

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ *FUSARIUM EQUISETI* И *CYLINDROCARPON MAGNUSIANUM* НА РАЗНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НЕФТИ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В СРЕДЕ

И.Л. Бухарина, д.б.н., Н.А. Исламова, к.б.н., А.А. Исупова

Удмуртский государственный университет, e-mail: buharin@udmlink.ru,

Корневые эндофиты способны ограничивать воздействие химических веществ на растения и повышать их устойчивость к стрессовым условиям. В проведенных исследованиях были использованы культуры (изоляты) эндофитных микромицетов *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum*, выделенные из корней растений, длительно произрастающих в условиях урбаноземов. При этом эти виды грибов не являются облигатными эндофитами. В лабораторных экспериментах были моделированы разные концентрации нефти и тяжелых металлов в средах, на которых культивировали эти виды микромицетов. Установлено влияние загрязняющих веществ на показатели роста колоний мицелия и содержание малонового диальдегида в мицелии. Показано, что культуры *Cylindrocarpon magnusianum* и *Fusarium equiseti* обладают высокой металлорезистентностью, при этом наибольшую устойчивость они проявили к хрому и свинцу, чем к биогенным элементам (цинку и меди). Концентрация меди в среде 150 мг/л для *F. equiseti* оказалась наиболее токсичной, но не пороговой. Исследование динамики содержания малонового диальдегида в мицелии грибов указало на видоспецифичность по отношению к тяжелым металлам: *C. magnusianum* более устойчив к действию высоких концентраций меди, *F. equiseti* – хрома. Культуры грибов также проявили устойчивость к содержанию нефти в субстрате. Адаптированные к условиям техногенной среды эндофитные грибы могут быть использованы в качестве агентов управления устойчивостью растений при создании искусственных устойчивых насаждений и восстановлении нарушенных земель.

Ключевые слова: микромицеты, тяжелые металлы, металлорезистентность, устойчивость, нефтяное загрязнение.

RESEARCH OF *FUSARIUM EQUISETI* AND *CYLINDROCARPON MAGNUSIANUM* REACTION TO DIFFERENT CONCENTRATIONS OF OIL AND HEAVY METALS IN MEDIUM

Dr.Sci. I.L. Bukharina, Ph.D. N.A. Islamova, A.A. Isupova

Udmurt State University, e-mail: buharin@udmlink.ru

Root endophytes are able to limit the impact of chemicals on plants and increase their resistance to stressful conditions. Cultures (isolates) of endophytic micromycetes *Fusarium equiseti* and *Cylindrocarpon magnusianum*, isolated from the roots of plants growing for a long time in urban soil conditions, were used in the studies. However, these types of fungi are not obligate endophytes. In laboratory experiments, different concentrations of oil and heavy metals were modeled in the media in which these types of micromycetes were cultivated, the effect of pollutants on the growth rates of mycelial colonies and the content of malonic dialdehyde in the mycelium was established. It has been established that cultures of *Cylindrocarpon magnusianum* and *Fusarium equiseti* have high metal resistance, while they showed the greatest resistance to chromium and lead than to biogenic elements (zinc and copper). The concentration of copper in the medium of 150 mg/l for *F. equiseti* turned out to be the most toxic, but not the threshold. The study of the dynamics of the content of malonic dialdehyde in the fungal mycelium indicated species specificity in relation to heavy metals: *C. magnusianum* is more resistant to high concentrations of copper, *F. equiseti* – chromium. Fungal cultures also showed resistance to the oil content in the substrate. Endophytic fungi adapted to the conditions of the technogenic environment can be used as agents for managing plant resistance in creating artificial sustainable plantations and restoring disturbed lands.

Keywords: micromycetes, fungi, heavy metals, metal resistance, oil pollution resistance.

Ухудшение качества почвы, вызванное загрязнением тяжелыми металлами и нефтепродуктами – глобальная проблема, возникающая в результате промышленной деятельности человека, что, в свою очередь, ведет и к гибели растений [1, 2]. Однако

растения, находящиеся в ассоциации с корневыми микромицетами, имеют более широкие пределы устойчивости к внешним факторам [3, 4]. Среди таких микромицетов корневые эндофиты, в том числе, эндофитные грибы, представляют наиболь-

ший интерес: они морфологически разнообразны по своему строению, имеют широкий ареал распространения и жизнеспособны в стрессовых условиях. При этом важным фактором служит происхождение и источник инокулята. Те изоляты, которые были получены из загрязненных тяжелыми металлами почв, были наиболее эффективными в вопросе повышения устойчивости растений к загрязнителям [5-7], что указывает на способность грибов эндомикоризы адаптироваться к условиям высокой нагрузки. Отсюда изучение устойчивости эндодитных грибов к действию различных загрязнителей, а также их влияние на стрессоустойчивость растений весьма актуально. В связи с чем, *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* представляют немалый интерес. *Fusarium equiseti* – широко встречающийся в природе корневой эндодит и обладает способностью колонизировать корни растений, не являющихся хозяевами. Гриб долгое время считался патогенным, однако в последнее время привлек к себе внимание способностью выступать в качестве биоконтроллера в борьбе с корневыми патогенами [8, 9]. *Cylindrocarpon magnusianum* также имеет широкий спектр сред обитания, кроме того его относят к группе «нефтегазоносных грибов», что может быть востребовано в восстановлении нефтезагрязненных земель [10, 11].

Цель исследования – установить пределы устойчивости представителей эндодитных грибов к содержанию нефти и тяжелых металлов в субстрате.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследований были использованы эндодитные грибы *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum*. Грибы выделены из корневой системы растений, произрастающих на техногенных территориях г. Ижевска (Удмуртская Республика). Видовая принадлежность грибов установлена методами молекулярного анализа ДНК в лаборатории Лейбницкого института овощных и декоративных культур (г. Берлин) [12, 13].

Культуры грибов выращивали на питательной агаровой среде (PDA) из декстрозного бульона и агар-агара с добавлением разных концентраций тяжелых металлов и нефти. Через каждые трое суток после посева проводили измерения диаметра и скорости роста колоний гриба. Опыт проводили в трехкратной повторности. Тяжелые металлы вносили в следующих концентрациях: Zn – 100, 200, 300 мг/л; Cu – 50, 100, 150 мг/л; Cr – 2,5, 5, 10 мг/л; Pb – 25, 50, 100 мг/л, нефть – в концентрациях 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 и 10,0%. Тяжелые металлы вносили в субстрат в виде солей $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $CuSO_4 \times 5H_2O$, $K_2Cr_2O_7$ и $PbSO_4$ с пересчетом на моделируемые концентрации. Особенности реакции грибов на условия стресса оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА в мицелии гриба оценивали по степени накопления

продукта его реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), определяя оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 532 нм [14]. Для этого в пробирку с грибной биомассой добавляли 2 мл дистиллированной воды и 3 мл 10% ТХУ. Из получившегося гомогената отбирали пробу 2 мл и добавляли 0,5% ТБК.

Математическая обработка результатов проведена с использованием пакета Statistica 6.0 методами описательной статистики. Достоверность различий вариантов опыта установлена при $p < 0,05$.

Результаты. Исследование роста культур *Cylindrocarpon magnusianum* и *Fusarium equiseti* на средах с тяжелыми металлами показало высокие пределы устойчивости грибов к загрязнителю (рис. 1-8).

Содержание меди и цинка в среде оказало влияние на рост *Cylindrocarpon magnusianum*: размеры колоний гриба при всех концентрациях металлов достоверно были меньше, по сравнению с контролем. При этом размеры колоний уменьшались в соответствии с увеличением концентрации металлов (кроме Zn 300 мг/л). Тем не менее, пороговые концентрации меди и цинка для *C. magnusianum* пока обнаружены не были. Скорость роста гриба, так же, как и размеры его колоний, при всех концентрациях меди и цинка достоверно уменьшилась по сравнению с контролем, особенно в первую неделю эксперимента.

Хром и свинец оказались менее токсичными для *C. magnusianum*. Содержание в среде хрома во всех исследуемых концентрациях не оказало влияния на рост гриба: размеры его колоний не имели достоверных отличий от контроля. Варианты со свинцом в концентрациях 50 и 100 мг/л также достоверно не отличались от контроля. Однако содержание в среде свинца в концентрации 25 мг/л стимулировало рост колоний гриба. Достоверной разницы в скорости роста колоний гриба между остальными опытными вариантами и контролем, как и в эксперименте с хромом, не наблюдалось до окончания эксперимента.

В эксперименте с *F. equiseti* результаты были схожими с экспериментом с *C. magnusianum* (рис. 5-8).

Наибольшее ингибирование роста культуры *F. equiseti* вызвало содержание в среде цинка и меди. С увеличением концентрации этих элементов диаметр колоний гриба уменьшался. Наиболее токсичной оказалась концентрация меди 150 мг/л, однако даже при такой концентрации металла рост гриба не прекратился.

Содержание в среде хрома и свинца, как и в эксперименте с *C. magnusianum*, существенного влияния на рост *F. equiseti* не оказало. Тем не менее, диаметр колоний гриба при всех исследуемых концентрациях хрома в среде был достоверно меньше по сравнению с контролем, при этом сами варианты Cr 2,5, Cr 5,0 и Cr 10,0 мг/л достоверной разницы между собой не имели. Скорость роста *F. equiseti*

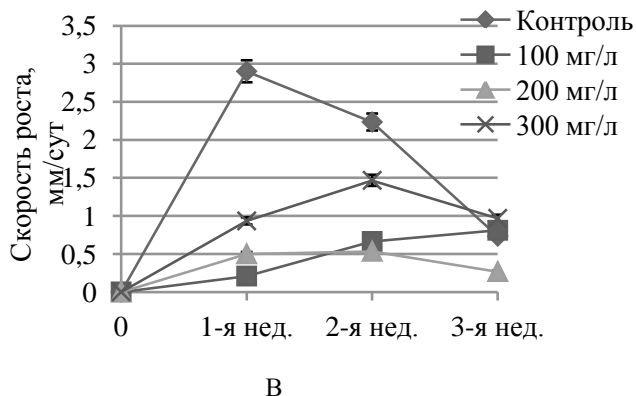
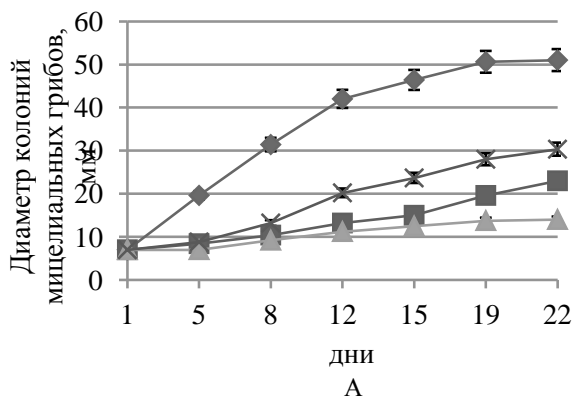


Рис. 1. Динамика размеров (А) и скорость роста (В) колоний *Cylindrocarpon magnusianum* на средах с разной концентрацией цинка

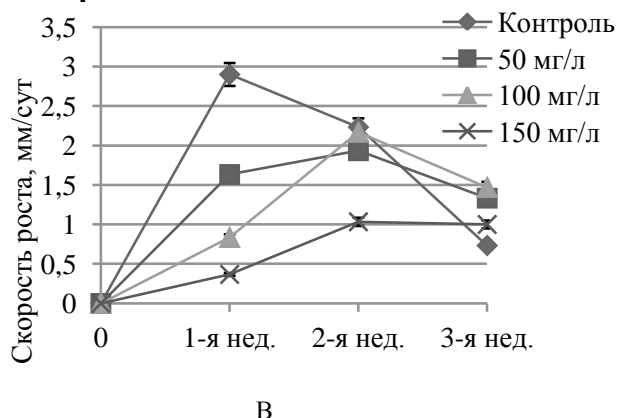
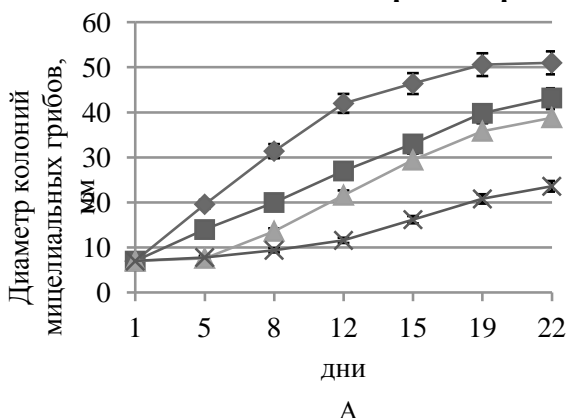


Рис. 2. Динамика размеров (А) и скорость роста (В) колоний *Cylindrocarpon magnusianum* на средах с разной концентрацией меди

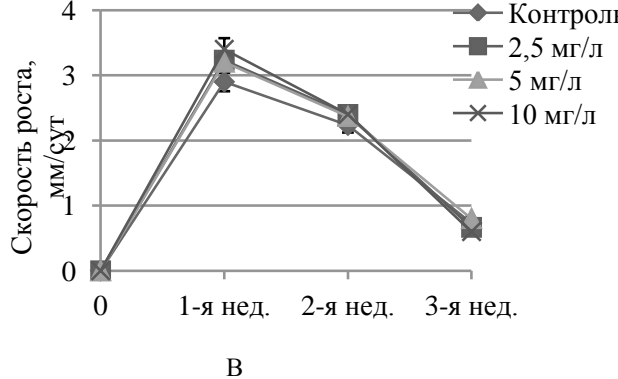
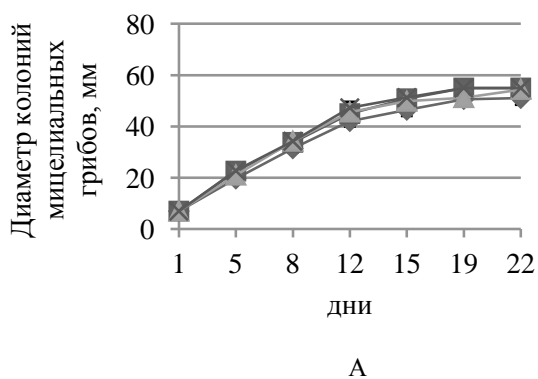


Рис. 3. Динамика размеров (А) и скорость роста (В) колоний *Cylindrocarpon magnusianum* на средах с разной концентрацией хрома

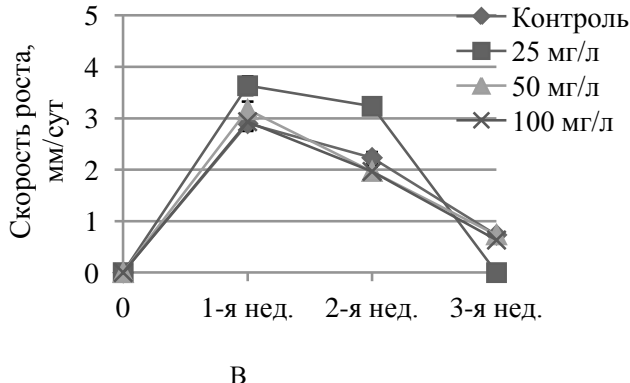
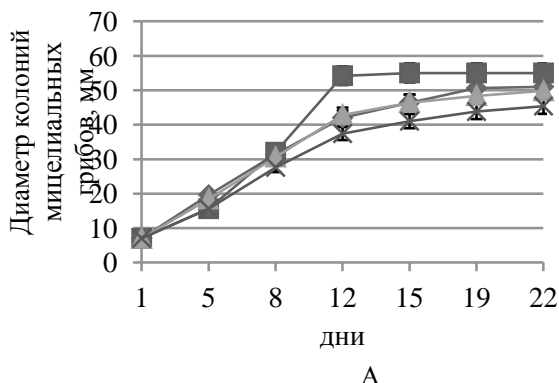
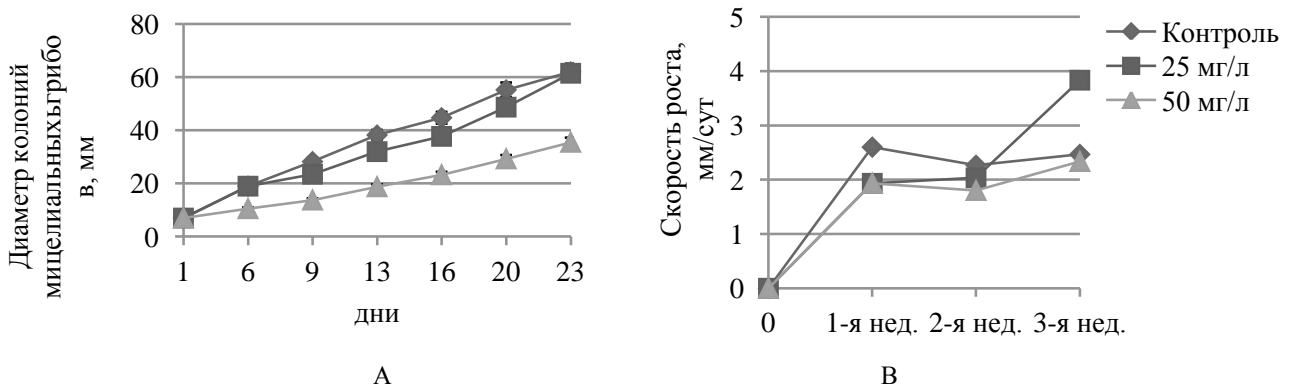
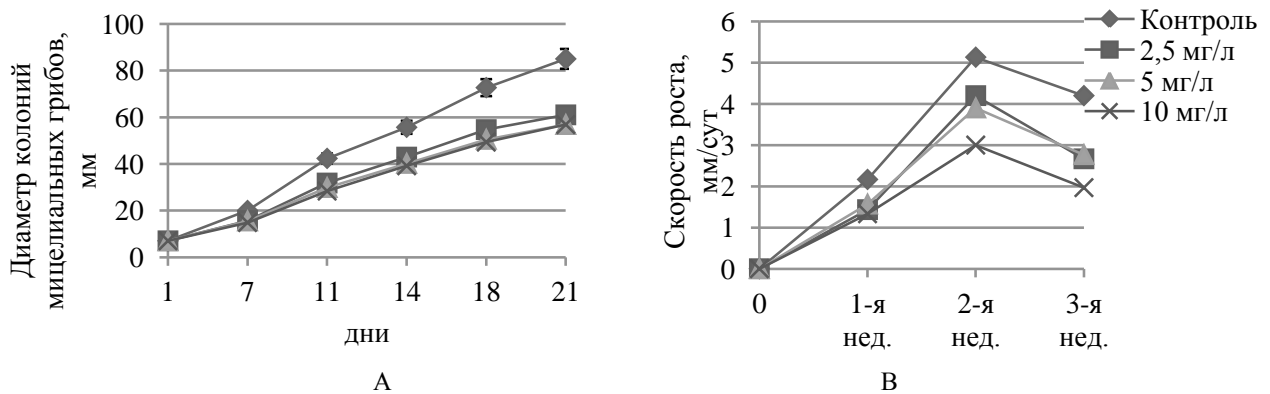
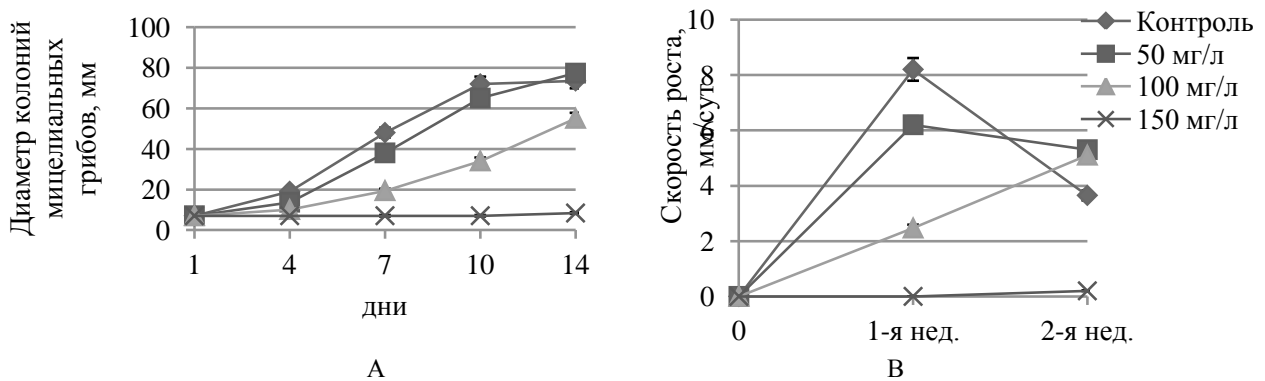
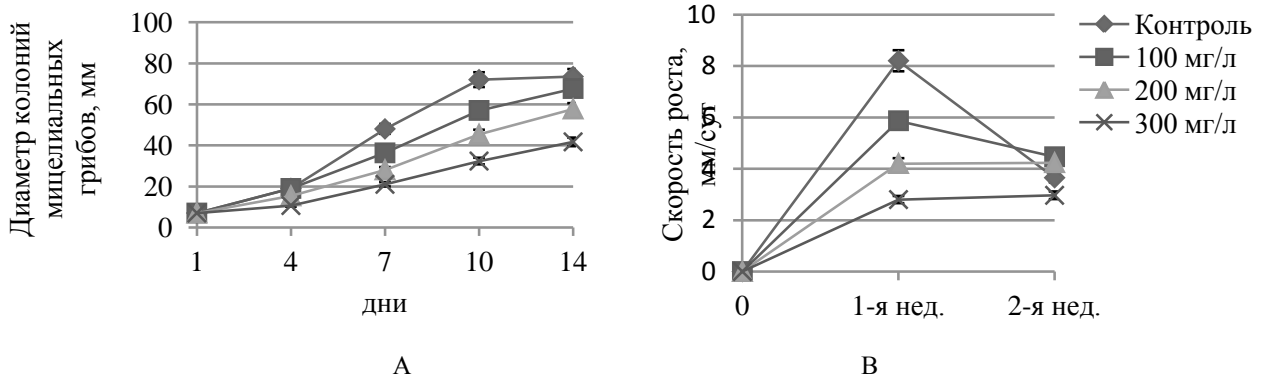


Рис. 4. Динамика размеров (А) и скорость роста (В) колоний *Cylindrocarpon magnusianum* на средах с разной концентрацией свинца



1. Содержание малонового диальдегида в мицелии *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum*, мкмоль/1 г сырой массы

| Содержание ТМ в субстрате | Содержание МДА в мицелии <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> | Содержание МДА в мицелии <i>Fusarium equiseti</i> |
|---------------------------|--|---|
| Без ТМ (контроль) | 2,034 ± 0,047 1,959-2,109 | 1,290 ± 0,071 ¹ 1,064-1,516 |
| Cr, 2,5 мг/л | 6,092 ± 0,585↑ 5,161-7,024 | 1,743 ± 0,071↑ ² 1,519-1,968 |
| Cr, 5,0 мг/л | 7,276 ± 1,115↑ 5,502-9,050 | 1,760 ± 0,070↑ 1,536-1,983 |
| Cr, 10,0 мг/л | 3,881 ± 0,054↑ 3,795-3,966 | 1,142 ± 0,014 1,098-1,185 |
| Cu, 50 мг/л | 2,031 ± 0,021 1,997-2,064 | 2,227 ± 0,230 1,495-2,958 |
| Cu, 100 мг/л | 3,571 ± 0,431↑ 2,885-4,257 | 6,368 ± 0,775↑ 3,902-8,833 |
| Cu, 150 мг/л | 4,117 ± 0,291↑ 3,654-4,580 | 8,076 ± 0,311↑ 7,087-9,066 |

¹Среднее значение показателя ± стандартное отклонение.

²Достоверное отличие от контроля: увеличение ↑ или уменьшение ↓ показателя (p < 0,05).

при внесении в среду хрома и свинца в разных концентрациях была достоверно ниже контрольного варианта, однако разница была незначительной.

Таким образом, культуры микромицетов *F. equiseti* и *C. magnusianum* показали высокую устойчивость к содержанию солей тяжелых металлов (ТМ) в среде, особенно хрома и свинца, что подтверждает исследования других авторов [15, 16]. К содержанию солей цинка и меди в среде *C. magnusianum* проявил большую устойчивость по сравнению с *F. equiseti*.

Для оценки влияния стрессового фактора в виде ТМ на состояние организма определяли содержание малонового альдегида в мицелии *F. equiseti* и *C. magnusianum* при их выращивании на субстратах с медью и хромом (табл. 1). МДА служит продуктом окисления липидов и может быть показателем степени повреждения мембранных структур в клетках организма [17, 18]. Ряд исследований подтверждают зависимость концентрации МДА в мицелии гриба от содержания ТМ в среде.

Так, концентрация МДА в *Acrocalymma vagum* сначала увеличивалась, а затем снижалась с увеличением концентрации Cd в среде [7]. Исследования с пигментсинтезирующими дрожжами *Rhodotorula mucilaginosa* показали, что с содержанием цинка в среде 100, 150 и 200 мг/л содержание МДА в мицелии гриба достоверно снижается, а при увеличении концентрации цинка в среде (300, 350 мг/л) – существенно возрастает. На средах с внесением хрома, наоборот, при концентрации 10 мг/л содержание МДА в мицелии увеличивается, при дальнейшем повышении содержания хрома в среде (20 и 30 мг/л) – снижается [19].

Анализ содержания МДА в мицелии *F. equiseti* и *C. magnusianum* показал зависимость увеличения этого показателя от концентрации химических элементов в среде. Наибольшая реакция на содержа-

ние хрома в среде наблюдалась у *C. magnusianum*: содержание МДА во всех вариантах было существенно выше, чем в контроле. Однако при самой высокой концентрации хрома 10 мг/л содержание МДА в мицелии гриба было достоверно ниже, чем в других вариантах с хромом. На *F. equiseti* большее влияние оказало содержание меди в среде: с увеличением ее концентрации содержание МДА в мицелии достоверно увеличивалось по отношению к контролю. В мицелии *C. magnusianum* при внесении в среду меди содержание МДА также было достоверно выше по сравнению с контролем (кроме Cu, 50 мг/л), однако отличие было не столь значительным, как в эксперименте с *F. equiseti*.

Можно заключить, что синтез МДА играет роль в системе адаптивных реакций грибов. Анализ содержания МДА в мицелии грибов показал, что *C. magnusianum* проявил большую устойчивость к содержанию меди в среде, *F. equiseti* – к содержанию хрома. Стоит также отметить, что при внесении в среду хрома в концентрациях 2,5 и 5,0 мг/л содержание МДА в мицелии *C. magnusianum* и *F. equiseti* увеличилось, однако при увеличении концентрации металла до максимальной (10 мг/л) значение этого показателя, наоборот, снижалось. Аналогичный результат отмечен в исследованиях с эндофитными грибами *Acrocalymma vagum* и *Scytalidium lignicola* при их выращивании на средах с кадмием [7] и дрожжевым грибом *Rhodotorula mucilaginosa* при выращивании на средах с хромом (VI) [19].

Результаты эксперимента по выращиванию грибов на средах с внесением разных концентраций нефти представлены в таблицах 2 и 3.

При всех исследуемых концентрациях нефти наблюдался рост *F. equiseti* и *C. magnusianum*. В эксперименте с *F. equiseti* наибольшее ингибирование роста вызвала концентрация нефти 10%, однако пороговой она не оказалась. При содержании в

2. Скорость роста колоний *Fusarium equiseti*, мм/сут.

| Период наблюдений | Контроль | Содержание нефти в среде | | | | |
|-------------------|----------|--------------------------|------|-----|------|-----|
| | | 1% | 2,5% | 5% | 7,5% | 10% |
| 1 неделя | 6,5 | 6,8 | 7,2 | 6,8 | 2,5 | 2 |
| 2 недели | 2,3 | 2,7 | 1,9 | 2,3 | 3,4 | 2,5 |
| 3 недели | 2 | 0,9 | 0,3 | 0 | 1,6 | 0 |

3. Скорость роста колоний *Cylindrocarpum magnusianum*, мм/сут.

| Период наблюдений | Контроль | Содержание нефти в среде | | | | |
|-------------------|----------|--------------------------|------|-----|------|-----|
| | | 1% | 2,5% | 5% | 7,5% | 10% |
| 1 неделя | 2 | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 0,9 | 0,7 |
| 2 недели | 4,5 | 4 | 2,9 | 3,4 | 2,1 | 2,3 |
| 3 недели | 2,9 | 3,7 | 0,3 | 2 | 1,9 | 3,2 |

среде нефти в концентрациях 1%, 2,5 и 5% скорость роста колоний гриба в течение первой недели была выше, чем в контрольном варианте. К концу эксперимента скорость роста колоний снизилась и была ниже, чем в контроле во всех опытных вариантах с нефтью. *C. magnusianum*, наоборот, в начале эксперимента не отличался активным ростом (период адаптации), а со второй недели эксперимента проявлял высокие показатели роста колоний.

Таким образом, культуры *Cylindrocarpum magnusianum* и *Fusarium equiseti* обладают в целом высокой металлорезистентностью, при этом большую устойчивость они проявили к хрому и свинцу, чем к биогенным элементам (цинку и меди). Концентрация меди 150 мг/л для *F. equiseti* оказалась наиболее токсичной, но не пороговой. Исследование динамики образования малонового диальдегида в мицелии *C. magnusianum* и *F. equiseti* под действием тяжелых металлов показало, что грибы обладают видоспецифичностью по отношению к тяжелым металлам: *C. magnusianum* более устойчив к действию высоких концентраций меди, *F. equiseti* – хрома. Исследуемые культуры грибов проявили устойчивость к содержанию нефти в среде, но при этом отмечены видоспецифические стратегии адаптации видов к фактору нефтяного загрязнения.

Литература

1. Джувеликян Х.А., Щеглов Д.И., Горбунова Н.С. Загрязнение почв тяжелыми металлами. Способы контроля и нормирования загрязненных почв. Учебно-методическое пособие для вузов. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского гос. ун-та., 2009. – 22 с.
2. Li X., Zhang X., Wang X., Yang X., Cui Z. Bioaugmentation-assisted phytoremediation of lead and salinity co-contaminated soil by *Suaeda salsa* and *Trichoderma asperellum* // Chemosphere, 2019, Vol. 224. – P. 716-725.
3. Титов А.Ф., Таланова В.В. Устойчивость растений и фитогормоны. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. – 206 с.
4. Ali A., Bilal S., Khan A. L., Mabood F., Al-Harrasi A., Lee I. Endophytic *Aureobasidium pollutants* BSS6 assisted developments in phytoremediation potentials of *Cucumis sativus* under Cd and Pb stress // Journal of Plant Interactions, 2019, Vol. 14, № 1. – P. 303-313.
5. Rydlova J., Vosatka M. Effect of *Glomus intraradices* isolated from Pb-contaminated soil on Pb uptake by *Agrostis capillaries* is changed by its cultivation in a metal-free substrate // Folia Geobotanica, 2003, № 155. – P. 155-165.
6. Domka A.M., Rozpadek P., Turnau K. Are Fungal Endophytes Merely Mycorrhizal Copycats? The Role of Fungal Endophytes in the Ad-

aptation of Plants to Metal Toxicity // Frontiers in Microbiology, 2019, Vol. 10. – P. 371.

7. Hou L., Yu J., Zhao L. and He X. Dark Septate Endophytes Improve the Growth and the Tolerance of *Medicago sativa* and *Ammopiptanthus mongolicus* Under Cadmium Stress // Frontiers in Microbiology, 2020, Vol. 10. – P. 1-17.

8. Литовка Ю.А. Эколого-биологические особенности и биоконтроль грибов рода *Fusarium*, распространенных в наземных экосистемах средней Сибири: дисс. д.б.н.: 03.02.08. – Красноярск: Сибирский гос. ун-т науки и технологий им. академика М.Ф. Решетнева, 2018. – 497 с.

9. Maciá-Vicente J.G., Jansson H.B., Talbot N.J., Lopez-Llorca L.V. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia* // New Phytologist, 2009, Vol. 182 (1). – P. 213-228.

10. Halleen F., Schroers H.J., Groenewald J.Z., Crous P.W. Novel species of *Cylindrocarpum* (Neonectria) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.) // Studies in Mycology, 2004, Vol. 50. P. 431-455.

11. Sogonov M.V., Velikanov L.L. Soil microfungi from alpine and subnival ecosystems of the Northwestern Caucasus // Mikologiya i Fitopatologiya, 2004, Vol. 38, I. 3. – P. 50-58.

12. Bukharina I., Franken P., Kamasheva A., Vedernikov K. and Islamova N. About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant roots in urban environment // International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR), 2016, Vol. 7, I. 4. – P. 1386-1394.

13. Bukharina I.L., Islamova N.A., Lebedeva M.A. Species of Fungi in the Root System of Woody Plants in Urban Plantations / The fourth International Scientific Conference on Ecology and Geography of Plants and Plant Communities (Ekaterinburg, 16-19 of April 2018). – Ekaterinburg: KnE Life Sciences, 2018. – P. 49-55.

14. Жильцова Ю.В. Зависимость антиоксидантно-прооксидантного равновесия в макрофитах от уровня антропогенной нагрузки // Труды БГУ, 2011, Том 6, часть 2. – С. 47-54.

15. Kumar V., Dwivedi S.K. Hexavalent chromium reduction ability and bioremediation potential of *Aspergillus flavus* CR500 isolated from electroplating wastewater // Chemosphere, 2019, Vol. 237. – P. 124567. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124567.

16. Pietro-Souza W., Campos Pereira F., Mello I.S., Stachack F.F.F. et al. Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi // Chemosphere, 2020, Vol. 240. – P. 124874. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124874.

17. Рахматуллина С.Р. Влияние салициловой кислоты на активность антиоксидантных ферментов и содержание малонового диальдегида у проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. в присутствии меди / Перспективы развития и проблемы современной ботаники: материалы IV (VI) Всероссийской молодежной конференции с участием иностранных ученых (Новосибирск, 8-12 октября 2018 г.). – Новосибирск: Изд-во «Академиздат», 2018. – С. 189-191.

18. Kaznacheeva M.S., Tsebrzhinsky I. Able of contents of malondialdehyde in sorts of plants different on level of stability to the diseases // Bulletin of the Odessa National University. Biologiya, 2011, Vol. 16, № 6(24). – P. 12-17.

19. Бухарина И.Л., Вахрушева Д.А., Латыпова Р.Г. Исследование пределов устойчивости *Rhodotorula mucilaginosa* к действию солей цинка и хрома / Современные проблемы развития техники, экономики и общества: материалы Международной научно-практической заочной конференции (г. Казань, 14 апреля 2016 г.). – Казань: Научно-образовательный центр «Знание», 2016. – С. 35-37.