

Деградационная активность грибов по отношению к углеводородам нефти в условиях повышенной температуры

© 2019. Н. Н. Позднякова, д. б. н., в. н. с., С. А. Баландина, ст. лаб.,
 О. В. Турковская, д. б. н., профессор, зав. лабораторией,
 Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
 410049, Россия, г. Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13,
 e-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru, sveta.baladinp@mail.ru, turkovskaya_o@ibppm.ru

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами является одной из серьезных проблем современности. Деградационная активность грибов вносит важный вклад в процессы самоочищения природных экосистем и лежит в основе разработки экологических биотехнологий (микоремедиации). Корректный подбор грибов, способных утилизировать поллютанты и выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды, является важнейшим этапом разработки подобных технологий. Нами показана способность деградировать углеводороды нефти при повышенной температуре у 10 штаммов базидиомицетов (родов *Agaricus*, *Bjerkandera*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Stropharia*, *Trametes*), и 4 штаммов аскомицетов (родов *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Lecanicillium*). Все исследованные грибы метаболизировали нефть как на богатой среде, так и в качестве единственного источника углерода. Наиболее активными оказались базидиомицеты *P. ostreatus*, *S. commune* и *T. versicolor*. Аскомицеты, за исключением *G. candidum*, утилизировали нефть более чем на 80%. На богатой среде для грибов доступны все фракции нефти, включая полициклические ароматические углеводороды и смолы. Их убыль достигала 82–97% для *P. ostreatus* Florida, *S. commune* и *T. versicolor* DSM и 60–88% для аскомицетов *L. aphanocladii* и *F. oxysporum*. В процессе утилизации нефти как единственного источника углерода все исследованные грибы, за исключением *P. ostreatus* и *F. oxysporum*, использовали в основном парафино-нафтеновые фракции и фракцию низкомолекулярных ароматических веществ. Обнаруженная нами продукция лигнинолитических ферментов, катализирующих ключевые этапы дегградации ароматических веществ, а также продукция эмульгирующих веществ, увеличивающих биодоступность нефти, может рассматриваться как адаптация грибов к нефтяному загрязнению. Наибольшая активность лигнинолитических ферментов (лакказы и Mn-пероксидазы) была выявлена у наиболее активного деструктора ароматических веществ – *P. ostreatus* Florida. Аскомицеты, за исключением *G. candidum*, продуцировали только Mn-пероксидазы. Для дальнейших исследований и разработки технологии микоремедиации выбраны базидиомицеты *P. ostreatus* Florida, *S. commune* и *T. versicolor* DSM11269 и аскомицеты *F. oxysporum* и *L. aphanocladii*.

Ключевые слова: высшие грибы, нефть, дегградация, лигнинолитические ферменты, эмульгирующая активность, микоремедиация.

Degradative activity of fungi towards oil hydrocarbons under high temperature

© 2019. N. N. Pozdnyakova ORCID: 0000-0003-2097-3371¹
 S. A. Balandina ORCID: 0000-0002-1971-0016², O. V. Turkovskaya ORCID: 0000-0003-4501-4046³
 Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS,
 13, Prospect Entuziastov, Saratov, Russia, 410049,
 e-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru, sveta.baladinp@mail.ru, turkovskaya_o@ibppm.ru

The pollution of the environment with oil and oil products is one from the serious problems of the present time. The degradative activity of fungi contributes an important part in the self-cleaning of the natural ecosystems and is the basis of the development of environmental biotechnologies (mycoremediation). The selection of the fungi that can utilize pollutants and survive in adverse environmental conditions is the most important stage of the development of such technologies. We showed the ability to degrade of the oil hydrocarbons by 10 strains of basidiomycetes (genera *Agaricus*, *Bjerkandera*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Stropharia*, *Trametes*), and 4 strains of ascomycetes (genera *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Lecanicillium*) at high temperature. The all studied fungi metabolized oil both in the rich medium and as the sole carbon source. The most active degraders were the basidiomycetes *P. ostreatus*, *S. commune*, and *T. versicolor*. Ascomycetes, with the exception of *G. candidum*, utilized oil by more than 80%. All oil fractions, including hard PAHs and resins, are available in the rich medium. Their decrease reached 82–97% by *P. ostreatus* Florida, *S. commune*, and *T. versicolor* DSM, and was 60–88% by ascomycetes *L. aphanocladii* and *F. oxysporum*. All the fungi

studied, with the exception of *P. ostreatus* and *F. oxysporum*, used mainly alkane-naphthene fractions and the low molecular weight aromatic compounds during the utilization of oil as the sole carbon source. We found the production of ligninolytic enzymes (which catalyze the key stages of the degradation of aromatic compounds) and the emulsifying compounds (which increase the bioavailability of oil). It can be considered as adaptation of the fungi to the oil pollution. The highest activities of ligninolytic enzymes (laccase and Mn-peroxidase) were detected in *P. ostreatus* Florida which is the most active degrader of the aromatic compounds. Ascomycetes, with the exception of *G. candidum*, produced only Mn-peroxidase. Basidiomycetes *P. ostreatus* Florida, *S. commune*, *T. versicolor* DSM11269 and ascomycetes *F. oxysporum* and *L. aphanocladii* were selected for the further studies and the development of the mycoremediation technologies.

Keywords: fungi, oil, degradation, ligninolytic enzymes, emulsifying activity, mycoremediation.

Ежегодное попадание в окружающую среду огромных количеств нефти в процессе её добычи и в результате техногенных аварий стало одной из самых важных проблем современности. Утечка нефти в почву повреждает обитающую там биоту, включая микроорганизмы и растения. Вместе с тем способность деградировать и даже минерализовать нефтяные углеводороды широко распространена у представителей естественного микробного сообщества. Эта способность вносит важный вклад в процессы самоочищения природных экосистем и лежит в основе разработки экологических биотехнологий [1].

Бактериальная деградация нефти хорошо исследована, на эту тему опубликовано много обзоров [1, 2]. Грибы являются ещё одной группой организмов, вносящих серьёзный вклад в процессы самоочищения природы [3]. Рост распространением гиф позволяет им проникать в почвенные поры и расти, пока есть доступные источники питания. По сравнению с бактериями, грибы более устойчивы к высоким концентрациям токсинов, изменениям pH и температуры [3, 4]. Грибы продуцируют широкий спектр биологически активных веществ, среди которых для биоремедиации наиболее важны внеклеточные ферменты [4].

Несмотря на то, что деградативные свойства высших грибов хорошо известны [3, 4], основные исследования деградации углеводородов нефти проводятся с аскомицетами [5], тогда как сведений о способности базидиомицетов метаболизировать и минерализовать нефть немного [6, 7].

В последние годы широко обсуждается возможность использования грибов для биоремедиации (микоремедиации) [3, 4]. Перспективными кандидатами для разработки технологий микоремедиации являются лигнинолитические грибы: дерево- и почвообитающие базидиомицеты, а также некоторые виды аскомицетов [8]. Кроме лигнина, эти грибы могут метаболизировать и даже минерализовать широкий спектр поллютантов в почве, включая соединения, недоступные

или малодоступные для почвенных бактерий [3–5]. Важным этапом разработки технологий микоремедиации является корректный подбор видов грибов, способных утилизировать специфические поллютанты и выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Целью представленной работы было выявление способности к деградации углеводородов нефти у ряда базидио- и аскомицетов в условиях повышенной температуры.

Объекты и методы

Основными объектами исследований являлись базидиомицеты: *Schizophyllum commune* IBPPM 541, *Pleurotus ostreatus* f. Florida IBPPM 540 из коллекции лаборатории экологической биотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН); *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372 и *Trametes versicolor* DSM 11269, полученные из Департамента микробиологии UFZ-Центра исследований окружающей среды (Лейпциг, Германия); *Trametes versicolor* MUT 3403, *Pleurotus ostreatus* MUT 2977, *Bjerkandera adusta* MUT 3398, *Agaricus bisporus* MUT 3979, полученные из Микотеки Туринского Университета (Турин, Италия); *Pleurotus ostreatus* 336 и *Pleurotus ostreatus* D1, полученные из лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН, и аскомицеты *Lecanicillium aphanocladii* Zare & W. Gams IBPPM 542 и *Fusarium oxysporum* IBPPM 543 из коллекции лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ РАН; *Geotrichum candidum* MUT 4803 и *Cladosporium herbarum* MUT 3238, полученные из микотеки Туринского университета (Турин, Италия).

Для культивирования грибов использовали богатую среду для базидиомицетов [9] в нашей модификации, следующего состава (г/л): $\text{NH}_4\text{NO}_3 - 0,724$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,0$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 1,0$, $\text{KCl} - 0,5$, дрожжевой экстракт - 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,01$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,0028$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,033$, глюкоза - 10,0, пептон - 10,0 pH среды составлял 6,0 ед. Изуче-

ние деградации нефти проводили на этой же среде или её минеральной основе (исключали дрожжевой экстракт, пептон и глюкозу), при 30 °С и 130 об./мин, нефть вносили до конечной концентрации 5 г/л. Через 14 сут содержимое колб полностью экстрагировали трижды 5 мл хлороформа. В качестве контроля использовали стерильные среды с 5 г/л нефти. Контрольные и экспериментальные варианты анализировали аналогично.

Убыль нефти и изменение её фракционного состава определяли методом адсорбционной хроматографии с последующим поляриметрическим и гравиметрическим анализом по методике, модифицированной нами ранее [10]. За 100% принимали количества отдельных фракций в контрольных вариантах.

Прирост мицелия контролировали весовым методом.

Для выявления способности грибов к продукции поверхностно-активных веществ (биоПАВ) в процессе деградации нефти, эмульгирующую активность культуральной жидкости тестировали методом Купера [11]. Культуральную жидкость смешивали с керосином в соотношении 2:3, встряхивали в течение 20 мин в мерной пробирке и оставляли на 48 часов при комнатной температуре для разделения. Эмульгирующую активность (Е48) вычисляли

как соотношение объёма эмульсии к общему объёму жидкости и выражали в процентах.

Определение активности лакказы проводили по скорости образования продукта окисления АБТС [12], Mn-пероксидазы – 2,6-диметоксифенола [13], лигнин пероксидазы – вератрилового спирта [14]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта окисления в минуту и выражали в условных единицах – мкмоль/мин/мл препарата (ед./мл).

Все варианты описанных экспериментов и анализов имели не менее, чем трёхкратную повторяемость. Каждый эксперимент повторяли не менее трёх раз. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью Microsoft Excel 2003 и Origin 7.

Результаты и обсуждение

Из данных, представленных в таблицах 1 и 2, видно, что все грибы утилизируют нефть как в присутствии косубстратов (на богатой среде для базидиомицетов), так и в качестве единственного источника углерода и энергии (на солевой основе этой же среды).

На богатой среде деревообитающие базидиомицеты деградировали нефть на 62–98%,

Таблица 1 / Table 1
Деградация нефти на богатой среде для базидиомицетов при 30 °С
Oil degradation in basidiomycetes rich medium at 30 °C

Гриб / Fungus	Убыль, % / Disappearance, %					
	парафины alkanes	нафты naphthenes	моно-/би- ароматика LWH	ПАУ PAHs	смолы tars	Σ фракций Σ fractions
Базидиомицеты / Basidiomycetes						
<i>A. bisporus</i>	27,1±0,8	90,0±5,7	50,1±2,9	12,0±3,6	27,4±4,0	32,9±3,6
<i>B. adusta</i>	64,1±7,8	93,6±5,7	44,9±11,2	45,3±4,6	52,1±2,9	64,1±6,6
<i>P. ostreatus</i> D1	83,0±8,1	62,7±4,1	67,0±3,5	37,2±3,7	40,4±2,0	73,4±4,4
<i>P. ostreatus</i> Florida	97,7±9,8	90,1±3,2	93,2±2,0	90,0±1,8	82,7±4,6	94,8±1,3
<i>P. ostreatus</i> MUT	87,1±3,7	92,9±3,9	72,8±5,0	79,2±6,1	62,5±3,9	84,3±3,3
<i>P. ostreatus</i> 336	88,3±7,4	97,9±7,0	89,6±6,8	84,1±4,8	0,8±0,1	78,0±2,3
<i>S. commune</i>	96,1±4,5	97,2±2,7	66,0±6,0	92,9±7,0	83,8±8,1	94,0±4,9
<i>S. rugosoannulata</i>	64,6±4,6	11,2±5,2	27,5±4,1	21,1±7,3	54,8±5,5	48,9±3,0
<i>T. versicolor</i> DSM	98,9±1,1	98,2±1,2	91,6±3,7	97,1±1,7	96,3±3,1	98,3±3,0
<i>T. versicolor</i> MUT	65,5±3,8	85,1±5,1	6,0±2,0	40,9±9,3	49,3±7,1	62,6±3,6
Аскомицеты / Ascomycetes						
<i>C. herbarum</i>	88,4±4,4	60,9±5,0	35,5±5,0	40,1±1,9	70,0±2,2	82,0±4,8
<i>F. oxysporum</i>	81,5±4,8	53,4±4,6	83,2±3,9	63,5±5,3	75,5±9,1	83,6±4,2
<i>G. candidum</i>	48,1±8,0	83,7±7,8	10,6±4,8	27,1±3,0	25,1±5,1	46,9±5,2
<i>L. aphanocladii</i>	81,2±7,9	100,0±0,1	90,9±0,8	88,0±10,0	80,0±7,0	83,6±7,0

Примечание: «±» – стандартное отклонение.

Note: “±” – standard deviation. LWH – low molecular weight hydrocarbons.

Таблица 2 / Table 2

Использование нефти как единственного источника углерода при 30 °C
The use of oil as sole source of carbon at 30 °C

Гриб / Fungus	Убыль, % / Disappearance, %					
	парафины alkanes	нафтены naphthenes	моно-/би- ароматика LWH	ПАУ PAHs	смолы tars	Σ фракций Σ fractions
Базидиомицеты / Basidiomycetes						
<i>A. bisporus</i>	7,1±2,1	32,0±4,9	43,0±3,3	0,8±0,2	21,4±5,7	16,8±5,0
<i>B. adusta</i>	15,1±2,8	76,9±3,0	1,2±0,9	1,8±0,8	28,5±0,6	18,7±1,3
<i>P. ostreatus</i> D1	68,5±5,5	42,4±0,4	28,0±1,8	25,9±3,8	44,1±5,3	60,0±6,3
<i>P. ostreatus</i> Florida	75,1±5,2	60,5±4,0	48,8±0,8	52,9±1,6	50,0±3,2	72,1±2,7
<i>P. ostreatus</i> MUT	56,5±0,7	79,3±5,7	13,2±4,0	52,0±7,6	28,0±5,5	54,5±5,2
<i>P. ostreatus</i> 336	63,0±4,2	83,4±7,0	28,4±8,1	48,9±5,3	35,8±3,0	60,4±8,2
<i>S. commune</i>	29,5±2,8	63,6±2,9	28,0±4,0	27,1±1,9	0,6±0,3	26,9±1,3
<i>S. rugosoannulata</i>	15,9±3,2	28,6±0,6	30,1±1,1	1,2±0,9	10,3±3,9	18,1±0,8
<i>T. versicolor</i> DSM	36,8±1,6	31,9±1,6	67,2±3,9	18,9±0,5	22,4±2,0	26,7±2,2
<i>T. versicolor</i> MUT	25,2±2,8	75,0±5,0	4,8±2,0	5,9±1,8	17,0±3,2	26,6±4,0
Аскомицеты / Ascomycetes						
<i>C. herbarum</i>	20,1±1,1	21,1±3,6	18,7±0,8	12,2±0,8	28,9±2,3	24,7±1,5
<i>F. oxysporum</i>	17,3±2,7	7,5±3,3	63,5±10,1	53,7±9,6	29,0±0,8	37,8±4,1
<i>G. candidum</i>	18,4±3,9	78,5±7,3	41,6±5,0	6,0±3,0	16,2±2,8	17,7±2,8
<i>L. aphanocladii</i>	59,6±3,4	78,5±3,9	2,0±0,6	35,2±4,1	25,8±4,2	54,9±3,9

Примечание: «±» – стандартное отклонение.

Note: “±” – standard deviation. LWH – low molecular weight hydrocarbons.

тогда как почвообитающие – только на 33–49%. Среди исследованных базидиомицетов наиболее активными оказались представители видов *P. ostreatus*, *S. commune* и *T. versicolor*. Отмечены также штаммовые различия. Так, например, среди представителей вида *P. ostreatus* наиболее активным оказался *P. ostreatus* Florida, а среди *T. versicolor* – *T. versicolor* DSM (табл. 1). Представители трёх родов аскомицетов утилизировали нефть более чем на 80%. Наименее активным оказался *G. candidum*; убыль не превышала 47%.

Как уже упоминалось выше, все исследованные грибы могли использовать нефть в качестве единственного источника углерода и энергии (табл. 2). Однако в данном случае наиболее активными оказались базидиомицет *P. ostreatus* Florida и аскомицет *L. aphanocladii*.

Нефть является многокомпонентной смесью веществ, доступность которых для деградации разными организмами может значительно отличаться. Это может приводить к утилизации одних компонентов и накоплению других, таких как ПАУ, представляющих серьёзную опасность для окружающей среды.

Несмотря на то, что деградация нефти и нефтепродуктов грибами описана в литературе [6, 7], чаще всего оценивается снижение

общего содержания нефтепродуктов [6] или снижение фитотоксичности грунта после микоремедиации [15]. Исследование изменения фракционного состава нефти в процессе микоремедиации представлено только в работе [16] и наших ранних экспериментах [10]. Так, например, показано, что *P. tuberregium* эффективно метаболизировал алифатические и ароматические фракции нефти, тогда как смолы и асфальтены, наиболее устойчивые к биодegradации, затрагивались в меньшей степени [16], а интродукция в почву *P. ostreatus* D1 приводила к деградации всех фракций нефти [10].

В представленном исследовании показано, что на богатой среде для грибов были доступны все фракции нефти. При этом убыль фракций, включая труднодоступные ПАУ и смолы, достигала 82–97% для *P. ostreatus* Florida, *S. commune* и *T. versicolor* DSM. Деградация ПАУ почвообитающими базидиомицетами *A. bisporus* и *S. rugosoannulata* была невысокой (12–21%). Аскомицеты *L. aphanocladii* и *F. oxysporum* также утилизировали все фракции нефти, включая труднодоступные (табл. 1).

В процессе утилизации нефти как единственного источника углерода и энергии все исследованные грибы использовали в ос-

новном парафино-нафтеновые фракции и фракцию низкомолекулярных ароматических веществ. Дегградация ПАУ была незначительной или отсутствовала. Исключение составили представители вида *P. ostreatus* и аскомицет *F. oxysporum* (табл. 2).

Возможность использования грибами нефти в качестве единственного источника углерода и энергии подтверждена нами при подсчёте сухого веса мицелия. При этом дегградация нефти в присутствии косубстрата также приводила к увеличению сухого веса мицелия, что говорит о её использовании для роста гриба.

Известно, что в определённых условиях грибы могут продуцировать биосурфактанты [17, 18]. Ранее нами также была показана продукция эмульгирующих веществ в ответ на присутствие в среде культивирования гидрофобных поллютантов (грант РФ № 16-14-00081). В представленном исследовании нами обнаружено, что грибы продуцируют эмульгаторы в присутствии нефти не только при росте на богатой среде, но и при её утилизации в качестве единственного источника углерода и энергии (рис.). Однако в последнем случае эмульгирующая активность была почти в

40 раз ниже. По-видимому, наличие ростового субстрата является необходимым условием для продукции больших количеств биосурфактанов. Это, в свою очередь, приводит к увеличению биодоступности нефти для грибной дегградации.

Известно, что дегградацию ароматических веществ у грибов катализирует внеклеточная лигнинолитическая ферментная система [8]. Исследование продукции лигнинолитических ферментов в присутствии нефти в разных условиях культивирования при 30 °С показало, что представители деревообитающих базидиомицетов *P. ostreatus*, *S. commune*, *T. versicolor* и почвообитающий *A. bisporus* продуцируют два лигнинолитических фермента: лакказы и Mn-пероксидазу (табл. 3). При этом наибольшая активность этих ферментов была выявлена у наиболее активного деструктора ароматических веществ – *P. ostreatus* Florida. Несмотря на то, что продукция этих ферментов является характерным свойством почвообитающего базидиомицета *S. rugosoannulata* [19], в присутствии нефти исследованный нами штамм продуцировал незначительные количества лакказы. Результатом этого может быть невысокая деструктивная активность

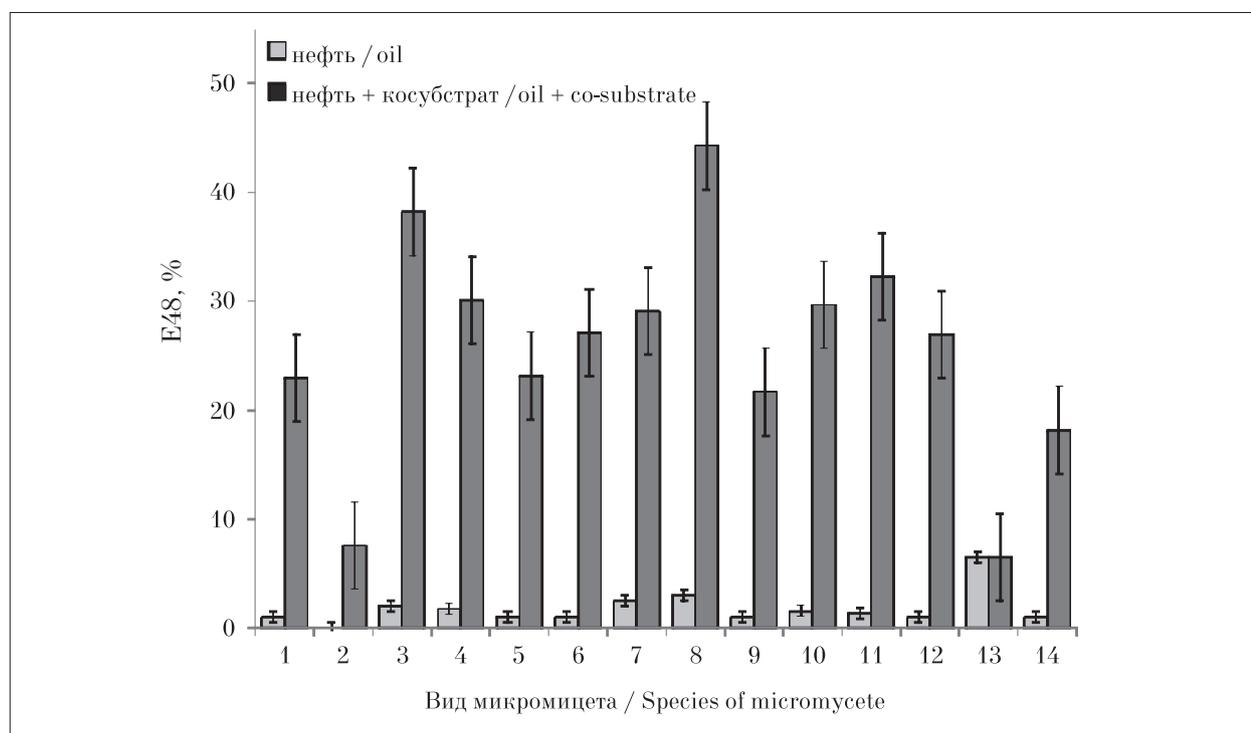


Рис. Продукция эмульгирующих веществ в процессе дегградации нефти как единственного источника углерода и энергии и в присутствии косубстрата: 1 – *A. bisporus*, 2 – *B. adusta*, 3 – *P. ostreatus* D1, 4 – *P. ostreatus* Florida, 5 – *P. ostreatus* MUT, 6 – *P. ostreatus* 336, 7 – *S. commune*, 8 – *S. rugosoannulata*, 9 – *T. versicolor* DSM, 10 – *T. versicolor* MUT, 11 – *C. herbarum*, 12 – *F. oxysporum*, 13 – *G. candidum*, 14 – *L. aphanocladii*
Fig. The production of emulsifying compounds during oil degradation as sole source of carbon and with co-substrate

Таблица 3 / Table 3

Влияние нефти на продукцию лигнинолитических ферментов
Effect of oil on the production of ligninolytic enzymes

Гриб / Fungus	Активность, ед./мл / Activity, u/mL				
	нефть как единственный источник углерода oil as sole source of carbon		нефть в присутствии косубстрата at the presence of co-substrate		
	LAC	MnP	LAC	MnP	LiP
Базидиомицеты / Basidiomycetes					
<i>A. bisporus</i>	2,1±0,1	1,6±0,1	4,8±1,2	3,8±0,8	–
<i>B. adusta</i>	–	30,0±2,7	–	54,1±4,9	43,5±4,0
<i>P. ostreatus</i> D1	12,9±3,2	15,6±0,6	25,9±1,2	140,0±3,8	–
<i>P. ostreatus</i> Florida	40,8±5,0	80,0±3,4	90,1±7,0	171,1±6,4	–
<i>P. ostreatus</i> MUT	8,9±2,3	8,8±2,1	25,8±5,1	33,6±3,7	–
<i>P. ostreatus</i> 336	13,0±2,8	13,4±2,5	54,1±9,0	127,0±11,0	–
<i>S. commune</i>	7,3±1,1	4,0±1,0	14,2±0,8	3,5±1,5	–
<i>S. rugosoannulata</i>	11,7±0,8	–	32,6±4,6	–	–
<i>T. versicolor</i> DSM	9,0±1,2	17,6±0,9	18,5±1,3	22,3±0,8	23,0±1,6
<i>T. versicolor</i> MUT	6,0±1,1	8,3±1,2	11,1±0,6	16,0±0,9	–
Аскомицеты / Ascomycetes					
<i>C. herbarum</i>	–	0,6±0,1	–	1,3±0,5	–
<i>F. oxysporum</i>	–	0,8±0,1	–	5,1±1,0	–
<i>G. candidum</i>	–	–	–	–	–
<i>L. aphanocladii</i>	–	0,6±0,2	–	6,0±0,1	–

Примечание: «–» – активности фермента не выявлено; «±» – стандартное отклонение; LAC – лакказа, MnP – Mn-пероксидаза, LiP – лигнинпероксидаза.

Note: “–” – no activity; “±” – standard deviation, LAC – laccase, MnP – Mn-peroxidase, LiP – ligninperoxidase.

этого гриба по отношению к ароматическим фракциям нефти.

Третий лигнинолитический фермент – лигнин пероксидаза был обнаружен нами только у двух грибов *T. versicolor* DSM и *B. adusta* (табл. 3) при культивировании на богатой среде. Известно, что у ряда грибов продукция лигнин пероксидазы «запускается» в ответ на лимит источников углерода или азота [8]. В нашем исследовании продукция лигнин пероксидазы также может быть результатом истощения в среде культивирования доступных источников углерода. Исследованные аскомицеты, за исключением *G. candidum*, продуцировали только пероксидазу (предположительно Mn-зависимую), активность которой при культивировании грибов на богатой среде в 2–10 раз превышала таковую при утилизации нефти как единственного источника углерода и энергии.

Заключение

Деградационный потенциал грибов играет значимую роль в деградационной и детоксикационной ксенобиотиков в естественных экосистемах и

лежит в основе технологий микоремедиации. В представленном исследовании показано, что в условиях повышенной температуры (30 °C) базидио- и аскомицеты могут не только кометаболизовать нефть, но и использовать её в качестве единственного источника углерода, когда другие источники недоступны. В присутствии косубстрата грибная дегградация затрагивала все фракции, тогда как в качестве единственного источника углерода грибы использовали в основном парафино-нафтеновые фракции и фракцию низкомолекулярных ароматических веществ. Продукция грибами лигнинолитических ферментов, катализирующих ключевые этапы дегградации ароматических веществ, и эмульгирующих веществ, увеличивающих биодоступность нефти, могут рассматриваться как их адаптация к нефтяному загрязнению. Для дальнейших исследований могут быть выбраны базидиомицеты *P. ostreatus* Florida, *S. commune* и *T. versicolor* DSM11269 и аскомицеты *F. oxysporum* и *L. aphanocladii*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-05062.

Авторы благодарят доктора Дитмара Шлоссера из UFZ-Центра исследований окружающей среды (Лейпциг, Германия), профессора Джованну Кристину Варезе из Туринского Университета (Турин, Италия), профессора, д. б. н. В.Е. Никитину из ИБФРМ РАН за предоставленные штаммы грибов.

References

1. Van Hamme J., Singh A., Ward O. Recent advances in petroleum microbiology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. V. 67. P. 503–549. doi: 10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003
2. Koshlaf E., Ball A.S. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted // *AIMS Microbiology.* 2017. V. 3. P. 25–49. doi: 10.3934/microbiol.2017.1.25
3. Harms H., Schlosser D., Wick L. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals // *Nature Reviews. Microbiology.* 2011. V. 9. P. 177–192. doi: 10.1038/nrmicro2519
4. Treu R., Falandysz J. Mycoremediation of hydrocarbons with basidiomycetes – a review // *J. Environ. Sci. Health. Part B.* 2017. V. 52. P. 148–155. doi: 10.1080/03601234.2017.1261536
5. Schlatter R., Dallinger A., Kabisch J., Duldhardt I., Schauer F. Fungal biotransformation of short-chain n-alkylcycloalkanes // *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2019. V. 103 (10). P. 4137–4151. doi: 10.1007/s00253-019-09749-4
6. Ogbo E., Tabuanu A., Ubebe R. Phytotoxicity assay of diesel fuel-spiked substrates remediated with *Pleurotus tuber-regium* using *Zea mays* // *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 2010. V. 3. P. 12–16.
7. Bhattacharya S., Das A., Prashanthi K., Palaniswamy M., Angayakanni J. Mycoremediation of benzo[a]pyrene by *Pleurotus ostreatus* in the presence of heavy metals and mediators // *3 Biotech.* 2014. V. 4. P. 205–211. doi: 10.1007/s13205-013-0148-y
8. Wong D. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009. V. 157. P. 174–209. doi: 10.1007/s12010-008-8279-z
9. Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 2495–2501.
10. Pozdnyakova N., Nikitina V., Turovskaya O. Bioremediation of oil-polluted soil with an association including the fungus *Pleurotus ostreatus* and soil microflora // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2008. V. 44. P. 60–65 (in Russian). doi: 10.1134/S0003683808010109
11. Cooper D., Goldenberg B. Surface-active agents from two *Bacillus species* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. V. 53. P. 224–229.
12. Niku-Paavola M., Karhunen E., Salola P., Raunio V. Ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Phlebia radiata* // *Biochem. J.* 1988. V. 254. P. 877–884.
13. Martinez M., Ruiz-Duenas F., Guillen F., Martinez A. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii* // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 237. P. 424–432. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0424k.x
14. Tien M., Kirk K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 2280–2284.
15. Ishikhuemhen O., Anoliefo G., Oghale O. Bioremediation of crude oil polluted soil by the white rot fungus *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2003. V. 10. P. 108–112. doi: 10.1065/espr2002.04.114
16. Ogbo E., Okhuoya J. Biodegradation of aliphatic, aromatic, resinic and asphaltic fractions of crude oil contaminated soils by *Pleurotus tuber-regium* Fr. Singer – a white rot fungus // *African J. Biotechnol.* 2008. V. 4. P. 4291–4297. doi: 10.5897/AJB08.347
17. Arun A., Eyini M. Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi // *Bioresource Technol.* 2011. V. 102. P. 8063–8070. doi: 10.1016/j.biortech.2011.05.077
18. Veignie E., Vinogradov E., Sadovskaya I., Coulon C., Rafin C. Preliminary characterizations of a carbohydrate from the concentrated culture filtrate from *Fusarium solani* and its role in benzo[a]pyrene solubilization // *Adv. Microbiol.* 2012. V. 2. P. 375–381. doi: 10.4236/aim.2012.23047
19. Steffen K., Hatakka A., Hofrichter M. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 60. P. 212–217. doi: 10.1007/s00253-002-1105-6