

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ДРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ И ИХ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯСапарбекова А.А.¹, Алтекей А.Б.^{1*}, Сильвия Б.Р.², Матчанов А.Д.³, Кантуреева Г.¹, Калдыбекова Г.¹¹Южно-Казахстанский Государственный университет им.М.Ауезова, г. Шымкент, Казахстан²Университет Вальядолид, г.Вальядолид, Испания³Институт биоорганической химии им. академика Садыкова, г.Ташкент, Узбекистан

*Автор-корреспондент: altekey@mail.ru

АБСТРАКТ

В данной работе представлена методика выделения чистых культур дроворазрушающих грибов с поверхности разлагающейся древесины, собранной в дендропарке им. Асанбая Аскарлова (г. Шымкент, Казахстан), их микроскопическое исследование и молекулярная идентификация с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования *ITS*-региона. Цель исследования. состоит в изучении видового разнообразия дроворазрушающих грибов и оценка их потенциала для биотехнологических применений. Идентифицированы пять видов: *Aspergillus spelaeus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sizovae*, *Cladosporium cladosporioides* и *Alternaria sp.* Выделение проводилось методами обогащающих культур, микроскопирование - с окраской метиленовым синим, идентификация - путём ПЦР и секвенирования. Применение ПЦР и секвенирования позволило точно идентифицировать виды и предложить новые подходы для мониторинга и изучения экосистемных процессов, связанных с древесными поверхностями. Лигнолитическая активность была подтверждена с использованием теста с азуром-В. Полученные данные подчеркивают высокое разнообразие грибов и их перспективы для переработки древесных отходов и биоремедиации. Результаты показали высокое разнообразие микроорганизмов дроворазрушающих грибов на древесных поверхностях, что подтверждает сложность микробиома этих экосистем.

Ключевые слова: дроворазрушающие грибы, древесина, идентификация, лигнинолитическая активность, биоремедиация

ВВЕДЕНИЕ

Лигнин, составляющий до 20–30% сухой массы древесины, представляет собой сложный ароматический полимер, обеспечивающий её структурную прочность и устойчивость к биологическому разложению. Его биодegradация играет ключевую роль в глобальном круговороте углерода, способствуя переработке органических веществ и возвращению питательных элементов в почву [1]. Этот процесс в значительной степени зависит от активности дроворазрушающих грибов, включая виды белой и коричневой гнили, которые выделяют специфические ферменты, такие как лигнинпероксидаза, манганпероксидаза и лакказа, разрушая лигнин и другие полимеры растительной клеточной стенки [2]. Эти грибы не только участвуют в естественном разложении древесины в лесных экосистемах, но и играют важную роль в поддержании биоразнообразия, создавая ниши для других организмов, таких как насекомые и бактерии.

В последние десятилетия интерес к дроворазрушающим грибам значительно вырос благодаря их потенциалу в биотехнологических приложениях. Они используются для переработки древесных отходов, производства биотоплива, биополимеров и биоремедиации загрязнённых сред, включая почву, обогащённые токсичными соединениями, такими как полициклические ароматические углеводороды [3,4]. Особенно перспективным является применение этих грибов в регионах с развитой лесной и сельскохозяйственной промышленностью, где накопление отходов представляет экологическую проблему. В контексте Казахстана и Центральной Азии, где лесные ресурсы ограничены, а сельское хозяйство активно развивается, переработка древесных и растительных остатков с помо-

щью лигнинолитических грибов может стать инновационным решением для устойчивого управления отходами и повышения эффективности биоэкономики [5].

Несмотря на значительный прогресс в изучении лигнинолитических грибов, данные о их видовом составе и функциональных характеристиках, особенно в условиях аридных и полупустынных регионов, остаются недостаточными [6]. Это связано с ограниченным количеством исследований, учитывающих местные климатические и экологические условия, которые влияют на распределение и активность грибов. Например, в дендропарках и городских насаждениях, таких как дендропарк им. Асанбая Аскарлова в Шымкенте, гниение древесины может быть вызвано как местными видами, так и интродуцированными грибами, что требует детального анализа [7]. Ограниченность информации снижает возможности их применения в биотехнологиях и биоремедиации, особенно в условиях, где традиционные методы утилизации отходов оказываются неэффективными или экологически вредными [8].

Цель исследования --- выделение и молекулярная идентификация дроворазрушающих грибов с поверхности разлагающейся древесины для оценки их видового разнообразия и потенциала в биотехнологических процессах. Научная гипотеза заключается в том, что грибы, выделенные с поверхности разлагающейся древесины, обладают лигнинолитической активностью, подтверждённой функциональными тестами, и могут быть использованы для переработки древесных отходов. Задачи:

Выделить чистые культуры грибов с поверхности разлагающейся древесины.

Провести молекулярную идентификацию с использо-

ванием ПЦР и секвенирования *ITS*-региона.

Оценить видовое разнообразие и лигнолитическую активность грибов для определения их биотехнологического потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Образцы были отобраны с поверхности гниющей древесины семи деревьев, предположительно принадлежащих видам *Ulmus laevis* (вяз гладкий), *Fraxinus excelsior* (ясень обыкновенный), *Pinus sylvestris* (сосна обыкновенная), *Acer negundo* (клён ясенелистный), *Betula pendula* (берёза повислая), *Populus alba* (тополь белый) и *Quercus robur* (дуб обыкновенный). Деревья находились в дендропарке им. Асанбая Аскарова (г. Шымкент, Казахстан) и имели видимые признаки гниения, включая поражение коры и изменение текстуры древесины.

Сбор образцов

Пробы отбирались с коры стволов и ветвей разлагающейся древесины с использованием стерильных ватных тампонов для минимизации контаминации [7]. Сбор проводился в местах гнилых образований (рис.1). Гниение затронуло камбий, наружные и внутренние слои ксилемы, а также сердцевину в зависимости от степени поражения. Образцы собирались в стерильные контейнеры и транспортировались в лабораторию в течение 4 часов при 4°C.

Культуральные методы

На следующий день после сбора проб проводился посев на твердую питательную среду Сабуро. Для этого на среду переносились образцы мазками со сваба зиг-загом и вводились в условия инкубации при температуре 25 °C в термостат.

Для получения чистых культур пересевы проводились до тех пор, пока не получили изолированные колонии грибов. Каждый пересев осуществлялся на свежую питательную среду Сабуро, что позволяло отобрать только один вид грибов и исключить возможные загрязнения [3]. Чистоту культуры определяли визуально по морфологии и микроскопированием.

Микроскопирование

Препараты готовились путём переноса биомассы грибов на предметное стекло с добавлением 0,1% раствора метиленового синего. Микроскопическое исследование проводилось с использованием микроскопа модели *Leica DM750* при увеличении 400×. Масштабный отрезок (10 мкм) добавлен к изображениям (рисунок 1).

Молекулярная идентификация

После выделения чистых культур были использованы молекулярные методы, такие как ПЦР и ДНК-секвенирование, для идентификации видов грибов.

Выделение ДНК

Культуры были перенесены из чашек Петри в 2 мл пластиковые пробирки, для последующего выделения. Для выделения ДНК использовали 1 мл 2-4 дневной культуры. Пробы инкубировали в течении ночи при минус 20°C. На следующий день проводилась гомогенизация биомассы

путем добавления в культуры 500 мкл лизирующего буфера (200мМ Трис, 25 мМ NaCl, 25 мМ ЭДТА, 0,5 % Додецилсульфат натрия) и 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл). Далее перемешивали вортексированием и инкубировали в течение 12 часов при температуре 65°C. По истечению указанного времени пробирки остужались до комнатной температуры. Последний этап очистки проводили хлороформным методом, для этого использовали 750 мкл хлороформ/изоамилового спирта (24/1), интенсивно перемешивали, затем центрифугировали при 13 000 g в течение 20 минут. Водную фазу переносили в новую пробирку. Вышеизложенная процедура повторялась с добавлением фенол/хлороформ/изоамиловым спиртом в соответствующих соотношениях (24:25:1), центрифугировали, полученную водную фазу переносили в новые пробирки. Препитировали ДНК 0,6 объёмами изопропилового спирта. Осаждали полученную молекулу ДНК центрифугированием при 13 000 g в течение 20 минут. Промыли осадок ДНК 70% этиловым спиртом два раза. Очищенный образец ДНК растворяли в 100 мкл однократного TE буфера и хранили при минус 20°C [9]. Измеряли концентрацию ДНК спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра *Thermo Scientific™ NanoDrop™* при длине волны 260 нм (Таблица 2).

Молекулярная идентификация

Проведение ПЦР

Идентификация выделенных штаммов была осуществлена с помощью метода определения прямой нуклеотидной последовательности региона ядерного рибосомного внутреннего транскрибируемого спейсера (*ITS*), с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных GeneBank [4]. Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами [10] *ITS1-5'* –GTAGGTGAACCTTGCGG-3' и *ITS4- 5'*TCCTCCGCTTATGTAGC-3' в общем объеме 25 мкл с помощью набора БиоМастер HS-Taq ПЦР (2×) согласно протокола производителя (ООО «Биолабмикс»). ПЦР смесь содержала 150 нг ДНК, 15 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 5 минут; 30 циклов: 95 °C – 20 секунд, 52°C - 30, 68°C – 3 минуты; заключительная элонгация 7 минут при 68°C, ПЦР программа была выполнена на амплификаторе *BioRad T100(BioRad)*. Результаты ПЦР амплификации приведены на Рисунке 1.

Определение нуклеотидной последовательности

Очистку ПЦР продуктов от не связавшихся праймеров проводили, ферментативным методом используя, *Exonuclease I (Fermentas)* и щелочную фосфатазу (*Fastap, Fermentas*) [11].

Реакцию секвенирования проводили с применением *BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencingKit (AppliedBiosystems)* согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе *3730xlDNAAnalyzer (AppliedBiosystems)*

Анализ нуклеотидных последовательностей

Нуклеотидные последовательности *ITS* региона идентифицируемого штамма были анализированы и объеди-

нены в общую последовательность в программном обеспечении *SeqMan* (DNASTAR). После чего были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров, фрагменты, имеющие низкий показатель качества) что позволило нам получить нуклеотидную последовательность протяженностью более 650 п.н., которые были идентифицированы в *GeneBank* по алгоритму *BLAST*. Нуклеотидные последовательности и результаты идентификации представлены в *приложении А*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе выделения чистых культур микроорганизмов были выделены шесть образцов, наименование культуры задавалось номеру дерева с которого производился обор. Предварительно неидентифицированный образец был определен как гриб белой гнили *Schizophyllum commune* [12-14].



Рисунок 1. Образцы деревьев, чистых культур и их микрофотографии.

В результате идентификации выделенных чистых грибов были обнаружены шесть культур, из которых успешно идентифицированы пять образцов. После процедуры выделения и очистки ДНК была определена их концентрация, данные приведены в таблице 2.

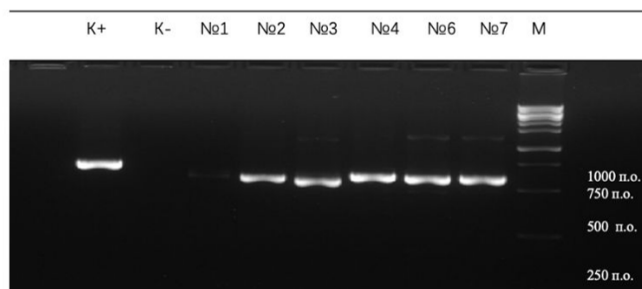
Таблица 2. Концентрация ДНК

Наименование образцов	Концентрация нг/мкл	A260/280
№1	9,05	2.15
№ 2	44,77	1.84
№ 3	36,65	1.78
№ 4	54,02	1.94
№ 6	47,63	2.01
№ 7	483,01	2.15

Как видно из Таблицы 2 у образцов при выделении ДНК концентрация варьируется от 44,77 до 483,01, значение 260/280 от 1.78 до 2.15. Образцы №4, №6 и №7 дополнительно обрабатывали РНКазой.

Аmplification ITS региона

Аmplification образцов так же прошла успешно, о чем свидетельствует рисунок 2 .



K+ – положительный контроль, K- – отрицательный контроль, образцы № 1, №2, №3, №4, №6, №7, M маркер молекулярного веса (Fermentas) (250 – 10000 п.н., от 250-1000 шаг 250 п.н.)

Рисунок 2 - Электрофореграмма ПЦР продуктов амплификации ITS региона ДНК

Как видно на Рисунке 2 у образцов были амплифицированы специфические фрагменты молекулярной массой около 650-700 п.о.

Все образцы были классифицированы с использованием молекулярных методов, таких как секвенирование рибосомной РНК [15]. Полученные результаты представлены в приложении А.

1. *Aspergillus spelaeus*

- Геномная ДНК, содержащая *ITS1*, 5.8S рРНК и *ITS2*, штамм CCF 4680.

- Частичная последовательность внутреннего транскрибируемого пространства 1 (*ITS1*), 5.8S рРНК и *ITS2*, штамм 090716NER11K9.

- Полная последовательность 5.8S рРНК и частичная последовательность гена большой субъединицы рРНК, штамм FMR 15223.

2. *Penicillium sp.*

- Изолят 6038: частичная последовательность 18S рРНК, полная последовательность *ITS1*, 5.8S рРНК и *ITS2*.

- Изолят SR59: частичная последовательность *ITS1*, полная последовательность 5.8S рРНК и *ITS2*, частичная последовательность гена большой субъединицы рРНК.

3. *Penicillium sizovae*

- Геномная ДНК содержит 18S рРНК, *ITS1*, 5.8S рРНК, *ITS2* и 28S рРНК.

4. *Aspergillus niger*

- Штамм WMH-1: частичная последовательность *ITS1*, полная последовательность 5.8S рРНК и частичная последовательность *ITS2*.

- Изолят SY5429: частичная последовательность малой субъединицы рРНК, полная последовательность *ITS1*, 5.8S рРНК и частичная последовательность *ITS2*.

5. *Cladosporium cladosporioides*

- Штамм 016: частичная последовательность малой субъединицы рРНК, полная последовательность *ITS1*, 5.8S рРНК и частичная последовательность *ITS2*.

- Другие штаммы *Cladosporium sp.* (MEND-F-1149 и MEND-F-1102) также продемонстрировали аналогичную идентификацию.

6. *Alternaria sp.*

- Штамм PPC-1-21: частичная последовательность малой субъединицы рРНК, полная последовательность *ITS1*, 5.8S рРНК и частичная последовательность большой субъединицы рРНК.

- Другие изоляты *Alternaria* также были успешно идентифицированы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленные грибные культуры, в первую очередь представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* и *Alternaria*, свидетельствуют о высоком разнообразии грибов, способствующих деградации лигнина. Полученные результаты подтверждают, что грибы вышеопределенных родов обладают ферментативной активностью, необходимой для разложения сложных полимеров, содержащихся в древесине [16,17].

Aspergillus spelaeus и *Aspergillus niger* демонстрируют высокий потенциал для биотехнологических применений благодаря их способности разлагать не только лигнин, но и углеводные компоненты древесины, такие как целлюлоза и гемицеллюлоза [18]. Это делает их перспективными кандидатами для производства биотоплива и биополимеров, что согласуется с данными о высокой эффективности *Aspergillus niger* в переработке отходов целлюлозно-бумажной промышленности [19]. Род *Penicillium*, представленный штаммом *Penicillium sizovae*, также проявил значительную метаболическую активность, что может быть связано с продуцированием лакказы и других оксидаз, способствующих биоремедиации загрязнённых сред [20]. Эти свойства подчеркивают его потенциал для очистки почв, обогащённых лигнинсодержащими остатками.

Cladosporium cladosporioides и *Alternaria sp.*, хотя и показали умеренную лигнолитическую активность, тре-

буют дальнейшего изучения для оценки их ферментативного профиля. Предварительные данные предполагают, что эти грибы могут продуцировать пероксидазы, хотя их вклад в деградацию лигнина менее выражен по сравнению с *Aspergillus* и *Penicillium* [21]. Это может быть связано с экологическими условиями дендропарка им. Асанбая Аскарова, где влажность и температура влияют на экспрессию лигнолитических генов.

Методы молекулярной идентификации, использованные в исследовании, доказали свою высокую эффективность, позволяя точно определять виды грибов на основе секвенирования ITS-региона. Это подтверждает их применимость для дальнейших геномных исследований, направленных на идентификацию генов, кодирующих лигнолитические ферменты [10]. Полученные результаты подчеркивают важность углублённого анализа ферментативных профилей выделенных культур, включая определение активности лакказы, пероксидаз и целлюлаз, что может способствовать разработке устойчивых методов переработки древесных материалов и биоремедиации.

Таким образом, наши данные подтверждают ключевую роль дроворазрушающих грибов в экосистемах и их потенциал для экологически чистых технологий. Потенциал *Aspergillus niger*, *Aspergillus spelaeus* и *Penicillium sizovae* в производстве биопродуктов, таких как этанол и фенольные соединения, уже подтверждён в литературе [22], что открывает возможности для их коммерческого применения. Дальнейшие исследования должны быть направлены на оптимизацию условий культивирования, включая pH и доступность кислорода, а также на изучение синергетического действия этих грибов в консорциумах для повышения эффективности деградации лигнина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате нашего исследования были идентифицированы пять культур грибов, обладающих способностями к деградации лигнина, выделенных с поверхности разлагающейся древесины. Основными выявленными родами стали *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* и *Alternaria*, что подтверждает их значимость в экосистемах и потенциал для применения в биотехнологии. Использование молекулярных методов идентификации позволило точно определить виды и их генетические характеристики, что открывает новые возможности для дальнейших исследований.

Полученные результаты подчеркивают важность грибов в процессах разложения древесины и их роль в круговороте углерода. Дальнейшие исследования, направленные на изучение ферментативной активности этих грибов и их применения в промышленных процессах, могут способствовать разработке устойчивых технологий для переработки древесных отходов и получения ценных биопродуктов. Таким образом, наше исследование не только расширяет понимание роли грибов в экосистемах, но и предлагает практические пути их использования в экологически чистых технологиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kirk TK, Farrell RL. Enzymatic "combustion":

the microbial degradation of lignin // *Annu Rev Microbiol.* – 1987. – Т. 41. – С. 465–505. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002341

2. Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, et al. Biodegradation of lignin by white rot fungi // *Fungal Genet Biol.* – 1999. – Т. 27. – С. 175–85. doi:10.1006/fgbi.1999.1150

3. Cui T, Yuan B, Guo H, et al. Enhanced lignin biodegradation by consortium of white rot fungi: microbial synergistic effects and product mapping // *Biotechnol Biofuels.* – 2021. – Т. 14. – С.162. doi:10.1186/s13068-021-02011-y

4. Kamimura N, Takahashi K, Mori K, et al. Advances in microbial lignin degradation and its applications // *Curr Opin Biotechnol.* – 2019. – Т.56. – С. 179–86. doi:10.1016/j.copbio.2018.11.011

5. Saporbekova AA, Altekey AB, et al. Biotechnological methods in pulp and paper production from an alternative source of raw materials - the savior of the ecosystem // *Appl Environ Biotechnol.* - 2023. – Т. 8 №2. – С. 1–9. doi:10.26789/AEB.2023.02.001

6. Janusz G, Pawlik A, Sulej J, et al. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution // *FEMS Microbiol Rev.* - 2017. – Т.41, №6. – С.941–62. doi:10.1093/femsre/fux049

7. Altekey AA, Saporbekova AA, et al. Biodegradation of straw lignin by culture of the fungus *Schizophyllum commune* isolated from the tree surface // *J Microbiol Virol.* – 2023. -Т.1, №40. – С. 127–38. doi:10.53729/MV-AS.2023.01.08

8. Harms H, Schlosser D, Wick LY. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals // *Nat Rev Microbiol.* – 2011. – Т. 9, №3. – С. 177–92. doi:10.1038/nrmicro2519

9. Rapley R. *The Nucleic Acids Protocols Handbook* - Totowa, NJ: Humana Press. - 2000. – С. 1002

10. Badotti F, de Oliveira FS, Garcia CF, et al. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of *Basidiomycota* (Fungi) // *BMC Microbiol.* – 2017.- Т.17. – С. 42. doi:10.1186/s12866-017-0958-x

11. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // *Clin Microbiol Rev.*- 2004.- Т. 17. – С.840–62.

12. Altekey A. Induction of ligninolytic enzymes of the fungus *Schizophyllum commune* // *Eurasian J Ecol.* – 2024. – Т. 78, №1. – С. 45–53. doi:10.26577/EJE.2024.v78.i1.08

13. Buzina W, et al. Development of molecular methods for identification of *Schizophyllum commune* from clinical samples // *J Clin Microbiol.* – 2001. – Т. 39 № 7. – С. :2391–6. doi:10.1128/JCM.39.7.2391-2396.2001

14. Kumar VP, Sridhar M, Rao RG. Biological depolymerization of lignin using laccase harvested from the autochthonous fungus *Schizophyllum commune* employing various production methods and its efficacy in augmenting in vitro digestibility in ruminants// *Sci Rep.* – 2022. – Т. 12, №1. – С.11170. doi:10.1038/s41598-022-15211-9

15. Toju H, et al. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of *Ascomycetes* and *Basidiomycetes* in environmental samples // PLoS One. – 2012. – T. 7, №7. – C. 40 - 63. doi:10.1371/journal.pone.0040863

16. Costa S, et al. Lignin biodegradation in pulp-and-paper mill wastewater by selected white rot fungi // Water. 2017. – T. 9, №12. – C.935. doi:10.3390/w9120935

17. Mytishchi branch, et al. Biodegradation of wood by wood-destroying fungi enzyme complexes // Forestry Bull. - 2019. – T.135, №95. – C.100. doi:10.18698/2542-1468-2019-5-95-100

18. Bhardwaj N, Kumar B, Agrawal K, et al. Current perspective on production of fungal cellulases under solid-state fermentation using agro-industrial by-products and their applications. // 3 Biotech. - 2020. – T.10, №6. – C. 227. doi:10.1007/s13205-020-02240-3

19. Costa S, Dedola DG, Pellizzoni M, et al. Lignin biodegradation in pulp-and-paper mill wastewater by selected white rot fungi// Water. - 2017. – T.9, №12. – C.935. doi:10.3390/w9120935

20. Rouches E, Herpoël-Gimbert I, Steyer JP, et al. Potential of white-rot fungi for sustainable bioethanol production from lignocellulosic materials// Renew Sustain Energy Rev. – 2016. T.64. – C.72–81. doi:10.1016/j.rser.2016.06.053

21. Zhang J, Liu X, Liu Y, et al. Degradation of lignin by *Cladosporium cladosporioides*: insights into enzymatic mechanisms // Appl Microbiol Biotechnol. – 2018. – T.102, №15. – C.6543–54. doi:10.1007/s00253-018-9105-6

22. Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, et al. Fungal strategies for lignin degradation // Fungal Biol Rev. – 2012. – T. 26, №4. – C.3–13. doi:10.1016/j.fbr.2012.05.002

REFERENCES

1. Kirk TK, Farrell RL. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin // Annu Rev Microbiol. – 1987. – Vol. 41. – P. 465–505. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002341

2. Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, et al. Biodegradation of lignin by white rot fungi // Fungal Genet Biol. – 1999. – Vol. 27. – P. 175–85. doi:10.1006/fgbi.1999.1150

3. Cui T, Yuan B, Guo H, et al. Enhanced lignin biodegradation by consortium of white rot fungi: microbial synergistic effects and product mapping // Biotechnol Biofuels. – 2021. – Vol. 14. – P.162. doi:10.1186/s13068-021-02011-y

4. Kamimura N, Takahashi K, Mori K, et al. Advances in microbial lignin degradation and its applications // Curr Opin Biotechnol. – 2019. – Vol.56. – P. 179–86. doi:10.1016/j.copbio.2018.11.011

5. Saparbekova AA, Altekey AB, et al. Biotechnological methods in pulp and paper production from an alternative source of raw materials - the savior of the ecosystem // Appl Environ Biotechnol. - 2023. – Vol. 8, №2. – P. 1–9. doi:10.26789/AEB.2023.02.001

6. Janusz G, Pawlik A, Sulej J, et al. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes

analysis and evolution // FEMS Microbiol Rev. - 2017. – Vol.41, №6. – P.941–62. doi:10.1093/femsre/fux049

7. Altekey AA, Saparbekova AA, et al. Biodegradation of straw lignin by culture of the fungus *Schizophyllum commune* isolated from the tree surface // J Microbiol Virol. – 2023. - Vol.1, №40. – P. 127–38. doi:10.53729/MV-AS.2023.01.08

8. Harms H, Schlosser D, Wick LY. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals // Nat Rev Microbiol. – 2011. – Vol. 9, №3. – P. 177–92. doi:10.1038/nrmicro2519

9. Rapley R. The Nucleic Acids Protocols Handbook - Totowa, NJ: Humana Press. - 2000. – C. 1002

10. Badotti F, de Oliveira FS, Garcia CF, et al. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of *Basidiomycota* (Fungi) // BMC Microbiol. – 2017.- Vol.17. – P. 42. doi:10.1186/s12866-017-0958-x

11. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // Clin Microbiol Rev.- 2004.- Vol. 17. – P.840–62.

12. Altekey A. Induction of ligninolytic enzymes of the fungus *Schizophyllum commune* // Eurasian J Ecol. – 2024. – Vol. 78, №1. – P. 45–53. doi:10.26577/EJE.2024.v78.i1.08

13. Buzina W, et al. Development of molecular methods for identification of *Schizophyllum commune* from clinical samples // J Clin Microbiol. – 2001. – Vol. 39 № 7. – P. :2391–6. doi:10.1128/JCM.39.7.2391-2396.2001

14. Kumar VP, Sridhar M, Rao RG. Biological depolymerization of lignin using laccase harvested from the autochthonous fungus *Schizophyllum commune* employing various production methods and its efficacy in augmenting in vitro digestibility in ruminants// Sci Rep. – 2022. – Vol. 12, №1. – P.11170. doi:10.1038/s41598-022-15211-9

15. Toju H, et al. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of *Ascomycetes* and *Basidiomycetes* in environmental samples // PLoS One. – 2012. -Vol. 7, №7. – P. 40 - 63. doi:10.1371/journal.pone.0040863

16. Costa S, et al. Lignin biodegradation in pulp-and-paper mill wastewater by selected white rot fungi // Water. 2017. – Vol. 9, №12. – P.935. doi:10.3390/w9120935

17. Mytishchi branch, et al. Biodegradation of wood by wood-destroying fungi enzyme complexes // Forestry Bull. - 2019. – Vol.135, №95. – P.100. doi:10.18698/2542-1468-2019-5-95-100

18. Bhardwaj N, Kumar B, Agrawal K, et al. Current perspective on production of fungal cellulases under solid-state fermentation using agro-industrial by-products and their applications. // 3 Biotech. - 2020. – Vol.10, №6. – P. 227. doi:10.1007/s13205-020-02240-3

19. Costa S, Dedola DG, Pellizzoni M, et al. Lignin biodegradation in pulp-and-paper mill wastewater by selected white rot fungi// Water. - 2017. – Vol.9, №12. – P.935. doi:10.3390/w9120935

20. Rouches E, Herpoël-Gimbert I, Steyer JP, et al. Potential of white-rot fungi for sustainable bioethanol production from lignocellulosic materials// Renew Sustain

Energy Rev. – 2016. Vol.64. – P.72–81. doi:10.1016/j.rser.2016.06.053

21. Zhang J, Liu X, Liu Y, et al. Degradation of lignin by *Cladosporium cladosporioides*: insights into enzymatic mechanisms // Appl Microbiol Biotechnol. – 2018. – Vol.102, №15. – P.6543–54. doi:10.1007/s00253-018-9105-6

22. Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, et al. Fungal strategies for lignin degradation // Fungal Biol Rev. – 2012. – Vol. 26, №4. – P.3–13. doi:10.1016/j.fbr.2012.05.002

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства Образования и Науки Республики Казахстан в рамках научного проекта №AP23488383 «Иссле-

дование эффективных микроорганизмов продуцентов ферментов, комплексов ферментов, полученных на основе генетических и селекционных методов, для переработки вторичного растительного сырья АПК»

Также выражаем благодарность РГП «Национальный центр биотехнологии» и коллективу лаборатории «Национальная научная лаборатория биотехнологии коллективного пользования» во главе с Жолдыбаевой Е.В. за возможность и поддержку в проведении исследования.

Приложение А

Таблица 1 Нуклеотидные последовательности и результаты идентификации

Наименование Культуры	Последовательность	Результаты идентификация в BLAST					
		Accession # GenBank A	Наименование штамма	% идент	порог по E-value	длина выравни- вания,	Coverage (покрытие)
2	CGAGGTCACCT- GAAAAAAAAGGTGATTTG- CGTCGGCTGGCGCCGGC- CG-GG-CCTACAGAGCGGGT- GACAAAGCCCATACGCTC- GAGGACCGGACGCGGTG- CCGCCGCTGCCTTTCGGG- CCCGTCCCCCGGAGGG- GAGGACGAGGCCAACACA- CACAAGCCGGCTTGAGGG- CAGCAATGACGCTCGGACAG- GCATGCCCCCGGAATAC- CAGGGGGCGCAATGTGC- GTTCAAAGACTCGATGAT- TCACTGAATTCGCAATTCA- CATTAGTTATCGCATTTGCT- GCGTTCTTCATCGATGCCG- GAACCAAGAGATCCATTGTT- GAAAGTTTAACTGATTA- CAAAGAATCGGATTCATACAG- GCTTTCAGAACAGTGTTTCAT- GTTGGGGTCTCCGGCGGGCG- CGGACCCGGGGACACAAGG- CCCCCGGGCGCCAGCACGG- GGCTGCGGGCCCGCGAAG- CAACAAAGGTACAATAGT- CACGGGTGGGA	HG915909.1	Aspergillus spelaeus ge- nomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain CCF 4680	99.80%	0.0	550	100
		MZ374038.1	Aspergillus spelaeus strain 090716NER11K9 internal transcribed spacer 1, partial se- quence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosom- al RNA gene, partial sequence	99.80%	0.0	553	100
		LT899490.1	Aspergillus spelaeus genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain FMR 15223	99.60%	0.0	521	100
3	CCGAGGTCACCT- GAGAAAATATAAAGGTTG- GGGGTCGGCTGGCGCCGG- CCG-GGCTTACAAGAGCG- GGTGACGAAGCCCCATAC- GCTCGAGGACCGGACGCG- GTGCCGCCGCTGCCTTTCG- GGCCCGTCCCCCGGCGC- GGGGGGGACGGGCCCAA- CACACAAGCCGTGCCT- GAGGGAGCAATGAGGCTC- GGACAGGCATGCCCTCCG- GAATACCAGAGGGCGCAAT- GTGCGTTCAAAGACTCGAT- GATCACTGAATTCTGCAAT- TCACATTAGTTATCGCATTTC- GCTGCGTTCTTCATCGAT- GCCGGAACCAAGAGATC- CGTTGTTGAAAGTTTAACTA- ATTTAGCTAGTTTCTCAAAC- TCAACTTCAGACAGC- GTTTCAGAAGGGGGGCTTCGG- CGGGCGGGGCCCGGGGGCG- GATGCCCCCGGGCGCCTAG- GCGGCGG	KX363455.1	Penicillium sp. isolate 6038 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran- scribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribo- somal RNA gene, partial sequence	98.66%			

		KX009145.1	Penicillium sp. isolate SR59 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98.66%			
		OW987786.1	Penicillium sizovae genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene	98.66%			
4	TGG-AAGAATGGTTG-GAAAACGTCGGCAGGCG-CCGGCCAATACTACAGAG-CATGTGACAAAGCCCCATAC-GCTCGAGGATCGGACGCG-GTGCCGCGTGCCTTTCG-GGCCCGTCCCCCGGAGAG-GGGGACGGCGACCCAACA-CACAAGCCGGGCTTGAGGG-CAGCAATGACGCTCGACAG-GCATGCCCCCGGAATAC-CAGGGGGCGCAATGTGC-GTTCAAAGACTCGATGAT-TCACTGAATTCTGCAATTCA-CATTAGTTATCGCATTTCGCT-GCGTTCTTCATCGATGCCG-GAACCAAGAGATCCATTGTT-GAAAAGTTTAACTGATTG-CATTCAATCAACTCAGACTG-CACGCTTTCAGACAGTGTTC-GTGTTGGGGTCTCCGGCG-GGCACGGGCCCCGGGGG-CAGAGGCGCCCCCGGC-GGCCGACAAGCGCGGGC-CCGCCAAGCAAACAGGGTA-CAATAGACACGGAT	MH259704.1	Aspergillus niger strain WMH-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	99.79%			
		MT273953.1	Aspergillus sp. isolate SY5429 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	99.79%			
		MN792832.1	Aspergillus niger isolate AMU-R-AN1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	99.79%			
6	TAGTTTCCACAACGCTTAG-GGGACAGAAGACCCAGC-CGGTTCGATTGAGGCAC-GCGGGCGACCGGTTGC-CCAATACCAAGCGAGGCTT-GAGTGGTAAAATGACGCTC-GAACAGGCATGCCCCCG-GAATACCAGGGGCGCAAT-GTGC GTTCAAAGATTTCGAT-GATTCACTGAATTCTGCAAT-TCACATTACTTATCG-CATTTC-GCTGCGTTCTTCATCGAT-GCCAGAACCAAGAGATC-CGTTGTTAAAAAGTTTAA-ATTTATTAATTAAGTTTACT-CAGACTGCAAAGTTACGCAA-GAGTTTGAAGTGTCCACCCG-GAGCCCCCGCCGAAGG-CAGGGTGCGCCCGGAGGCAA-CAGAGTCGGACAACAAAG-GGTTATGAACATCCCGGTG-GTTAGACCGGGTCACTTG-TAATGATCCCTCCGAG-GTTCACCTACGA	MF072622.1	Cladosporium cladosporioides strain 016 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	100.00%			

		OQ357954.1	Cladosporium sp. strain MEND-F-1149 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	100.00%			
		OQ357953.1	Cladosporium sp. strain MEND-F-1102 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	100.00%			
7	CCTTCGGGGTTACAG- CCTTGCTGAATTATTCAC- CCGTGCTTTTTGCG- TACTTCTTGTTTCCTTGGT- GGGTTTCGCCACCATAGG- ACAAACCATAAACCTTTTG- TAATTGCAATCAGCGTCAG- TAAAAAAAAATTAATAAT- TACAACTTTTAACAAC- GGATCTCTTGGTTCTGG- CATCGATGAAGAACGCAGC- GAAATGCGATAAGTAGTGT- GAATTGCAGAATTCAGTGAAT- CATCGAATCTTTGAACGCA- CATTGCGCCCTTTGGTATTC- CAAAGGCATGCCTGTTC- GAGCGTCATTTGTACCCT- CAAGCTTTGCTTGGTGTG- GGCGTCTTGTCTCCAGTTC- GCTGGAGACTCGCCTTA- AAGTAATTGGCAGCCGG- CCTACTGGTTTCGGAGCGCAG- CACAAGTCGAGCTATCTTC- CAGCCAAGGTCAGCATCCA- CAAAGCCTTTTTCAACTT	MH430101.1	Alternaria chartarum strain PPC-1-21 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.56%			
		MZ450149.1	Alternaria sp. strain DC9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	99.56%			
		MT735263.1	Alternaria sp. isolate A1_contig_28 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	99.56%			

ӨОК: 577.29

АҒАШТЫ БҰЗАТЫН ЗЕҢ САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРДЫҢ ТАЗА ДАҚЫЛДАРЫН ОҚШАУЛАУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ БИОТЕХНОЛОГИЯЛЫҚ ҚОЛДАНУ ҮШІН МОЛЕКУЛАЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ

Сапарбекова А. А.¹, Алтекей А. Б.¹, Сильвия Б. Р.², Матчанов А. Д.³, Кантуреева Г.¹, Қалдыбекова Г.¹¹ М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент қ., Қазақстан² Валладолид университеті, Валладолид қ., Испания³ Академик Садыков атындағы биоорганикалық химия институты, Ташкент қ., ӨзбекстанЖауапты автор: altekey@mail.ru

АНДАТПА

Бұл жұмыста Шымкент қаласындағы Асанбай Асқаров атындағы дендропарктен жиналған шіріп жатқан ағаш беткейінен ағашты бұзушы саңырауқұлақтардың таза дақылдарын бөліп алу әдістемесі, олардың микроскопиялық зерттеуі және полимеразды тізбекті реакция (ПТР) мен ITS-аймақты секвенирлеуді қолдана отырып молекулалық идентификациясы ұсынылған. Зерттеу мақсаты – ағашты бұзушы саңырауқұлақтардың түрлік алуан түрлілігін зерттеу және олардың биотехнологиялық қолдануларға әлеуетін бағалау. Зең саңырауқұлақтардың бес түрі анықталды: *Aspergillus spelaeus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sizovae*, *Cladosporium cladosporioides* және *Alternaria sp.* Оқшаулау культураларды байыту, метилен көк бояуы бар микроскопияны және ПТР және секвенирлеу арқылы идентификацияны қолдану арқылы орындалды. ПТР және секвенирлеуді пайдалану түрлерді дәл анықтауға мүмкіндік берді және ағаш беттермен байланысты экожүйелік процестерді бақылау мен зерттеудің жаңа тәсілдерін ұсынады. Лигнинолитикалық белсенділік Azure-B талдауы арқылы расталды. Алынған деректер саңырауқұлақтардың жоғары әртүрлілігін және олардың ағаш қалдықтарын өңдеу және биоремедиация үшін әлеуетін көрсетеді. Нәтижелер ағаш беттерінде ағашты бұзатын саңырауқұлақтардың жоғары әртүрлілігін көрсетті, бұл осы экожүйелердегі микробиоманың күрделілігін растады.

Кілт сөздер: ағашты бұзатын саңырауқұлақтар, ағаш, идентификация, лигнин, лигнин ыдрату белсенділігі, биоремедиация

UDC: 577.29

ISOLATION OF PURE CULTURES OF WOOD-DESTRUCTING FUNGI AND THEIR MOLECULAR CHARACTERIZATION FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION

Saparbekova A.A.¹, Altekey A.B.¹, Silvia B.R.², Matchanov A.D.³, Kantureeva G.¹, Kaldybekova G.¹¹ M. Auezov South Kazakhstan State University, Shymkent, Kazakhstan² University of Valladolid, Valladolid, Spain³ Academician Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Tashkent, UzbekistanCorresponding author: altekey@mail.ru

ABSTRACT

This paper presents a method for isolating pure cultures of wood-destroying fungi from the surface of decomposing wood collected in the Asanbay Askarov Arboretum (Shymkent, Kazakhstan), performing their microscopic examination and molecular identification using polymerase chain reaction (PCR) and ITS region sequencing. The aim of the study is to investigate the species diversity of wood-destroying fungi and assess their potential for biotechnological applications. Five species were identified: *Aspergillus spelaeus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sizovae*, *Cladosporium cladosporioides*, and *Alternaria sp.* Isolation was performed using enrichment cultures, microscopy with methylene blue staining, and identification by PCR and sequencing. The use of PCR and sequencing enabled accurate species identification and proposes new approaches for monitoring and studying ecosystem processes associated with wood surfaces. Ligninolytic activity was confirmed using the Azure-B assay. The data obtained highlight the high diversity of fungi and their potential for wood waste processing and bioremediation. The results showed a high diversity of wood-destroying fungi on wood surfaces, confirming the complexity of the microbiome in these ecosystems.

Key words: wood-destroying fungi, wood, identification, lignin, political activism, bioremediation