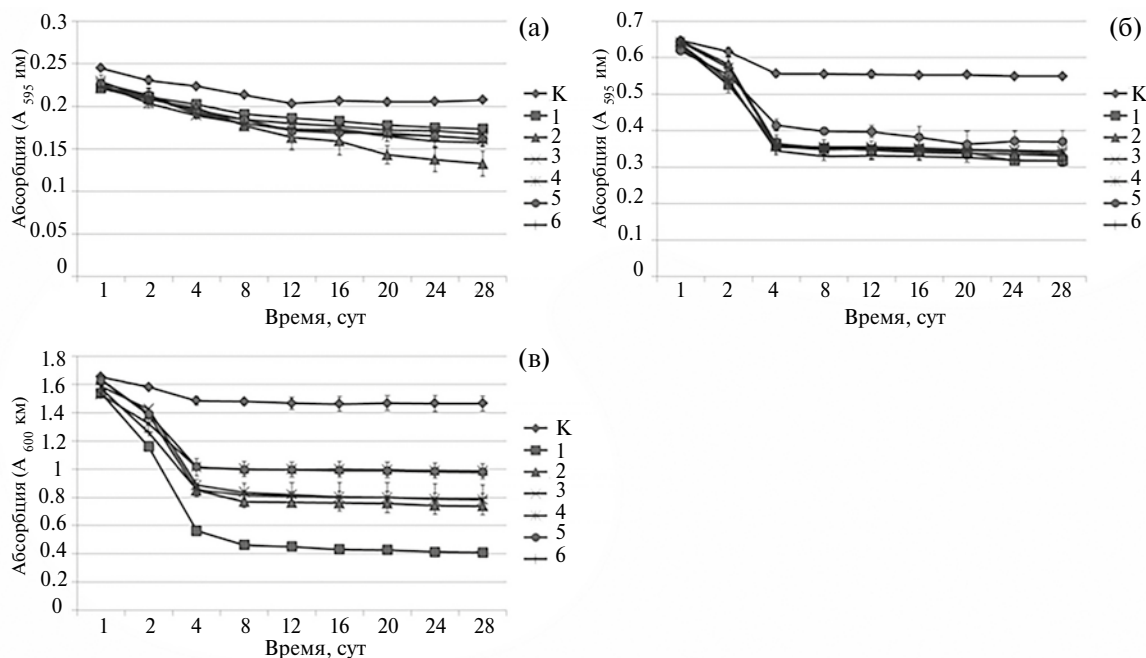


Рис. 2. Изменение (убыль) спектров поглощения синтетических красителей: антрахиноновых (ремазол бриллиантовый голубой) при 595 нм (а), антрацено подобных (нейтральный красный) при 525 нм (б) и диамино трифенилметановых (малахитовый зеленый) при 600 нм (в) при их биодеградации штаммами аскомицета *M. nivale* в погруженной культуре.

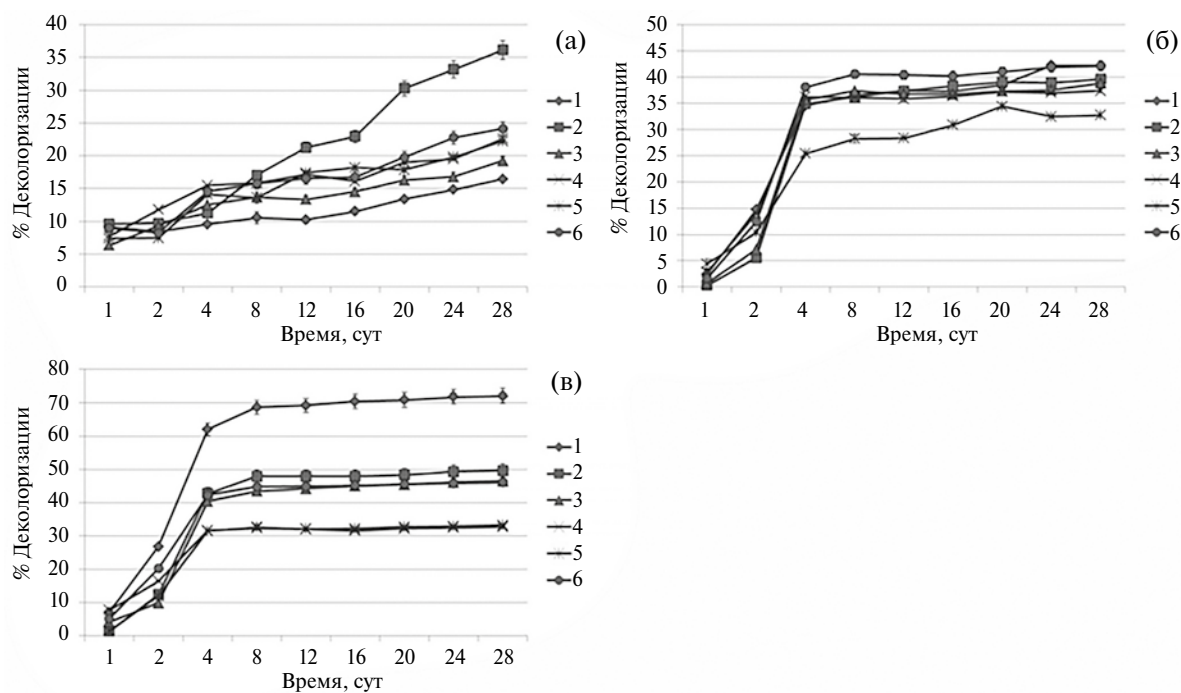


Рис. 3. Декolorизация красителей ремазола бриллиантового голубого (а), нейтрального красного (б) и малахитового зеленого (в) штаммами аскомицета *M. nivale* при культивировании в погруженной культуре на синтетической среде.

красителя диамино трифенилметанового типа малахитовый зеленый. Так же, как и в предыдущем случае, пик биодеградации красителя приходился на первые 4 сут, убыль спектров поглощения изменялась на 0.6–1.0 ед. В процентах относительно контроля обесцвечивание малахитового зеленого на 6-е сут от начала

эксперимента составило 30–45%, для штамма 1 – 65%, последующая декolorизация с 8-х по 28-е сут сохранялась в пределах 3% (рис. 2, 3в).

Таким образом, наибольшую способность к биодеградации штаммами *M. nivale* наблюдали в отношении красителя диамино трифенилметанового типа,

особенно это касалось штамма 1, который обесцвечивал малахитовый зеленый на 65%. Наименьшей трансформации грибными культурами подвергся краситель антрахинонового ряда, максимум на 26% (штамм 2). Антрахиноновые красители считают устойчивыми к биодegradации из-за наличия полициклической ароматической структуры. Нейтральный красный обесцвечивался под действием ферментов исследованных аскомицетов на 28–40%. Трансформация ремазола бриллиантового голубого при культивировании в погруженной культуре проходила постепенно и постоянно с 1-х по 28-е сут эксперимента, обесцвечивание малахитового зеленого и нейтрального красного было намного интенсивнее в первые 4 сут от момента внесения красителей в среду культивирования. В работе [6] было показано, что обесцвечивание красителей метиленового синего и метилового фиолетового значительно варьировало в зависимости от природы экстракта (сырого или очищенного), условий культивирования и микроорганизмов, однако в любом случае в настоящей работе максимальный уровень обесцвечивания базидиомицетом *Phanerochaete chrysosporium* находился в диапазоне 10–30%. Из проанализированных 610 штаммов аскомицетных грибов высокой способностью (41–70%) к обесцвечиванию алазаринного голубого обладали

микромикеты родов *Fusarium* и *Clonostachys*, многие аскомицеты, в том числе *Aspergillus* и *Trichoderma*, показывали умеренную способность к биодegradации красителя (11–40%) либо минимальную способность (1–10%). Обесцвечивание красителей штаммами *M. nivale* в нашей работе составило от 26 до 65%, что свидетельствовало о значительном потенциале данных аскомицетов к биодegradации полифенолов.

Непосредственное участие в дegradации как лигноцеллюлозных субстратов, так и различных ксенобиотиков принимают внеклеточные оксидоредуктазы, включая лигнинпероксидазу, Мп-пероксидазу и полифенолоксидазы (лакказу и тирозиназу). Поэтому мы попытались проследить корреляционную зависимость между динамикой биодegradации красителей штаммами аскомицета *M. nivale* и активностью ферментов лигнинолитического комплекса данных грибных культур в заданный временной интервал. Лигнинпероксидаза была максимально активна в первые 10 сут после начала эксперимента, у всех штаммов пик активности приходился на 1-е сут после внесения красителей (т.е. культуры были 5-суточные), далее на 4-е сут активность лигнинпероксидазы немного снижалась и на 8-е сут была в 1.5–2.0 раза меньше по сравнению с 1-ми сут культивирования с красителями (рис. 4а).

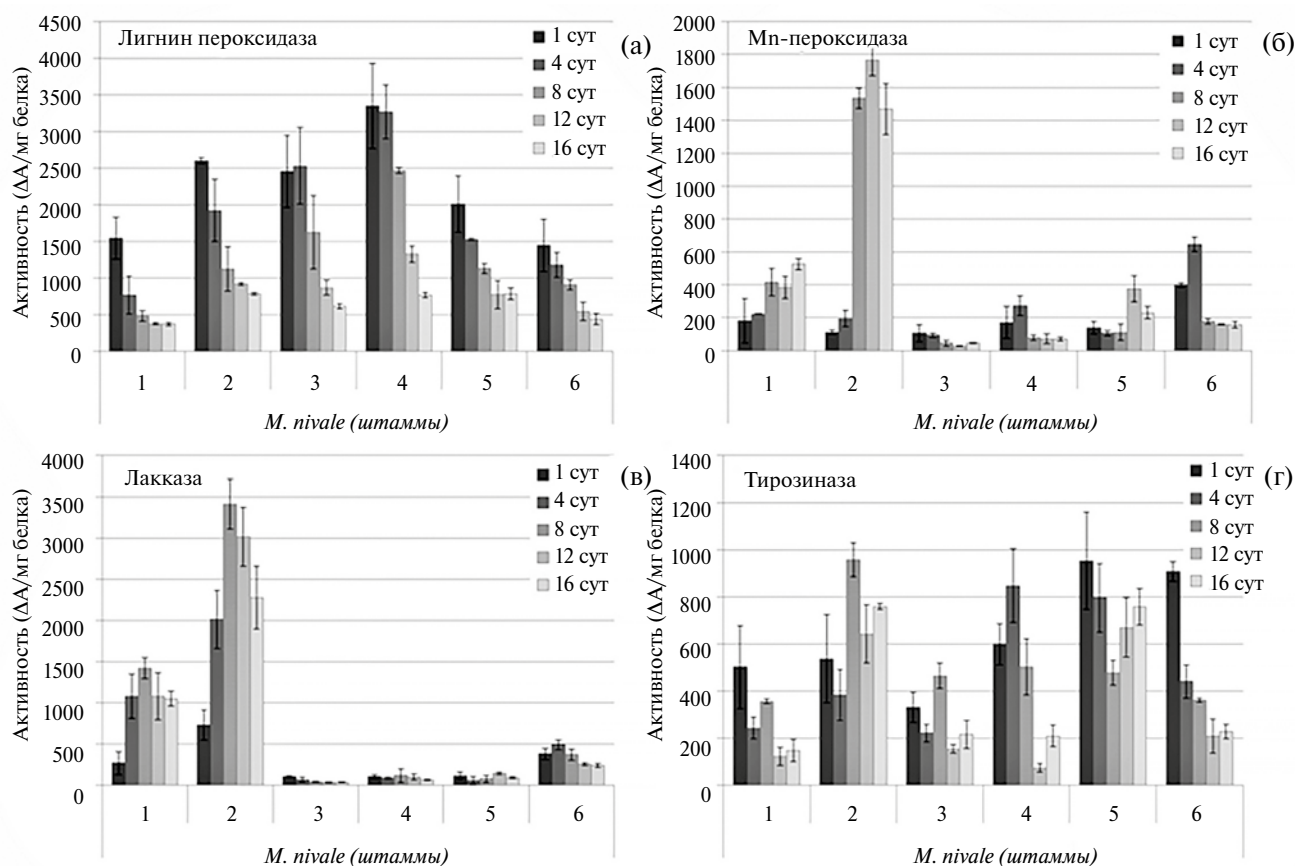


Рис. 4. Динамика удельной активности внеклеточных лигнинпероксидаз (а), Мп-пероксидаз (б), лакказ (в) и тирозиназ (г) у штаммов *M. nivale* на синтетической среде в зависимости от времени культивирования.

Далее активность данных ферментов продолжала уменьшаться, оставаясь, тем не менее, на достаточно высоком уровне. Таким образом, обнаружена прямая корреляция между динамикой активности лигнинпероксидазы и интенсивностью обесцвечивания малахитовый зеленый и нейтрального красного, активную убыль красителя наблюдали в первые 8 сут от момента их внесения в среду культивирования. Можно предположить, что лигнинпероксидазы аскомицета принимали участие в начальных этапах трансформации красителей. Как было отмечено, активность данных ферментов оставалась на достаточно высоком уровне в течение всего эксперимента и могла быть связана с постепенной трансформацией ремазола бриллиантового синего, наиболее устойчивого к биodeградации красителя. Активность Mn-пероксидазы и лакказы у многих штаммов была максимальной на 8–12-е сут культивирования, данные ферменты могут катализировать ряд этапов деградации красителей (рис. 4б, в). Было показано, что ферменты лигнин- и Mn-пероксидазы в процессе биodeградации красителей проявляли высокую активность, и среди ферментных препаратов лакказа оказалась наименее эффективной [1]. В других работах, напротив, показана способность обесцвечивать ряд синтетических красителей с помощью внеклеточных лакказ *Penicillium* sp. и *Myceliophthora* [19, 20]. Стоит отметить, что активность грибных лигнин- и Mn-пероксидаз среди протестированных 16 видов (610 штаммов) аскомицетных грибов была максимальной у штаммов *Clonostachrys* (180 и 96 ед./мг белка соответственно) [6]. Уровень удельной активности пероксидаз наших изолятов *M. nivale* составлял в среднем 1500 и 400 ед./мг белка, что значительно превосходило активность ферментов других изученных видов аскомицетов. Полифенолоксидаза (тирозиназа), как и лигнинпероксидаза, была активна в первой половине эксперимента, и деградирующая активность штаммов в этом случае также коррелировала с продукцией активных тирозиназ (рис. 4г). Было также показано, что штаммы 1, 2 и 6 лучше других обесцвечивали малахитовый зеленый и нейтральный красный, при этом активность внеклеточных ферментов, включая лакказу и Mn-пероксидазу, у них была намного больше, чем у других штаммов. Активность лакказы у штаммов 3, 4 и 5 в данных условиях эксперимента была на очень низком уровне по сравнению с пероксидазами, высокий титр которых позволил предположить, что именно внеклеточные лигнин- и Mn-пероксидазы играли ключевую роль в деградации красителей разного типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлена способность природных изолятов микромицета *M. nivale* (Ascomycota), вызывающего мягкую гниль древесины, к биodeградации антрахинонового (ремазол бриллиантовый

синий), антраценой подобного (нейтральный красный) и диамино трифенилметанового (малахитовый зеленый) красителей при культивировании в погруженной культуре. Степень биodeградации зависела от типа красителя и штаммовой принадлежности грибной культуры, наибольшую способность к биodeградации наблюдали в отношении красителя диамино трифенилметанового (малахитовый зеленый) типа, особенно это касалось штамма 1, который обесцвечивал малахитовый зеленый на 65%. Высокая корреляционная зависимость между динамикой биodeградации красителей штаммами аскомицета *M. nivale* и активностью ферментов лигнинолитического комплекса указывала на ключевую роль в деградации красителей внеклеточных лигнин- и Mn-пероксидаз. Учитывая повсеместное распространение грибов из отдела Ascomycota и их потенциал в разложении широкого спектра ароматических соединений, микроскопические грибы могут стать активными объектами в промышленной биоконверсии лигноцеллюлозы, лакокрасочной и текстильной промышленности, устойчивых продуктов фармацевтической индустрии, а также их могут применять для биоремедиации окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sosa-Martínez J.D., Balagurusamy N., Montañez J., Peralta R.A., de Fátima Peralta-Muniz-Moreira R., Bracht A. Synthetic dyes biodegradation by fungal ligninolytic enzymes: Process optimization, metabolites evaluation and toxicity assessment // J. Hazard. Mater. 2020. V. 123254. P. 1–12.
2. Brazkova M., Koleva R., Angelova G., Yemendzhiev H. Ligninolytic enzymes in Basidiomycetes and their application in xenobiotics degradation // BIO Web of Conf. 2022. V. 45. 02009. P. 1–11.
3. Arroyo G., Ruiz-Aguilar G., Lopez-Martinez L., Gonzalez-Sanchez G., Cuevas-Rodriguez G., Rodriguez-Vazquez R. Treatment of a textile effluent from dyeing with cochineal extracts using *Trametes versicolor* fungus // Sci. World J. 2011. V. 11. P. 1005–1016.
4. Gao H., Wang Y., Zhang W., Wang W., Mu Z. Isolation, identification and application in lignin degradation of an Ascomycete GHJ-4 // Afric. J. Biotechnol. 2011. V. 10. P. 4166–4174.
5. Barapatre A., Jha H. Degradation of alkali lignin by two ascomycetes and free radical scavenging activity of the products // Biocatal. Biotransformat. 2017. V. 35. P. 269–286.
6. Kornilłowicz-Kowalska T., Rybczyńska K. Screening of microscopic fungi and their enzyme activities for decolorization and biotransformation of some aromatic compounds // Inter. J. Environ. Sci. Technol. 2015. V. 12. P. 2673–2686.
7. Hartikainen E.S., Miettinen O., Hatakka A., Kähkönen M.A. Decolorization of six synthetic dyes by fungi // Amer. J. Environ. Sci. 2016. V.1 2. № 2. P. 77–85.

8. Liers C., Arnstadt T., Ullrich R., Hofrichter M. Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood // FEMS Microbiol. Ecol. 2011. V. 78. № 1. P. 91–102.
9. Kang B.R., Kim M.S., Lee T.K. Unveiling of concealed processes for the degradation of pharmaceutical compounds by *Neopestalotiopsis* sp. // Microorganisms. 2019. V. 7. № 8. P. 264.
10. Kimani V., Ullrich R., Büttner E., Herzog R., Kellner H., Jehmlich N., Hofrichter M., Liers C. First dye-decolorizing peroxidase from an ascomycetous fungus secreted by *Xylaria grammica* // Biomolecules. 2021. V. 11. № 9. P. 1391.
11. Vetchinkina E., Meshcherov A., Gorshkov V. Differential activity of the extracellular phenoloxidases in different strains of the phytopathogenic fungus *Microdochium nivale* // J. Fungi. 2022. V. 8. P. 918.
12. Lopez M.J., Guisado G., Vargas-Garcia M.C., Suarez-Estrella F., Moreno J. Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment // Enzyme Microb. Technol. 2006. V. 40. P. 42–45.
13. Slomczynski D., Nakas J.P., Tanenbaum S.W. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34 // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 907–912.
14. Pomerantz S.H., Murthy V.V. Purification and properties of tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus* // Arch. Biochem. Biophys. 1974. V. 160. P. 73–82.
15. Paszczynski R., Crawford V.B. Huynh manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification // Methods Enzymol. 1988. V. 161. P. 264–270.
16. Orth A.B., Royse D.J., Tien M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 4017–4023.
17. Bradford M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analyt. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
18. Gorshkov V., Osipova E., Ponomareva M., Ponomarev S., Gogoleva N., Petrova O., Gogoleva O., Meshcherov A., Balkin A., Vetchinkina E., Potapov K., Gogolev Y., Kozun V. Rye snow mold-associated *Microdochium nivale* strains inhabiting a common area: Variability in genetics, morphotype, extracellular enzymatic activities, and virulence // J. Fungi. 2020. V. 6. № 4. P. 335.
19. Sridevi A., Narasimha G., Suvarnalathadevi P. Production of ligninolytic enzymes from *Penicillium* Sp. and its efficiency to decolourise textile dyes // Open Biotechnol. J. 2018. V. 12. P. 112–122.
20. Claus H., Faber G., König H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. № 6. P. 672–678.

Biodegradation of Synthetic Dyes by Ascomycetes *Microdochium nivale*

E. P. Vetchinkina^{a, #}, V. Yu. Gorshkov^b

^aInstitute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, FRC Saratov Scientific Centre of the RAS, prosp. Entuziastov 13, Saratov 410049, Russia

^bKazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan 420111, Russia

[#]E-mail: elenavetrus@yandex.ru

The ability of natural isolates of the phytopathogenic micromycete *Microdochium nivale* (Ascomycota), which causes snow mold in agricultural plants, to biodegrade anthraquinone, anthracene-like and diamino triphenylmethane dyes when cultivated in submerged culture has been established. The degree of biodegradation depended on the type of dye and the strain of the mushroom culture, the greatest biodegradation ability was observed in relation to malachite green, the discoloration of the dye was up to 65%. Neutral red was discolored by the enzymes of the studied ascomycetes by 28–40%, remazole brilliant blue – by a maximum of 26%. The most intensive biodegradation of diamino triphenylmethane and anthracene-like dyes was noted in the first 4 days after the introduction of dyes into the growing medium (8-day *M. nivale* cultures). The bleaching of the anthraquinone series dye took place gradually from day 1 to day 28 of cultivation. Correlation between the dynamics of biodegradation of dyes by *M. nivale* strains and enzyme activity of the ligninolytic complex of this ascomycete indicated a key role in the process of extracellular lignin- and Mn-peroxidases. Given the ubiquity of fungi from the Ascomycota department, the high activity of phenolic oxidizing enzymes and their potential in the decomposition of a wide range of aromatic compounds, micromycetes can become active objects in the industrial bioconversion of lignocellulose, the paint and textile industries, as well as be used for environmental bioremediation.

Keywords: *Microdochium nivale* (Ascomycota), phytopathogenic fungi, synthetic dyes, biodegradation of pollutants, enzymes of the ligninolytic complex.