

Оригинальная статья

УДК 631.4:577.4:502.7:504

<https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-1-20-35>

## СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ *ALTERNARIA ALTERNATA* (FR.) KEISSEL И *FUSARIUM OXYSPORUM* SCHLTDL. ПО ОТНОШЕНИЮ К МЕДИ

В. Д. Волкова<sup>1</sup>, Е. В. Федосеева<sup>2</sup>, В. А. Терехова<sup>1, 2✉</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

<sup>2</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН  
Россия, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33

Поступила в редакцию 10.11.2023 г., после доработки 07.12.2023 г., принята 08.12.2023 г., опубликована 20.03.2024 г.

**Аннотация.** Анализ метаболических и экологических особенностей грибов свидетельствует о высоком биоремедиационном потенциале мицелия. Актуальность решаемых в работе задач обусловлена недостаточной изученностью механизмов и условий активности микромицетов по нейтрализации действия токсичных тяжелых металлов. Проведено сравнение влияния меди на развитие двух видов микромицетов – меланизированной *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., 1912 и гиалинового *Fusarium oxysporum* Schltdl., 1824 на агаризованной питательной среде Чапека (2 и 3% сахарозы), дана оценка способности мицелия сорбировать катионы меди при выращивании в жидкой культуре с 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 мг  $\text{Cu}^{++}$  / л. По показателям скорости роста, толерантности, продукции конидий на среде с  $\text{Cu}^{++}$  *F. oxysporum* имел заметные преимущества. Действующая концентрация меди ( $\text{ЭК}_{50}$ ), свидетельствующая об устойчивости гриба, с повышением содержания сахарозы в среде в 1.5 раза возрастала у *F. oxysporum*. По сорбционной способности меланизированная культура *A. alternata* превосходила *F. oxysporum*. Процент извлечения мицелием грибов  $\text{Cu}^{++}$  из среды достигал 40% при культивировании *F. oxysporum* и вдвое больше при росте *A. alternata*. Подавляющая часть меди сорбируется клеточными стенками гиф и смывается водой. Внутрь клеток мицелия проникает небольшое количество – максимум 0.16 мкг  $\text{Cu}^{++}$  / г сухого мицелия *A. alternata*. *F. oxysporum*, не имеющий внутриклеточных защитных меланинов, накапливал  $\text{Cu}^{++}$  (от 2 до 14 раз) меньше. Результаты показывают, что у исследованных видов механизмы устойчивости к  $\text{Cu}^{++}$  и сорбции различны: у фузариума они определяются в основном барьерными функциями клеточных стенок гиф, а у альтернарии значимую роль в защите от токсического действия играет меланин.

**Ключевые слова:** загрязнение, тяжелые металлы, грибы, мицелий, меланин, толерантность, сорбция, токсичность, эффективные концентрации, ремедиация

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 22-24-00666 «Меланинсодержащие грибы техногенно нарушенных почв: индикация химического загрязнения и биотехнологический потенциал»).

✉ Для корреспонденции. Кафедра земельных ресурсов и оценки почв факультета почвоведения Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

ORCID и e-mail адреса: Волкова Вероника Денисовна: <https://orcid.org/0000-0002-0193-840X>, [v\\_v\\_d\\_2000@mail.ru](mailto:v_v_d_2000@mail.ru); Федосеева Елена Васильевна: <https://orcid.org/0000-0002-4229-7338>, [elenfedoseeva@gmail.com](mailto:elenfedoseeva@gmail.com); Терехова Вера Александровна: <https://orcid.org/0000-0001-9121-639X>, [vtrekhova@gmail.com](mailto:vtrekhova@gmail.com).

## СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ

*Соблюдение этических норм.* Протоколы с использованием животных были одобрены Комиссией по биоэтике Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (протокол № 86 от 06.03.2024 г.).

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования.** Волкова В. Д., Федосеева Е. В., Терехова В. А. Сорбционная активность микромицетов *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. и *Fusarium oxysporum* Schldtl. по отношению к меди // Поволжский экологический журнал. 2024. № 1. С. 20 – 35. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-1-20-35>

### ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) уже много десятилетий остается важной экологической проблемой в силу их высокой токсичности, подвижности и способности к биоаккумуляции. Поиск ее решения, помимо регулирования сокращения техногенного поступления токсичных металлов в природные объекты, ведется и в направлении очистки загрязненных вод и почв. С этой целью разработаны различные подходы для удаления или иммобилизации катионов металлов, снижения их биодоступности. Подавляющая часть ремедиационных приемов основана на физико-химических технологиях с использованием современных материалов, в первую очередь с сорбирующими свойствами. Большое внимание в этом отношении заслуживает биоремедиация. Биоремедиация – это технология, в которой биологические организмы (водоросли, бактерии, грибы и высшие растения) используются для минимизации накопления и вреда загрязнителей окружающей среды (Wang, Chen, 2009; Rathore et al., 2021). Преимущество биоремедиации заключается, прежде всего, в том, что она основана на принципах самоочищения живой природы, и, как правило, при этом отсутствуют вторичные отходы, образующиеся при других способах ремедиации.

Грибы способны снижать экологический риск, связанный с металлами, металлоидами и радионуклидами (Negi, Das, 2023). Царство грибов в ремедиационных технологиях в настоящее время представлено главным образом макромицетами и дрожжами (Солопов и др., 2019; Gnanasalami et al., 2013; Hadi, El-Naas, 2019; Mohebbad et al., 2019).

В качестве многообещающей альтернативной технологии очистки сточных вод и биоремедиации загрязнённых почв в настоящее время рассматривается биосорбция ТМ микромицетами (Скугорева и др., 2019а, б; Harms et al., 2011). Мицелиальная структура и высокая скорость роста гиф в вегетативной стадии развития, низкая специфичность катаболических ферментов и большая степень независимости от природы субстрата, использование загрязняющих веществ для роста, известные метаболические и экологические особенности грибов делают грибы пригодными объектами для биоремедиации (Harms et al., 2011).

Несмотря на хороший ремедиационный потенциал, преобладание живой биомассы в почве и обилие в водных системах, мицелиальные грибы мало используются для биоремедиации таких сред. Причина этого заключается в недостаточной изученности механизмов и условий эффективной активности микромицетов по

нейтрализации действия токсичных ТМ в определенных экологических условиях. Для полного раскрытия биоремедиационного потенциала микромицетов необходимы подробные исследования зависимости ростовых характеристик и сорбционной активности от окружающих условий, в частности, от обилия источников питания и уровня загрязнения среды.

Меланизированные грибы считаются устойчивыми к различным видам негативных воздействий. Пигмент меланин, благодаря своим специфическим свойствам, может играть роль антиоксиданта, антирадиационного, адсорбционного и фотозащитного средства (Gadd, de Rome, 1988; Liu et al., 2022; Terekhova, 2022). Устойчивость грибов, в том числе и меланинсодержащих, во многом определяется факторами окружающей среды, обилием питания (Терехова и др., 2022), в этой связи представляется важным исследовать влияние источника углерода – сахарозы на устойчивость к меди. Гиалиновые формы, не имеющие защитных пигментов, такие как *Fusarium oxysporum*, также обладают способностью сорбировать ТМ (Фокина и др., 2012; Скугорева и др., 2019a). Детальное сравнение развития и сорбционной активности пигментированных и непигментированных видов в идентичных условиях лабораторного эксперимента ранее не проводилось.

Цель данной статьи заключалась в сравнении влияния меди на развитие двух видов микромицетов – представителей пигментированных (альтернария) и апигментных (фузариум) форм, и способности их мицелия сорбировать токсичные катионы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В лабораторных экспериментах использовали чистые культуры двух видов микромицетов – меланин-продуцирующего *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., 1912 и гиалинового *Fusarium oxysporum* Schldl., 1824. Штаммы выделены из пыли (сборы седиментов – оседающей из воздуха пыли) в г. Москве летом 2022 г. Медь в форме раствора  $\text{CuSO}_4$  использовали для моделирования загрязнения среды роста микромицетов.

Влияние меди на ростовые характеристики микромицетов изучали в двух сериях экспериментов – на твердой (агаризованной) и на жидкой среде Чапека.

На агаризованной питательной среде Чапека грибы культивировали с содержанием сахарозы 2 и 3%. Сульфат меди вносили в охлажденную среду, создавая методом кратных разведений токсиканта градиент концентраций 0, 10, 25, 50, 100 мг/л в пересчете на ионы  $\text{Cu}^{++}$ . Посев мицелия на чашки Петри осуществляли дисками ( $d = 9$  мм), вырезанными из колоний маточной культуры микробиологическим сверлом. Кинетические показатели скорости роста колоний и толерантность к меди оценивали по изменению диаметра колоний, который фиксировали с помощью линейки на 3-и и 5-е сутки. Эксперимент проводили в 5 повторностях.

Интенсивность спороношения грибных колоний рассчитывали по продукции конидий на  $\text{мм}^2$ . Для этого вырезали три равных участка агаризованной среды со спороносным мицелием от центра к краю колонии микробиологическим сверлом. Вырезанные участки помещали в 6 мл дистиллированной воды, встряхивали для

## СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ

получения суспензии спор и проводили подсчет числа спор с помощью камеры Горяева.

При исследовании влияния меди на микромицеты в жидкой среде в колбы со стерильной средой Чапека объемом 100 мл добавляли раствор меди до достижения концентраций  $\text{Cu}^{2+}$  0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 мг/л и вносили инокулят в объеме 1 мл, представляющий собой суспензию спор грибов плотностью  $10^6$  ед/мл. Суспензию спор получали смывом стерильной дистиллированной водой с 10 – 14-суточного мицелия, выращенного на агаре Чапека. Колбы помещали на шейкер для наращивания грибной биомассы при скорости вращения 120 об./мин. По истечении 7 сут. биомассу мицелия отделяли от культуральной жидкости фильтрованием и многократно промывали проточной водой. Тщательно промытый мицелий подсушивали между слоями фильтровальной бумаги, а затем сушили при 60°C до постоянного веса, взвешивали. Сухой мицелий передавали на определение содержания меди (ООО «МГУЛАБ», <https://www.msulab.ru>). Эксперименты проводили в 3 повторностях.

Контрольными вариантами служили питательные среды без добавления меди.

Количественный химический анализ проводили с целью определения содержания меди в культуральной жидкости после извлечения мицелия и накопления токсичных катионов в сухой мицелиальной биомассе.

Для определения содержания меди в культуральной жидкости и мицелии была проведена подготовка проб согласно ГОСТ Р 15587-2. Анализ содержания меди в пробах проводили методом ИСП-ОЭС на спектрометре Agilent 5110 (Agilent Technologies, США). Минерализацию жидких проб проводили по ГОСТ Р 15587-2 на плитке, брали аликвоту 15 мл и добавляли 4 мл концентрированной азотной кислоты, после окончания процедуры переносили в мерную колбу на 25 мл.

Минерализацию твердых проб (сухая биомасса грибов) проводили следующим образом: перетертый мицелий полностью (предварительно взвесив) помещали в стеклянный стакан, поливали 10 мл концентрированной азотной кислоты, накрывали часовым стеклом и ставили на плитку 120°C, спустя 2 ч стаканы снимали с плитки, остужали и прибавляли по 1 мл перекиси водорода, после чего стаканы возвращали на плитку еще на час. Спустя час стаканы снимали, остужали и содержимое переносили в мерные колбы на 25 мл.

Для оценки степени безопасности культуральной жидкости после извлечения мицелия из среды роста с остаточным содержанием меди проводили биотестирование стандартными методами в трех тест-системах.

Для биотестирования культуральной жидкости с помощью высших растений использовали метод «Фитоскан» (ФР.1.31.2012.11560), согласно которому сравнивали длину корней тест-растения горчицы белой *Sinapis alba* в опытных и контрольном вариантах, при проращивании семян в прозрачных пластиковых двухкамерных планшетах на фильтровальной бумаге, увлажненной исследуемой жидкостью (Николаева, Терехова, 2017). Измерения длины корня проводили через 120 ч. В качестве контроля к исследуемой жидкости использовали дистиллированную воду.

Для определения острой токсичности культуральной жидкости по реакции культуры гидробионтов применяли методику оценки выживаемости дафний *Daphnia magna* через 24 и 48 ч (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.9-06). В качестве контроля использовали культивационную воду. Эксперимент проводился в 3 повторностях.

Анализ культуральной жидкости по реакции бактерий проводили по измерению интенсивности биолюминесценции препарата бактерий, согласно методике (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04). Опыты имели трехкратную повторность.

Для расчёта эффективных (действующих) концентраций катионов меди – ЭК<sub>10,50,90</sub> – применяли пробитный анализ. Индекс толерантности грибов рассчитывали по уравнению: ИТ = показатель роста при обработке ТМ / показатель роста без обработки ТМ. Значения ИТ ранжируют следующим образом: 0.00 – 0.39 – очень низкая устойчивость к металлу; 0.40 – 0.59 – низкая металлостойкость; 0.60 – 0.79 – умеренная металлостойкость; 0.80 – 0.99 – высокая металлостойкость; 1.00 – >1.00 – очень высокая устойчивость к металлу.

*Статистическая обработка результатов.* Эксперименты проводили в 3 – 5 повторностях с расчётом средних арифметических и стандартных отклонений. Достоверность различий между вариантами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и попарного множественного сравнения (тест Тьюки). С помощью пробитного анализа рассчитывали эффективные концентрации (ЭК) Cu (мг/л).

Все расчеты проводились в статистических программах R (The R foundation) и ExcelStat (Microsoft Corp.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

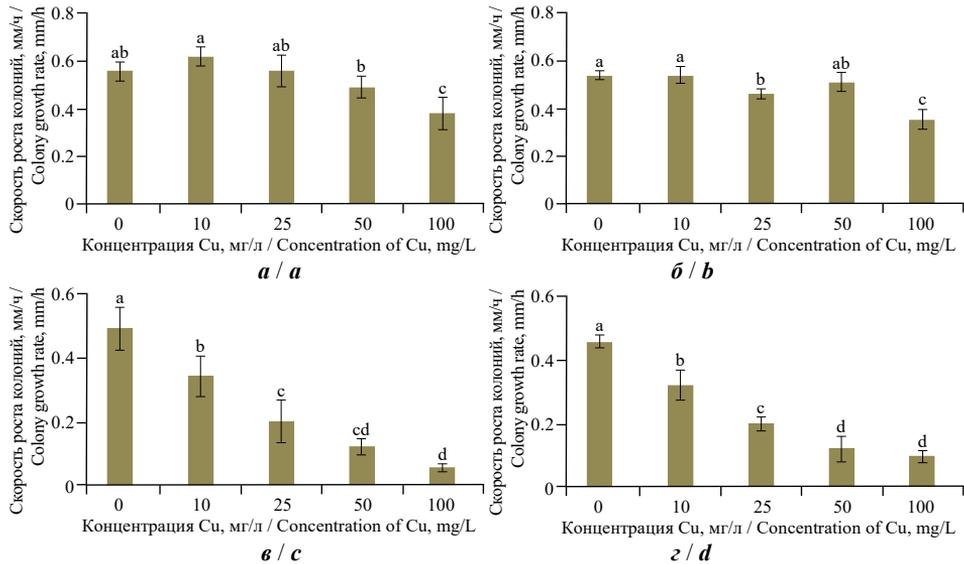
**Развитие грибных колоний в зависимости от содержания меди в среде Чапека при разном содержании сахарозы.** Добавление меди к среде роста исследуемых видов микромицетов вызвало изменение как ростовых характеристик колоний, так и их морфологии. Изменения культурально-морфологических признаков колоний в большей степени были выражены у *A. alternata*, чем у *F. oxysporum*. В условиях стресса, вызванного действием меди, у *A. alternata* формировались компактные колонии с плотной спороносной поверхностью. У *F. oxysporum* морфологические изменения были выражены в меньшей степени и касались главным образом появления слегка зеленоватого оттенка у мицелия при высоких дозах меди.

**Влияние меди на скорость роста колоний.** Надо отметить, что в контрольных вариантах (среда без добавления меди) скорость роста *F. oxysporum* ( $0.55 \pm 0.02$  –  $0.56 \pm 0.04$  мм/ч) выше скорости роста *A. alternata* ( $0.46 \pm 0.02$  –  $0.50 \pm 0.07$  мм/ч) (рис. 1).

При внесении меди в среду рост *F. oxysporum* замедляется лишь при наибольшей концентрации меди – 100 мг/л (см. рис. 1, а, б), рост *A. alternata* начинает значимо замедляться уже при наименьшей из испытанных концентраций меди – 10 мг/л (см. рис. 1, в, г).

**Оценка толерантности микромицетов к меди.** Расчеты индекса толерантности подчеркнули различия между видами. Исходя из значений ИТ (табл. 1), гриб *A. alternata* можно отнести к умеренно устойчивым к действию меди при минимальной исследуемой концентрации.

## СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ



**Рис. 1.** Скорость роста микромицетов в зависимости от содержания меди и сахарозы в агаризованной среде Чапека: *a* – *F. oxysporum*, сахароза 2%; *б* – *F. oxysporum*, сахароза 3%; *в* – *A. alternata*, сахароза 2%; *г* – *A. alternata*, сахароза 3%. Среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ); величины с разными буквами различаются значимо ( $p \leq 0.05$ ) для каждого показателя отдельно ( $p \leq 0.05$ , критерий Тьюки)

**Fig. 1.** Growth rate of micromycetes depending on copper and sucrose content in Czapek agar: *a* – *F. oxysporum*, sucrose 2%; *b* – *F. oxysporum*, sucrose 3%; *c* – *A. alternata*, sucrose 2%; *d* – *A. alternata*, sucrose 3%. Mean  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ) values are given; values with different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ) for each parameter ( $p \leq 0.05$ , the Tukey criterion)

Гриб *F. oxysporum* можно отнести к высокоустойчивым к действию меди при всех исследуемых концентрациях, кроме самой высокой из испытанных – 100 мг/л (см. табл. 1). Высокие значения ИТ у *F. oxysporum*, возможно, определяются более высокой скоростью роста колоний и отличным от *A. alternata* характером реакции на стресс, вызванным действием меди.

**Таблица 1.** Индексы толерантности *A. alternata* и *F. oxysporum* к действию меди при разном содержании сахарозы

**Table 1.** Tolerance indices of *A. alternata* and *F. oxysporum* to copper at several sucrose contents

Концентрация меди, мг/л / Copper concentration, mg/L	Гриб / Fungi			
	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
	2% сахарозы / 2% sucrose	3% сахарозы / 3% sucrose	2% сахарозы / 2% sucrose	3% сахарозы / 3% sucrose
10	0.70	0.70	1.09	1.00
25	0.41	0.43	1.01	0.85
50	0.25	0.26	0.87	0.94
100	0.12	0.21	0.68	0.65

На степень толерантности микромицетов к меди повлияло содержание сахарозы в среде роста. Различия в значениях ИТ при разном содержании сахарозы проявляются при наибольшей концентрации меди в среде. При большем содержании сахарозы ИТ несколько выше (0.21), чем ИТ при меньшем содержании сахарозы (0.12).

Сравнение эффективных (действующих) концентраций (ЭК) меди в среде роста колоний разных видов выявило большие различия. Для ингибирования скорости роста *F. oxysporum* на 50%, как свидетельствует ЭК<sub>50</sub>, требуется больше меди, чем для аналогичного уровня подавления развития колоний *A. alternata* (табл. 2).

**Таблица 2.** Эффективные концентрации Cu, отражающие 50, 30 и 10% ингибирование скорости роста колоний микромицетов *A. alternata* и *F. oxysporum* в среде Чапека при разном содержании сахарозы

**Table 2.** Effective concentrations (EC) of Cu reflecting 50, 30 and 10% inhibition of the growth rate of colonies of the micromycetes *A. alternata* and *F. oxysporum* in Chapek's medium at several sucrose contents

ЭК, мг/л / EC, mg/L	Гриб / Fungi			
	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
	2% сахарозы / 2% sucrose	3% сахарозы / 3% sucrose	2% сахарозы / 2% sucrose	3% сахарозы / 3% sucrose
EC <sub>10</sub>	3.4	2.6	51.8	27.26
EC <sub>30</sub>	9.7	8.7	91.2	137.1
EC <sub>50</sub>	19.7	21.0	134.0	415.0

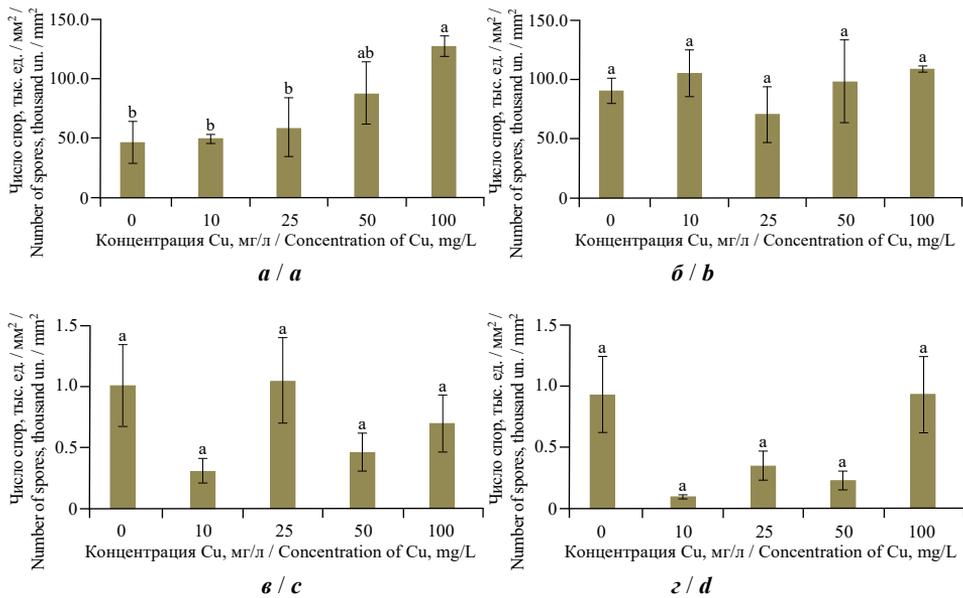
Интересно, что и по этому показателю дистанция различий зависела от содержания сахарозы в среде роста. В варианте с сахарозой 2% полуэффективные концентрации меди составляли 19.7 и 134.0 мг/л для *F. oxysporum* и *A. alternata* соответственно, т.е. различия в 6.8 раз, в то время как при сахарозе 3% концентрация, подавляющая рост *F. oxysporum*, ЭК<sub>50</sub> (415.0 мг/л) в 19.8 раз больше, чем для *A. alternata* ЭК<sub>50</sub> (21.0 мг/л) (см. табл. 2).

Таким образом, повышение в среде роста содержания сахарозы в 1.5 раза многократно повышает устойчивость гриба *F. oxysporum* к воздействию меди.

**Влияние меди на спороношение грибов.** Обильное спорообразование и высокая скорость роста характеризуют *F. oxysporum* как вид с *r*-стратегией, а менее интенсивное спорообразование, формирование муральных многоклеточных конидий с защитным меланиновым пигментом, свойственных *A. alternata*, в большей степени характерно для видов с *K*-стратегией. В среде без добавления меди (в контрольных вариантах) интенсивность спорообразования у *F. oxysporum* значительно выше, чем у *A. alternata*, что можно объяснить разными жизненными стратегиями этих видов (рис. 2).

Закономерности в действии меди на спороношение проявлялись у *F. oxysporum* и то лишь при определенных условиях, в частности, при меньшем содержании источника углеродного питания. При внесении меди наблюдалось повышение спорообразования у *F. oxysporum* в вариантах с меньшим количеством сахарозы (см. рис. 2, а). При увеличении же содержания в среде сахарозы до 3% выраженная

## СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ



**Рис. 2.** Активность спороношения микромицетов в зависимости от содержания меди и сахара в среде роста: *a* – *F. oxysporum*, сахара 2%; *b* – *F. oxysporum*, сахара 3%; *в* – *A. alternata*, сахара 2%; *г* – *A. alternata*, сахара 3%. Среднее ± стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ); величины с разными буквами различаются значимо ( $p \leq 0.05$ ) для каждого показателя отдельно ( $p \leq 0.05$ , критерий Тьюки)

**Fig. 2.** Sporulation activity of micromycetes depending on the copper and sucrose content in the growth medium: *a* – *F. oxysporum*, sucrose 2%; *b* – *F. oxysporum*, sucrose 3%; *c* – *A. alternata*, sucrose 2%; *d* – *A. alternata*, sucrose 3%. Mean ± standard error ( $n = 3$ ) values are given; values with different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ) for each parameter ( $p \leq 0.05$ , the Tukey criterion)

стимуляция спорообразования не наблюдалась, но и не прослеживался угнетающий эффект (см. рис. 2, б).

У *A. alternata* не удалось оценить зависимость интенсивности спороношения от содержания меди в среде в исследованном диапазоне концентраций токсиканта, во всех вариантах значения значимо не различаются (см. рис. 2, в, г).

**Оценка токсичности среды роста грибов с медью в стандартных тест-системах.** Предпринята попытка оценить эффективность сорбции токсиканта мицелием двух видов микромицетов после 7-суточного выращивания чистых культур грибов в жидкой среде с медью.

Оценку сорбции токсиканта можно проводить опосредованным способом – на основании изменений экотоксичности культуральной жидкости (среды роста грибов) после извлечения мицелия и путем непосредственного измерения остаточного содержания меди.

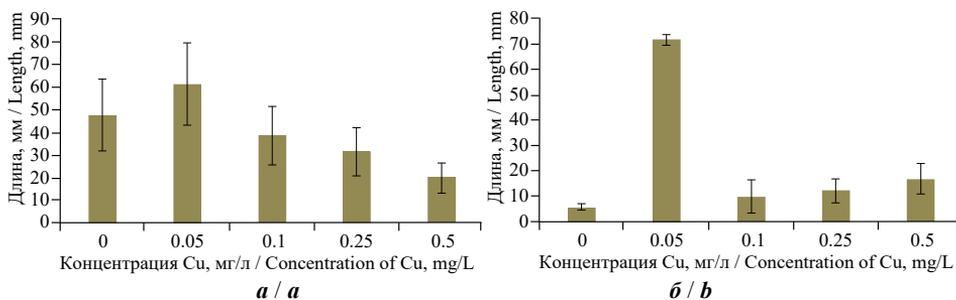
Для оценки токсичности культуральной жидкости использовали стандартизованные тест-системы на основе бактерий, ракообразных и высших растений.

**Бактериальный биосенсор.** Интенсивность биолюминесценции бактериального биосенсора под действием культуральной жидкости грибов возрастала, что свидетельствует об увеличении численности бактерий. Максимальные значения биолюминесценции зафиксированы при анализе культуральной жидкости обоих видов грибов при наличии в среде 0.05 мг Cu/л (Волкова и др., 2023). На бактериальный биосенсор не оказывало токсического влияния остаточное после сорбции мицелием содержание меди. Можно предположить, что при умеренном загрязнении воды тяжелыми металлами, в частности медью, бактериально-грибная ассоциация может представлять эффективный агент микробной биоремедиации, способный снижать содержание поллютантов путем биосорбции или биodeградации.

**Беспозвоночные гидробионты *Daphnia magna*.** Профильтрованная питательная среда роста грибов после извлечения мицелия (культуральная жидкость) с добавлением меди не оказывала выраженной токсичности в первые двое суток инкубации в них дафний. Практически во всех вариантах их выживаемость была выше 80%. В последующие сутки наблюдение за рачками показало, что развивающийся из мелких фрагментов гиф мицелий механически ограничивает движение и питание рачков. В таких случаях оценить собственно токсичность водных сред не представляется возможным.

**Высшие растения.** Фитотестирование опытных вариантов культуральной жидкости показало зависимость длины корней проростков *S. alba* от содержания меди в исходной среде Чапека. При 0.05 мгCu/л наблюдалась небольшая стимуляция роста корней. Такое стимулирующее действие умеренных доз стрессоров, называемое гормезисом, встречается нередко (рис. 3).

С увеличением содержания меди в среде развития обоих видов закономерно увеличивалась степень угнетения роста корней тест-растения. Культуральная жидкость после выращивания *A. alternata* оказала большее ингибирующее воздействие, чем после роста *F. oxysporum*, что, возможно, связано со стимуляцией медью образования микотоксинов как дополнительного фактора угнетения растений



**Рис. 3.** Длина корней *Sinapis alba* (среднее и стандартное отклонение) в образцах культуральной жидкости после выращивания мицелия в среде Чапека без и в присутствии катионов меди (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 мг/л): а – *F. oxysporum*, б – *A. alternata*

**Fig. 3.** *Sinapis alba* root length (mean and standard deviation) in culture liquid samples after mycelium growth in Czapek agar in the absence and in the presence of copper cations (0, 0.05, 0.1, 0.25, and 0.5 mg/l): a – *F. oxysporum*, b – *A. alternata*

## СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ

(Cuero, Ouellet, 2005). Культуральная жидкость после выращивания *A. alternata* оказала большее ингибирующее воздействие, чем после роста *F. oxysporum* (см. рис. 3).

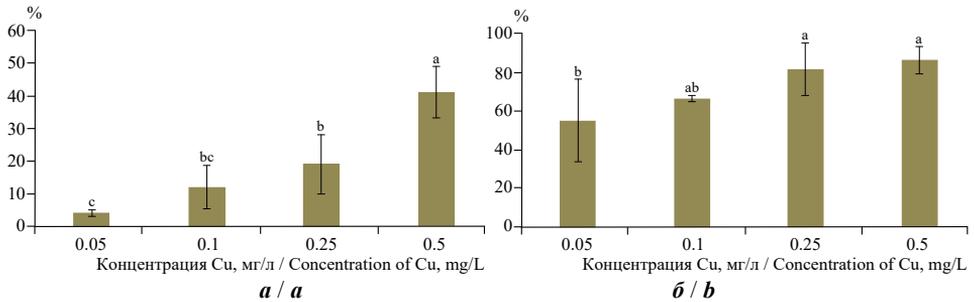
*Химический анализ содержания меди.* Количественный химический анализ содержания катионов меди в культуральной жидкости показал заметное снижение концентрации токсиканта после роста и *A. alternata* и *F. oxysporum* (табл. 3).

**Таблица 3.** Содержание катионов меди в среде Чапека и в культуральной жидкости после извлечения 7-суточного мицелия

**Table 3.** Copper cation content in Czapek agar and in the culture fluid, after extraction of the 7-day-old mycelium

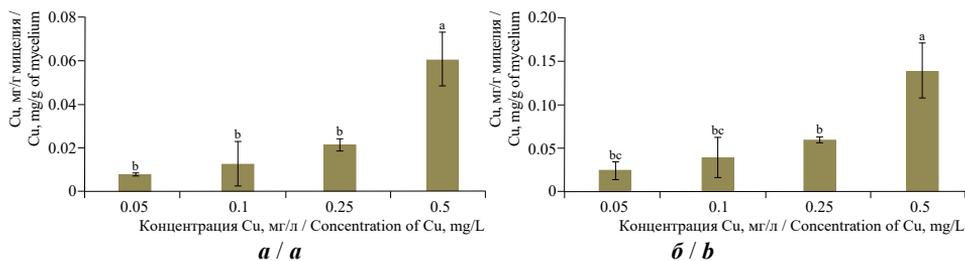
Концентрация Cu <sup>++</sup> в исходной среде Чапека, мг/л / Cu <sup>2+</sup> concentration in the initial Czapek agar, mg/L	Концентрация Cu <sup>++</sup> в культуральной жидкости после извлечения 7-суточного мицелия микромицетов, мг/л / Cu <sup>2+</sup> concentration in the culture liquid after extraction of the 7-day-old mycelium of micromycetes, mg/L	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
0.05	0.048±0.014	0.023±0.008
0.1	0.088±0.029	0.034±0.001
0.25	0.203±0.023	0.046±0.015
0.5	0.294±0.039	0.068±0.023

Остаточное содержание меди в культуральной жидкости свидетельствует о высокой сорбционной способности грибного мицелия обоих видов. Процент извлечения меди с мицелием микромицетов достигал 40% при культивировании *F. oxysporum* и вдвое больше при росте *A. alternata* (рис. 4).



**Рис. 4.** Влияние мицелия *F. oxysporum* (а) и *A. alternata* (б) на содержание меди в культуральной жидкости после извлечения грибной биомассы в вариантах жидкой среды Чапека с 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 мг Cu /л (% от исходной концентрации меди). Среднее ± стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ); величины с разными буквами различаются значимо ( $p \leq 0.05$ ) для каждого показателя отдельно ( $p \leq 0.05$ , критерий Тьюки)

**Fig. 4.** Effect of the mycelium of *F. oxysporum* (a) and *A. alternata* (b) on the copper content in the culture liquid after extraction of fungal biomass in options of Czapek's liquid medium with 0.05, 0.1, 0.25, and 0.5 mg Cu /L (% of initial copper concentration). Mean ± standard error ( $n = 3$ ) values are given; values with different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ) for each parameter ( $p \leq 0.05$ , the Tukey criterion)



**Рис. 5.** Содержание  $\text{Cu}^{++}$  в мицелии микромицетов в среде Чапека без и в присутствии катионов меди (0,05, 0,1, 0,25, 0,5 мг/л): а – *F. oxysporum*, б – *A. alternata*. Среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ); величины с разными буквами различаются значимо ( $p \leq 0,05$ ) для каждого показателя отдельно ( $p \leq 0,05$ , критерий Тьюки)

**Fig. 5.**  $\text{Cu}^{2+}$  content in the mycelium of micromycetes in Czapek agar in the absence and in the presence of copper cations (0.05, 0.1, 0.25, and 0.5 mg/l): а – *F. oxysporum*, б – *A. alternata*. Mean  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ) values are given; values with different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ) for each parameter ( $p \leq 0.05$ , the Tukey criterion)

Результаты свидетельствуют о различиях в сорбционной способности двух видов микромицетов. На каждом из четырех уровней загрязнения медью (0,05, 0,1, 0,25, 0,5 мг Cu/л) после роста мицелия альтернэрии катионов меди было заметно меньше, по сравнению с фузариумом. С нарастанием дозовой нагрузки медью среды культивирования эти различия сокращались, тем не менее, даже при самой высокой концентрации 0,5 мг Cu /л сорбционная активность *A. alternata* в два раза превосходит таковую у *F. oxysporum*.

Оценка содержания катионов  $\text{Cu}^{++}$ , непосредственно в биомассе мицелия, показала, что лишь очень небольшое количество меди поступило внутрь клеток мицелия (рис. 5).

Основная масса извлеченной меди была сорбирована на гифах мицелия, а при тщательном многократном промывании водой отделялась от мицелия. Мицелий *A. alternata* при росте на средах с разным содержанием меди во всех вариантах заметно (от 2 до 14 раз) превосходил *F. oxysporum* по способности накапливать внутри клеток  $\text{Cu}^{++}$  (см. рис. 5).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ метаболических и экологических особенностей грибов, результаты экспериментальных исследований, в том числе и полученные нами, позволяют сделать вывод о высоком биоремедиационном потенциале микромицетов. Грибы рода *Fusarium* рекомендованы в качестве основы сорбента тяжелых металлов (Фокина и др., 2012; Скугорева и др., 2019б). В нашей работе показан высокий процент извлечения меди микромицетами *F. oxysporum* и *A. alternata* из среды культивирования. Механизм снижения содержания поллютантов с участием грибов может реализовываться путем биосорбции или биодеградации, или при их сочетании.

## СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ

Как показывают данные с вариациями содержания сахарозы, условия среды существенным образом влияют на сорбционную способность как меланизированных, так и гиалиновых форм микромицетов.

Различия в жизненных стратегиях двух видов, проявившиеся в разной скорости роста, спороношении, толерантности к меди, отражаются и на способности сорбировать медь из среды роста. Мицелий меланинсодержащего микромицета альтернэрии накапливает в несколько раз больше  $\text{Cu}^{++}$ , чем гиалиновый мицелий фузариума. Это дает основание говорить о том, что защитные механизмы фузариума включаются, вероятно, на первых этапах взаимодействия живых клеток мицелия с катионами меди, отсюда и повышенная толерантность, и устойчивый рост колоний, и возможные периферические барьеры по типу клеточных стенок на пути проникновения  $\text{Cu}^{++}$  в клетки мицелия, в которых нет меланиновых защитных пигментов. *A. alternata*, имеющая меланиновые пигменты, способна накапливать большее количество катионов меди внутри клеток, которые в определенных пределах не оказывают токсического действия на метаболизм, а нормально функционирующие гифы мицелия способны сорбировать много  $\text{Cu}^{++}$  на поверхности клеточных стенок грибов.

Положительное воздействие культуральной жидкости микромицетов на бактериальную культуру свидетельствует о том, что бактериально-грибная ассоциация может быть эффективным агентом микробной биоремедиации.

*Авторы благодарят кандидата биологических наук А. Е. Иванову за предоставление штаммов из коллекции кафедры биологии почв факультета почвоведения Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, кандидата биологических наук М. М. Карпущина за помощь при проведении химического анализа содержания меди.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Волкова В. Д., Федосеева Е. В., Терехова В. А. Влияние метаболитов микромицетов *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum* на бактериальную активность в водной среде при загрязнении медью // Экология речных бассейнов: Труды 11-й Международной научно-практической конференции. Владимир: Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, 2023. С. 316 – 320.

Николаева О. В., Терехова В. А. Совершенствование лабораторного фитотестирования для экотоксикологической оценки почв // Почвоведение. 2017. № 9. С. 1141 – 1152. <https://doi.org/10.7868/S0032180X17090052>

Скугорева С. Г., Кантор Л. И., Домрачева Л. И. Биосорбция тяжёлых металлов микромицетами: особенности процесса, механизмы, кинетика // Теоретическая и прикладная экология. 2019а. № 2. С. 14 – 31. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-2-014-031>

Скугорева С. Г., Кантор Г. Я., Домрачева Л. И., Шешегова Т. К. Оценка сорбционных способностей различных видов микромицетов рода *Fusarium* по отношению к ионам тяжёлых металлов // Теоретическая и прикладная экология. 2019б. № 4. С. 102 – 109. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-103-109>

Солопов М. В., Легенький Ю. А., Беспалова С. В., Холявка М. Г. Биосорбция ионов тяжёлых металлов дрожжевыми клетками, модифицированными наночастицами магнетита // Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2019. № 1. С. 96 – 102.

Терехова В. А., Федосеева Е. В., Волкова В. Д., Иванова А. Е., Якименко О. С. Меланин-содержащие микромицеты в почвах и органических отходах // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 4. С. 204 – 213. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-4-204-213>

Фокина А. И., Злобин С. С., Домрачева Л. И., Трефилова Л. В. Свойства некоторых видов грибов р. *Fusarium* – основа для создания биосорбента тяжелых металлов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2012. № 2. С. 49 – 52.

Cuero R., Ouellet T. Metal ions modulate gene expression and accumulation of the mycotoxins aflatoxin and zearalenone // Journal of Applied Microbiology. 2005. Vol. 98, iss. 3. P. 598 – 605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02492.x>

Gadd G. M., de Rome L. Biosorption of copper by fungal melanin // Applied Microbiology and Biotechnology. 1988. Vol. 29. P. 610 – 617.

Gnanasalami V. D. V., Jebapriya G. R., Gnanadoss J. J. Bioremediation of hazardous pollutants using fungi // International Journal of Computing Algorithm. 2013. Vol. 2, iss. 2. P. 93 – 96.

Hadi B., El-Naas M. H. Biosorption of heavy metals: Potential and applications of yeast cells for cadmium removal // Environmental Contaminants: Ecological Implications and Management. Microorganisms for Sustainability / ed. R. Bharagava. Singapore: Springer, 2019. Vol. 14. P. 237 – 271. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7904-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7904-8_11)

Harms H., Schlosser D., Wick L. Y. Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals // Nature Reviews Microbiology. 2011. Vol. 9, iss. 3. P. 177 – 192. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2519>

Liu R., Meng X., Mo C., Wei X., Ma A. Melanin of fungi: From classification to application // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2022. Vol. 38, № 12. Article number 228. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03415-0>

Mohebbad B., Bonyadi Z., Dehghan A. A., Rahmat M. H. Arsenic removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetic and equilibrium study // Environmental Progress & Sustainable Energy. 2019. Vol. 38, special iss. 1. P. 398 – 402. <https://doi.org/10.1002/ep.13074>

Negi B. B., Das C. Mycoremediation of wastewater, challenges, and current status: A review // Bioresource Technology Reports. 2023. Vol. 22. Article number 101409. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101409>

Rathore D., Dubey R., Dwivedi A. Advances in mycoremediation of emerging potential toxic effluents // Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-Technology. London: Academic Press, 2021. Vol. 2. P. 301 – 329. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821925-6.00014-9>

Terekhova V. A. Biotesting of soil ecotoxicity in case of chemical contamination: Modern approaches to integration for environmental assessment (a review) // Eurasian Soil Science. 2022. Vol. 55, № 5. P. 601 – 612. <https://doi.org/10.1134/S106422932205009>

Wang J. L., Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future // Biotechnology Advances. 2009. Vol. 27, iss. 2. P. 195 – 226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>

## Copper ion sorption ability of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. and *Fusarium oxysporum* Schltdl. micromycetes

V. D. Volkova<sup>1</sup>, E. V. Fedoseeva<sup>2</sup>, V. A. Terekhova<sup>1, 2✉</sup>

<sup>1</sup> Moscow Lomonosov State University

12 korp., 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia

<sup>2</sup> A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences

33 Leninsky Prospekt, Moscow 119071, Russia

Received: November 10, 2023 / revised: December 7, 2023 / accepted: December 8, 2023 / published: March 20, 2024

**Abstract.** Our analysis of metabolic and ecological features of fungi indicates a high bioremediation potential of fungal mycelium. The relevance of the problems solved in this work is conditioned by insufficiently studied mechanisms and conditions of micromycetal activity on heavy metal detoxication. The effect of copper on the development of two micromycete species, namely, melanised *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., 1912 and hyaline *Fusarium oxysporum* Schltdl., 1824 cultivated on Czapek agar (with 2 or 3% sucrose) was compared; the ability of mycelium to sorb copper cations when grown in a liquid culture with 0, 0.05, 0.1, 0.25, and 0.5 mg Cu<sup>2+</sup> / L was evaluated. *F. oxysporum* had noticeable advantages in terms of growth rate, tolerance, conidia production on medium with Cu<sup>2+</sup>. The effective concentration of copper (EC<sub>50</sub>), indicating the resistance of the fungus, increased for *F. oxysporum* by 1.5 times with increasing sucrose content in the medium. The melanised culture of *A. alternata* was superior to *F. oxysporum* in terms of sorption capacity. The percentage of Cu<sup>2+</sup> extraction by fungal mycelium from the medium reached 40% in the case of *F. oxysporum* and twice as much in the case of *A. alternata*. The vast majority of copper was sorbed by the cell walls of hyphae and washed away by water. A small amount (a maximum of 0.16 µg Cu<sup>2+</sup> / g dry mycelium of *A. alternata*) penetrated inside the mycelial cells. *F. oxysporum*, which had no intracellular protective melanins, accumulated Cu<sup>2+</sup> (2 to 14 times) less. The results show that the mechanisms of resistance to Cu<sup>2+</sup> and sorption are different in the studied species: in *Fusarium* they are determined mainly by the barrier functions of hyphae cell walls, while in *Alternaria* melanin plays a significant role in protection against Cu toxic action.

**Keywords:** pollution, heavy metals, fungi, mycelium, melanin, tolerance, sorption, toxicity, effective concentrations, remediation

**Funding.** This work was financially supported by the Russian Science Foundation (Project 22-24-00666 “Melanin-containing fungi of technogenically disturbed soils: Indication of chemical pollution and biotechnological potential”).

*Ethics approval and consent to participate:* Animal protocols were approved by the Bioethics Commission of A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 86 dated March 6, 2024).

*Competing interests:* The authors have declared that no competing interests exist.

✉ *Corresponding author.* Department of Land Resources and Soil Assessment, Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Russia.

*ORCID and e-mail addresses:* Veronika D. Volkova: <https://orcid.org/0000-0002-0193-840X>, [v\\_v\\_d\\_2000@mail.ru](mailto:v_v_d_2000@mail.ru); Elena V. Fedoseeva: <https://orcid.org/0000-0002-4229-7338>, [elenfedoseeva@gmail.com](mailto:elenfedoseeva@gmail.com); Vera A. Terekhova: <https://orcid.org/0000-0001-9121-639X>, [vterekhova@gmail.com](mailto:vterekhova@gmail.com).

**For citation:** Volkova V. D., Fedoseeva E. V., Terekhova V. A. Copper ion sorption ability of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. and *Fusarium oxysporum* Schldt. micromycetes. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2024, no. 1, pp. 20–35 (in Russian). <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-1-20-35>

## REFERENCES

Volkova V. D., Fedoseeva E. V., Terekhova V. A. Influence of metabolites micromycetes *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* on bacterial activity in the aquatic environment under copper pollution. In: *Ecology of the Rivers Basins: Proceedings of the XI International Scientific Conference*. Vladimir, Vladimir State University named after Alexander and Nikolay Stoletovs, 2023, pp. 316–320 (in Russian).

Nikolaeva O. V., Terekhova V. A. Improvement of laboratory phytotest for the ecological evaluation of soils. *Eurasian Soil Science*, 2017, vol. 50, no. 9, pp. 1105–1114. <https://doi.org/10.1134/S1064229317090058>

Skugoreva S. G., Kantor G. Ya., Domracheva L. I. Biosorption of heavy metals by micromycetes: Specificity of the process, mechanisms, kinetics. *Theoretical and Applied Ecology*, 2019a, no. 2, pp. 14–31 (in Russian). <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-2-014-031>

Skugoreva S. G., Kantor G. Ya., Domracheva L. I., Sheshegova T. K. Assessment of sorption abilities of various species of *Fusarium* micromycetes in relation to heavy metal ions. *Theoretical and Applied Ecology*, 2019b, no. 4, pp. 102–109 (in Russian). <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-103-109>

Solopov M. V., Legenkiy Yu. A., Bespalova S. V., Holyavka M. G. Biosorption of heavy metals ions by yeast cells modified with magnetite nanoparticles. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2019, no. 1, pp. 96–102 (in Russian).

Terekhova V. A., Fedoseeva E. V., Volkova V. D., Ivanova A. E., Yakimenko O. S. Melanin-containing micromycetes in soils and organic waste. *Theoretical and Applied Ecology*, 2022, no. 4, pp. 204–213 (in Russian). <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-4-204-213>

Fokina A. I., Zlobin S. S., Domracheva L. I., Trefilova L. V. Properties of some species of fungi r. *Fusarium* as a basis for the creation of biosorbent of heavy metals. *Bulletin of Altai State Agricultural University*, 2012, no. 2, pp. 49–52 (in Russian).

Cuero R., Ouellet T. Metal ions modulate gene expression and accumulation of the mycotoxins aflatoxin and zearalenone. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, vol. 98, iss. 3, pp. 598–605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02492.x>

Gadd G. M., de Rome L. Biosorption of copper by fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1988, vol. 29, pp. 610–617.

Gnanasalomi V. D. V., Jebapriya G. R., Gnanadoss J. J. Bioremediation of hazardous pollutants using fungi. *International Journal of Computing Algorithm*, 2013, vol. 2, iss. 2, pp. 93–96.

Hadi B., El-Naas M. H. Biosorption of heavy metals: Potential and applications of yeast cells for cadmium removal. In: Bharagava R., ed. *Environmental Contaminants: Ecological Implications and Management. Microorganisms for Sustainability*. Singapore, Springer, 2019, vol. 14, pp. 237–271. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7904-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7904-8_11)

Harms H., Schlosser D., Wick L. Y. Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, vol. 9, iss. 3, pp. 177–192. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2519>

Liu R., Meng X., Mo C., Wei X., Ma A. Melanin of fungi: From classification to application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, vol. 38, no. 12, article no. 228. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03415-0>

## СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ

Mohebbad B., Bonyadi Z., Dehghan A. A., Rahmat M. H. Arsenic removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetic and equilibrium study. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 2019, vol. 38, spec. iss. 1, pp. 398–402. <https://doi.org/10.1002/ep.13074>

Negi B. B., Das C. Mycoremediation of wastewater, challenges, and current status: A review. *Bioresource Technology Reports*, 2023, vol. 22, article no. 101409. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101409>

Rathore D., Dubey R., Dwivedi A. Advances in mycoremediation of emerging potential toxic effluents. In: *Fungi Bio-Prospect in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-Technology*. London, Academic Press, 2021, vol. 2, pp. 301–329. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821925-6.00014-9>

Terekhova V. A. Biotesting of soil ecotoxicity in case of chemical contamination: Modern approaches to integration for environmental assessment (a review). *Eurasian Soil Science*, 2022, vol. 55, no. 5, pp. 601–612. <https://doi.org/10.1134/S106422932205009>

Wang J. L., Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 2009, vol. 27, iss. 2, pp. 195–226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>