

## Устойчивость и активность фитопатогенных и потенциально антагонистических почвенных мицелиальных грибов при действии тяжелых металлов

Е. В. ФЕДОСЕЕВА<sup>1</sup>, Ю. Д. СЕРГЕЕВА<sup>2</sup>, В. Д. ВОЛКОВА<sup>2</sup>, Д. И. СТОМ<sup>3, 4</sup>, В. А. ТЕРЕХОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН  
119071, Москва, Ленинский просп., 33  
E-mail: elenfedoseeva@gmail.com

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова  
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр.12

<sup>3</sup>Байкальский музей СО РАН  
664520, Листвянка, ул. Академическая, 1

<sup>4</sup>Сургутский государственный университет  
628412, Сургут, просп. Ленина, 1

Статья поступила 22.06.2023

После доработки 04.07.2023

Принята к печати 07.07.2023

### АННОТАЦИЯ

Известные факты повышения доли фитопатогенных форм микромицетов в почвах, загрязненных тяжелыми металлами (ТМ), делают актуальными исследования механизмов их резистентности, что важно для выбора эффективных средств борьбы с возбудителями болезней растений. Не менее актуальными и нуждающимися в изучении остаются вопросы взаимодействия металл-резистентных фитопатогенов с непатогенными видами на фоне загрязнения. В лабораторных экспериментах с чистыми культурами четырех видов грибов (фитопатогенные штаммы *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum* и непатогенные *Trichoderma harzianum* и *Clonostachys rosea*) исследовали резистентность к катионам Cu, Zn, Pb, по отдельности добавленных в питательную среду с разным содержанием доступного углерода (сахарозы). Измеряли рост колоний, активность спорообразования и накопление биомассы. Рассчитывали эффективные концентрации, приводящие к 50%-му ингибированию параметров роста, – EC<sub>50</sub>. Исследуемые грибы проявляли различную устойчивость к ТМ. *T. harzianum* и *C. rosea* были более устойчивы к Zn и Pb при любом содержании доступного углерода. Наиболее устойчивы к Cu были пары *A. alternata* – *C. rosea* и *T. harzianum* – *C. rosea* на средах с меньшим и большим содержанием углерода соответственно. При этом для всех грибов Zn и Pb оказались менее токсичны, чем Cu. Антагонистическая активность, оцененная методом встречных культур на средах с добавлением ТМ, зависела как от ростовых характеристик, так и от выявленной устойчивости вида к ТМ. Активность быстрорастущего *T. harzianum* как территориального антагониста стимулировалась внесением Zn и Pb. Медленнорастущий *C. rosea* проявлял конкурентоспособность благодаря высокой устойчивости к ТМ. Сделан вывод о необходимости учета видовой устойчивости к ТМ для прогноза развития взаимоотношений патогенных и непатогенных видов в грибных сообществах на фоне загрязнения почвы.

**Ключевые слова:** загрязнение почвы, патогены, антагонизм, метод встречных культур, эффективные концентрации, гормезис.

© Федосеева Е. В., Сергеева Ю. Д., Волкова В. Д., Стом Д. И., Терехова В. А., 2023

## ВВЕДЕНИЕ

Тяжелые металлы (ТМ) способны оказывать негативное влияние на развитие грибов на разных уровнях биологической организации: от клеточного уровня до сообществ. Токсичность ТМ обусловлена несколькими механизмами их воздействия на живую клетку [Багаева и др., 2013; Singh et al., 2015]. Катионы ТМ взаимодействуют с различными электрон-донорными группами в составе многих органических соединений. Соединяясь с молекулами, участвующими в метаболизме клеток, – белками, нуклеотидами, коферментами, фосфолипидами, порфиринами, – ТМ оказывают влияние на активность этих молекул. Повышенное накопление ТМ вызывает эффект оксидативного стресса и последующие процессы повышенного перекисного окисления липидов, обеднение содержания глутатиона и эргостерола, а также изменение активности ферментов (дегидрогеназной, каталазной, пероксидазной) [Pérez-Torres et al., 2020; Rola et al., 2022]. Тяжелые металлы, таким образом, оказывают свое токсическое действие на большинство участков метаболических путей микроорганизмов.

Первым внешним барьером, защищающим клетку от действия ТМ, является поверхность клеточной стенки, которая может выступать в качестве лиганда для связывания ионов металлов и участвовать в их внеклеточной секвестрации [Palanivel et al., 2023]. Тяжелые металлы, достигшие плазматической мембраны, могут изменять ее структуру [Rola et al., 2022]. Проникновение ТМ в клетку может происходить через специфические транспортеры [Palanivel et al., 2023], после чего ТМ могут повреждать внутриклеточные структуры и макромолекулы внутри клеток.

Вместе с тем грибы характеризуются высокой резистентностью и адаптивностью к ТМ. Резистентность грибов обусловлена несколькими защитными механизмами [Багаева и др., 2013; Siddiquee et al., 2015; Скугорева и др., 2019; Gajewska et al., 2022], в частности: элиминацией металлов барьером проницаемости, активным транспортом металлов из клетки, внеклеточным секвестрированием, ферментативной детоксикацией, внутриклеточным секвестрированием металлов, уменьшением чувствительности клеточных мишеней к металлам.

Грибы обладают уникальными биохимическими особенностями, способствующими увеличению резистентности к токсическому действию ТМ [Скугорева и др., 2019]. Клеточная стенка содержит хитин – полисахарид, обладающий высокой сорбционной способностью благодаря хелатированию ТМ. Меланины – связанные с клеточной стенкой фенольные молекулы – еще одна группа соединений, которые вырабатываются грибами в ответ на действие ТМ. Некоторые меланины микромицетов являются эффективными биосорбентами меди [Gadd, de Rome, 1988; Caesar-Tonthat et al., 1995]. Функциональные группы полимеров клеточной стенки способны к ионному взаимодействию и формированию комплексных соединений с ионами металлов [Awofolu et al., 2006; Alluri et al., 2007]. Особенности грибов затрагивают строение не только клеточной стенки, но и клеточной мембраны и особенности внутриклеточных метаболитов. В связи с этим выделяют возможные универсальные стратегии адаптации грибов к неблагоприятным факторам: накопление в цитоплазме защитных веществ (осмолитов) и изменение липидного состава мембран [Danilova et al., 2020; Федосеева и др., 2021].

Среди наиболее устойчивых к действию ТМ выделяют представителей родов *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* и *Alternaria* из широко представленного в почве отдела Ascomycota [Iskandar et al., 2011; Olapido et al., 2018; Torres-Cruz et al., 2018; Njoku et al., 2020]. Многие металл-устойчивые грибы из родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* и *Alternaria* способны к проявлению фитопатогенных свойств. Среди устойчивых к ТМ грибов практический интерес вызывают широко распространенные представители рода *Trichoderma*. Грибы триходерма устойчивы к ряду агрохимикатов, ТМ и органическим загрязняющим веществам, их широко используют в сельском хозяйстве в качестве стимуляторов роста растений и для биологической борьбы с фитопатогенами [Gorai et al., 2020]. Под действием ТМ в структуре грибных сообществ происходит элиминирование видов грибов, способных к супрессорной активности на фоне смещения в сторону доминирования оппортунистических резистентных патогенных групп, усиливается агрессивность патогенов [Pariaud et al., 2009; Корнейкова и др., 2012]. Опасность, которую

представляют грибные патогены, усиливается за счет ускоренной эволюции патогенов в основном из-за использования фунгицидов и других видов деятельности человека, способствующих притоку токсичных соединений, часто содержащих ТМ, в среду обитания микроорганизмов [Pandaranayaka et al., 2019].

Цель работы – изучить устойчивость к ТМ почвенных микромицетов, различающихся по фитопатогенным и антагонистическим свойствам, и охарактеризовать изменение антагонистической активности в среде роста грибов, содержащей катионы ТМ. Эффекты ТМ (Cu, Zn, Pb) изучали в модельных лабораторных экспериментах на примере двух видов фитопатогенных микромицетов – *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum*, и двух непатогенных, но обладающих потенциальной антагонистической активностью – *Trichoderma harzianum* и *Clonostachys rosea*.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

##### Грибные культуры и дизайн эксперимента

Объектами исследования были выделенные из почвы штаммы видов: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Fusarium oxysporum* Schltdl. 1824, *Trichoderma harzianum* Rifai 1969 и *Clonostachys rosea* (Preuss) Mussat 1901. Гриб *T. harzianum* не синтезирует меланины. Гриб *A. alternata* синтезирует 1,8-дигидроксинафталин (DHN)-меланиноподобные соединения, которые в основном связаны с аскомицетами [Toledo et al., 2017]. Представители рода *Fusarium* способны синтезировать менее канонические для аскомицетов меланины – 5-дезоксибострикоидеин-меланин [Toledo et al., 2017]. Ранее нами получены экспериментальные подтверждения синтеза меланино-подобных пигментов у *F. solani* [Fedoseeva et al., 2022].

Грибы культивировали на среде Чапека со следующим минеральным составом (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 3,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,5;  $\text{KCl}$ –0,5;  $\text{FeSO}_4$  – 0,001 (pH 5,5–6,0). Сахарозу в концентрации 3 и 20 г/л вносили в качестве источника углерода. Микромицеты инкубировали при 22 °C в колбах с жидкой средой Чапека или в чашках Петри, содержащих агаризованную среду Чапека. В экспериментах на жидких питательных средах суспензию спор вносили в колбы со 100 мл среды до соз-

дания плотности спор  $10^5$  –  $10^6$  ед/мл, инкубацию проводили на шейкере. В таких случаях грибная биомасса была представлена мицелиальными пеллетами. На твердые среды грибной инокулом переносили бактериологической петлей из пробирок с маточной культурой.

#### Тяжелые металлы

Катионы ТМ применяли в форме солей (нитраты меди, свинца и цинка). Применение одной и той же анионной формы позволяло исключить эффект влияния разных анионов на отклики микромицетов. В экспериментах по накоплению биомассы в жидких питательных средах соли ТМ добавляли в среды одновременно с внесением грибного инокулюма. В экспериментах на агаризованных средах соли ТМ добавляли в среды после автоклавирования и снижения температуры. Методом кратных разведений создавали диапазон концентраций катионов Cu, Pb и Zn 0,001 – 1 г/л. Широкий диапазон концентраций позволял получить эффект как стимулирования, так и ингибирования ростовых показателей микромицетов. При выборе катионов металлов и испытываемых концентраций солей ориентировались на публикации об устойчивости грибов к ТМ [Iskandar et al., 2011; Mohammadian et al., 2017; Torres-Cruz et al., 2018]. Контролем служила питательная среда без ТМ.

#### Оценка ростовых показателей грибных культур

Измеряли ростовые показатели грибов (fungal endpoints): биомассу мицелия, диаметр грибной колонии и продуктивность конидий. Кинетические показатели скорости роста колоний оценивали в чашках Петри по изменению диаметра (радиуса) колоний, который фиксировали с помощью линейки. При анализе структурно-функциональной организации микобиоты в природных средах достаточно широко используется экспресс-метод оценки разнообразия микробных сообществ по радиальной скорости роста [Нетрусов и др., 2012]. На основе этого показателя предложено группировать микроорганизмы, выделяемые при посеве образцов на питательные среды, по разным классам с определенным диапазоном значений коэффициента радиаль-

ной скорости роста ( $K_r$ ) и кинетическим типам [Полянская и др., 1988]. В данной работе проведено ранжирование исследуемых видов грибов по скорости роста в контрольных (без внесения ТМ) и с внесением ТМ вариантах. Скорость роста определяли в период линейного роста колоний в чашках Петри с агаризованной средой, измеряя диаметр колонии каждые 24–48 часа. Скорость роста (СР) рассчитывали по формуле:

$$CP = R/\Delta t,$$

где  $R$  – радиус колонии, мм;  $\Delta t$  – продолжительность культивирования, ч.

Биомассу мицелия после культивирования на жидкой среде собирали при фильтровании на обеззоленные бумажные фильтры. Мицелий высушивали при 103 °С до постоянного веса, взвешивали.

Интенсивность спороношения оценивали по продукции конидий на 1 мм<sup>2</sup>. Для этого вырезали три равных участка агаризованной среды со спороносным мицелием от центра к краю колонии микробиологическим сверлом. Вырезанные участки помещали в 5 мл дистиллированной воды с небольшим добавлением детергента (Твин-80), встряхивали, а затем суспензию спор фильтровали через капроновое сито. Интенсивность спороношения определяли с помощью камеры Горяева согласно опубликованным рекомендациям [Санин и др., 2008].

Рассчитывали эффективные концентрации, вызывающие 50%-е ( $ЭК_{50}$ ) ингибирование роста колоний на агаризованной среде (на 2-е, 4-е, 6-е и 7-е сутки роста для *T. harzianum*, *F. oxysporum*, *A. alternata* и *C. rosea* соответственно), а также ингибирование накопления биомассы при росте в жидкой среде (на 3–4-е сутки роста для всех культур).

#### **Оценка антагонистических свойств методом встречных культур**

Антагонистическую активность грибов, потенциально обладающих супрессорной активностью по отношению к фитопатогенам, оценивали методом встречных культур [Matarese et al., 2012]. Диски, вырезанные с края активно растущей колонии антагониста и патогена, помещали в чашку Петри с агаризованной питательной средой. Учитывали радиус коло-

нии патогена как обращенный навстречу колонии антагониста ( $R_a$ ), так и в перпендикулярном (контрольном) направлении ( $R_c$ ). Для оценки антагонистической активности грибов рост колоний оценивали на средах со сниженной концентрацией сахарозы.

#### **Статистическая обработка**

Эксперименты проводили в 3–5 повторностях с расчетом средних арифметических и стандартных отклонений, на графиках указывали планки погрешностей. Достоверность различий между вариантами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и попарного множественного сравнения (тест Тьюки). Для расчета ЭК применяли пробитный анализ. Все расчеты проводились в статистических программах R, Excel и ExcelStat.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

#### **Кинетические типы грибов**

По результатам кинетических изменений диаметра колоний на питательных средах без добавления ТМ проведено ранжирование исследуемых видов грибов по скорости роста (табл. 1). Скорость роста *T. harzianum* находилась в пределах ( $0,78 \pm 0,03$ ) – ( $0,89 \pm 0,07$ ) мм/ч, что позволило отнести этот штамм к кинетическому типу – быстрорастущий с  $K_r \geq 12$ . Скорость роста *C. rosea* находилась в пределах ( $0,18 \pm 0,03$ ) – ( $0,22 \pm 0,02$ ) мм/ч, что характеризовало гриб как медленно растущий с  $K_r = 4$ . Скорость роста *A. alternata* – ( $0,38 \pm 0,02$ ) – ( $0,39 \pm 0,03$ ) мм/ч, поэтому этот вид был отнесен к кинетическому типу – быстрорастущий с  $K_r = 8$ . И, наконец, *F. oxysporum*, скорость роста которого ( $0,58 \pm 0,01$ ) – ( $0,61 \pm 0,02$ ) мм/ч, был квалифицирован как быстрорастущий с  $K_r = 10$ –11. По снижению скорости роста исследованные микромицеты можно расположить в ряду: *T. harzianum* > *F. oxysporum* > *A. alternata* > *C. rosea*. Разные концентрации сахарозы (3 и 20 г/л) не влияли на описанные кинетические типы изученных микромицетов.

#### **Влияние тяжелых металлов на рост колоний**

Тяжелые металлы при внесении в питательную среду в основном ингибировали рост

Скорость роста микромицетов в контроле и образцах с внесением тяжелых металлов, мм/ч\*

| Вид            |       | <i>T. harzianum</i>                          |                          | <i>C. rosea</i>                               |                          | <i>A. alternata</i>                         |                         | <i>F. oxysporum</i>                             |                        |
|----------------|-------|----------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|------------------------|
| Сахароза (г/л) |       | 3                                            | 20                       | 3                                             | 20                       | 3                                           | 20                      | 3                                               | 20                     |
| Контроль       | –     | 0,78±0,03 <sup>a**</sup>                     | 0,89±0,07 <sup>c</sup>   | 0,22±0,02 <sup>a</sup>                        | 0,18±0,03 <sup>bc</sup>  | 0,39±0,03 <sup>a</sup>                      | 0,38±0,02 <sup>a</sup>  | 0,58±0,01 <sup>a</sup>                          | 0,61±0,02 <sup>a</sup> |
| Тип            |       | Быстрорастущий,<br><i>K<sub>r</sub></i> ≥ 12 |                          | Медленнорастущий,<br><i>K<sub>r</sub></i> = 4 |                          | Быстрорастущий,<br><i>K<sub>r</sub></i> = 8 |                         | Быстрорастущий,<br><i>K<sub>r</sub></i> = 10–11 |                        |
| Pb, г/л        | 0,5   | 0,59±0,02 <sup>bc</sup>                      | 0,88±0,06 <sup>c</sup>   | 0,16±0,01 <sup>b</sup>                        | 0,15±0,02 <sup>bc</sup>  | 0,10±0,005 <sup>d</sup>                     | 0,13±0,02 <sup>bc</sup> | 0,15±0,01 <sup>cd</sup>                         | 0,25±0,02 <sup>c</sup> |
|                | 0,05  | 0,80±0,007 <sup>a</sup>                      | 1,21±0,02 <sup>abc</sup> | 0,21±0,01 <sup>a</sup>                        | 0,19±0,01 <sup>bc</sup>  | 0,36±0,03 <sup>a</sup>                      | 0,34±0,01 <sup>a</sup>  | 0,57±0,008 <sup>a</sup>                         | 0,54±0,03 <sup>a</sup> |
|                | 0,01  | 0,84±0,008 <sup>a</sup>                      | 1,37±0,16 <sup>a</sup>   | 0,22±0,01 <sup>a</sup>                        | 0,18±0,02 <sup>bc</sup>  | 0,39±0,003 <sup>a</sup>                     | 0,34±0,03 <sup>a</sup>  | 0,56±0,02 <sup>a</sup>                          | 0,56±0,03 <sup>a</sup> |
| Zn, г/л        | 0,5   | 0,16±0,03 <sup>d</sup>                       | 0,31±0,04 <sup>de</sup>  | 0,10±0,005 <sup>c</sup>                       | 0,19±0,02 <sup>bc</sup>  | 0,06±0,004 <sup>d</sup>                     | 0,03±0,03 <sup>d</sup>  | 0,20±0,01 <sup>c</sup>                          | 0,34±0,02 <sup>b</sup> |
|                | 0,05  | 0,71±0,05 <sup>ab</sup>                      | 1,23±0,03 <sup>ab</sup>  | 0,21±0,01 <sup>a</sup>                        | 0,21±0,02 <sup>b</sup>   | 0,28±0,02 <sup>b</sup>                      | 0,21±0,07 <sup>b</sup>  | 0,53±0,01 <sup>a</sup>                          | 0,52±0,05 <sup>a</sup> |
|                | 0,01  | 0,86±0,02 <sup>a</sup>                       | 1,32±0,13 <sup>a</sup>   | 0,21±0,03 <sup>ab</sup>                       | 0,28±0,04 <sup>a</sup>   | 0,30±0,07 <sup>b</sup>                      | 0,31±0,05 <sup>a</sup>  | 0,54±0,008 <sup>a</sup>                         | 0,50±0,04 <sup>a</sup> |
| Cu, г/л        | 0,05  | 0,15±0,02 <sup>d</sup>                       | 0,08±0,02 <sup>e</sup>   | 0,05±0,01 <sup>d</sup>                        | 0,014±0,003 <sup>d</sup> | 0,11±0,01 <sup>cd</sup>                     | 0,04±0,02 <sup>d</sup>  | 0 <sup>e</sup>                                  | 0 <sup>c</sup>         |
|                | 0,01  | 0,23±0,05 <sup>d</sup>                       | 0,48±0,28 <sup>d</sup>   | 0,16±0,003 <sup>b</sup>                       | 0,14±0,003 <sup>c</sup>  | 0,09±0,002 <sup>d</sup>                     | 0,11±0,02 <sup>cd</sup> | 0,14±0,02 <sup>d</sup>                          | 0,15±0,13 <sup>c</sup> |
|                | 0,005 | 0,44±0,12 <sup>c</sup>                       | 0,91±0,08 <sup>bc</sup>  | 0,16±0,04 <sup>b</sup>                        | 0,17±0,01 <sup>bc</sup>  | 0,17±0,01 <sup>c</sup>                      | 0,17±0,01 <sup>bc</sup> | 0,32±0,06 <sup>b</sup>                          | 0,32±0,01 <sup>b</sup> |

\* Самая высокая скорость в экспоненциальной фазе роста.

\*\* Значения, которым присвоены разные буквы, различаются значимо ( $p \leq 0,05$ , критерий Тьюки).

колонии, снижая скорость роста грибов (см. табл. 1). Эффект стимулирования (гормезис) наблюдался при невысоких концентрациях Zn и Pb, которые провоцировали увеличение скорости роста *T. harzianum*. Цинк при самой невысокой концентрации увеличивал скорость роста *C. rosea*. Анализ рассчитанных скоростей роста грибов и эффективных концентраций ТМ, вызывающих ингибирование роста колоний, позволил заключить, что медь являлась наиболее токсичным ТМ для исследованных представителей микромицетов. Внутри исследованной группы микромицеты проявляли разную устойчивость к воздействию ТМ. К действию Zn и Pb наибольшую устойчивость проявляли *T. harzianum* и *C. rosea*.

Разные концентрации сахарозы влияли на степень устойчивости к ТМ изученных штаммов. При увеличении содержания легкодоступного источника углерода (увеличение концентрации сахарозы с 3 до 20 г/л) практически двукратно повышалась устойчивость и *T. harzianum*, и *C. rosea* к Zn и Pb (рис. 1, в, д). Устойчивость к меди, характеризуемая по ЭК<sub>50</sub>, также зависела от содержания сахарозы в среде роста. При 20 г/л сахарозы у *T. harzianum* и *C. rosea* ЭК<sub>50</sub> Cu 0,024 и 0,023 г/л соответственно (рис. 1, а). При снижении со-

держания легкодоступного источника углерода наибольшую устойчивость проявляли виды *C. rosea* и *A. alternata* – ЭК<sub>50</sub> Cu 0,015 и 0,003 г/л соответственно (см. рис. 1, а).

#### Влияние тяжелых металлов на накопление биомассы

Наибольшая устойчивость к Zn выявлена у *T. harzianum*: значения ЭК<sub>50</sub> 1,16 и 1,64 г/л в средах с сахарозой 3 и 20 г/л соответственно (рис. 1, г). Устойчивость *C. rosea* к Zn ниже, чем у триходермы: ЭК<sub>50</sub> = 0,79 г/л при 20 г/л сахарозы, ЭК<sub>50</sub> = 0,24 г/л при 3 г/л сахарозы (см. рис. 1, г). Устойчивость *F. oxysporum* и *A. alternata* была значительно ниже – ЭК<sub>50</sub> от 0,09 до 0,15 г/л.

Наибольшая устойчивость к Cu выявлена у *A. alternata* (ЭК<sub>50</sub> 0,046 г/л при 3 г/л сахарозы) (рис. 1, б). Гриб *T. harzianum*, который можно отнести к наиболее устойчивому к действию Zn, к действию Cu не проявлял высокой устойчивости.

#### Влияние тяжелых металлов на интенсивность спороношения

Для трех видов микромицетов, *C. rosea*, *A. alternata*, *F. oxysporum*, внесение ТМ в кон-

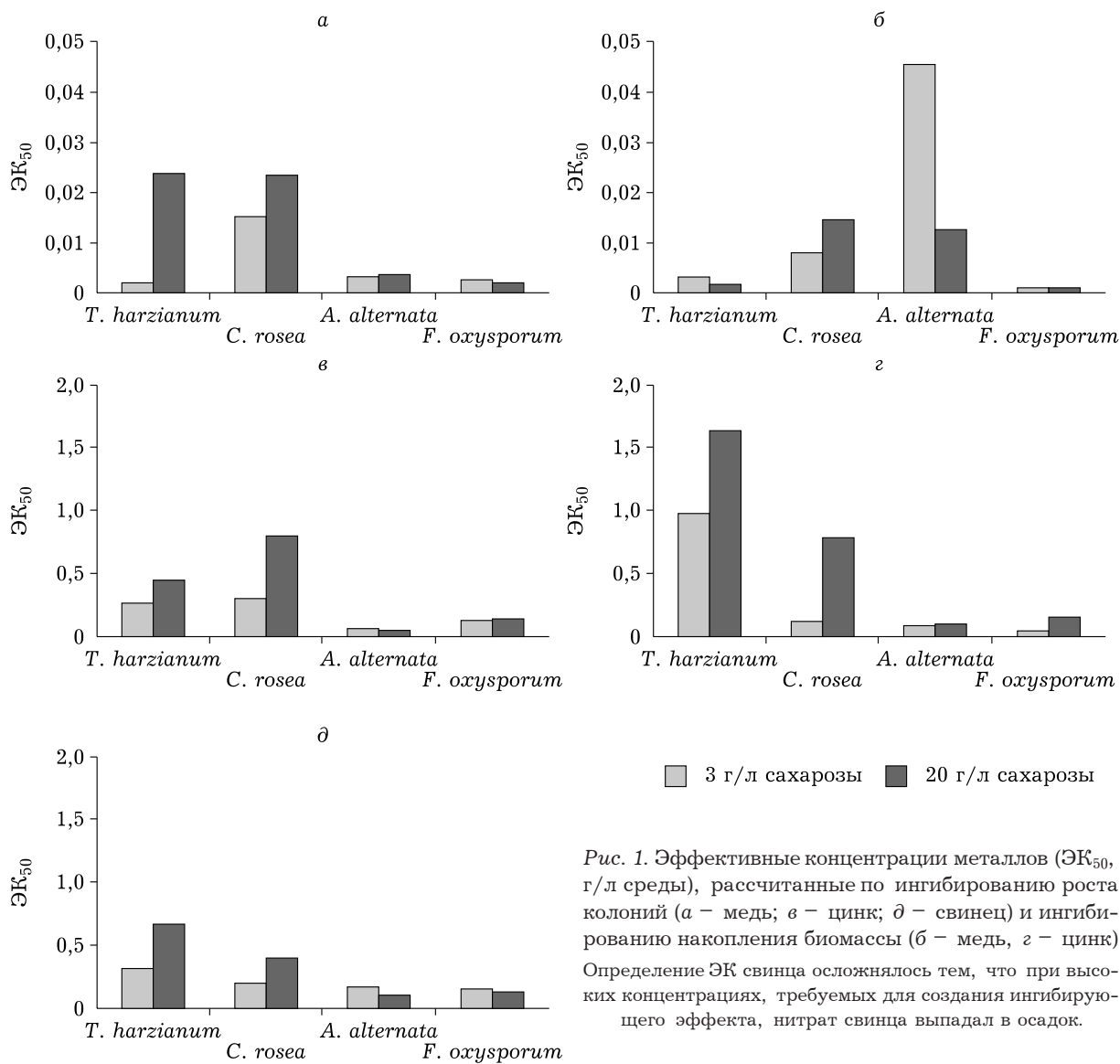


Рис. 1. Эффективные концентрации металлов (ЭК<sub>50</sub>, г/л среды), рассчитанные по ингибированию роста колоний (а – медь; в – цинк; д – свинец) и ингибированию накопления биомассы (б – медь, г – цинк). Определение ЭК свинца осложнялось тем, что при высоких концентрациях, требуемых для создания ингибирующего эффекта, нитрат свинца выпадал в осадок.

центрациях, не подавляющих рост колоний, стимулировало спороношение. Причем колонии *C. rosea* активнее продуцировали конидии при внесении каждого из трех ТМ (рис. 2, в, г; рис. 3, д–з); *A. alternata* – при внесении Cu (рис. 2, д, е; рис. 3, и–м); *F. oxysporum* – при внесении Zn (рис. 2, ж, з; рис. 3, н–р). Активность спороношения *T. harzianum* на фоне внесения ТМ зависела от концентрации сахарозы в среде (рис. 2, а, б; рис. 3, а–г). При 3 г/л сахарозы Zn и Pb в больших концентрациях (1 и 0,5 г/л) ингибировали продуцирование конидий, а Cu полностью подавляла. При увеличении сахарозы до 20 г/л Zn и Pb при всех исследованных концентрациях стимулировали продуцирование конидий, стимулирование

Cu отмечалось на самых низких концентрациях (0,005 г/л).

### Влияние тяжелых металлов на проявление антагонистической активности грибов

На средах с внесением Zn и Pb отмечалась активизация роста быстрорастущего *T. harzianum* (рис. 4, б, в, е, ж). В паре с фитопатогенными *A. alternata* и *F. oxysporum*, характеризующимися меньшей скоростью роста колоний, триходерма проявляла себя как наиболее активный территориальный антагонист. Однако на средах с Cu, ингибирующей рост триходермы в большей степени, чем рост аль-

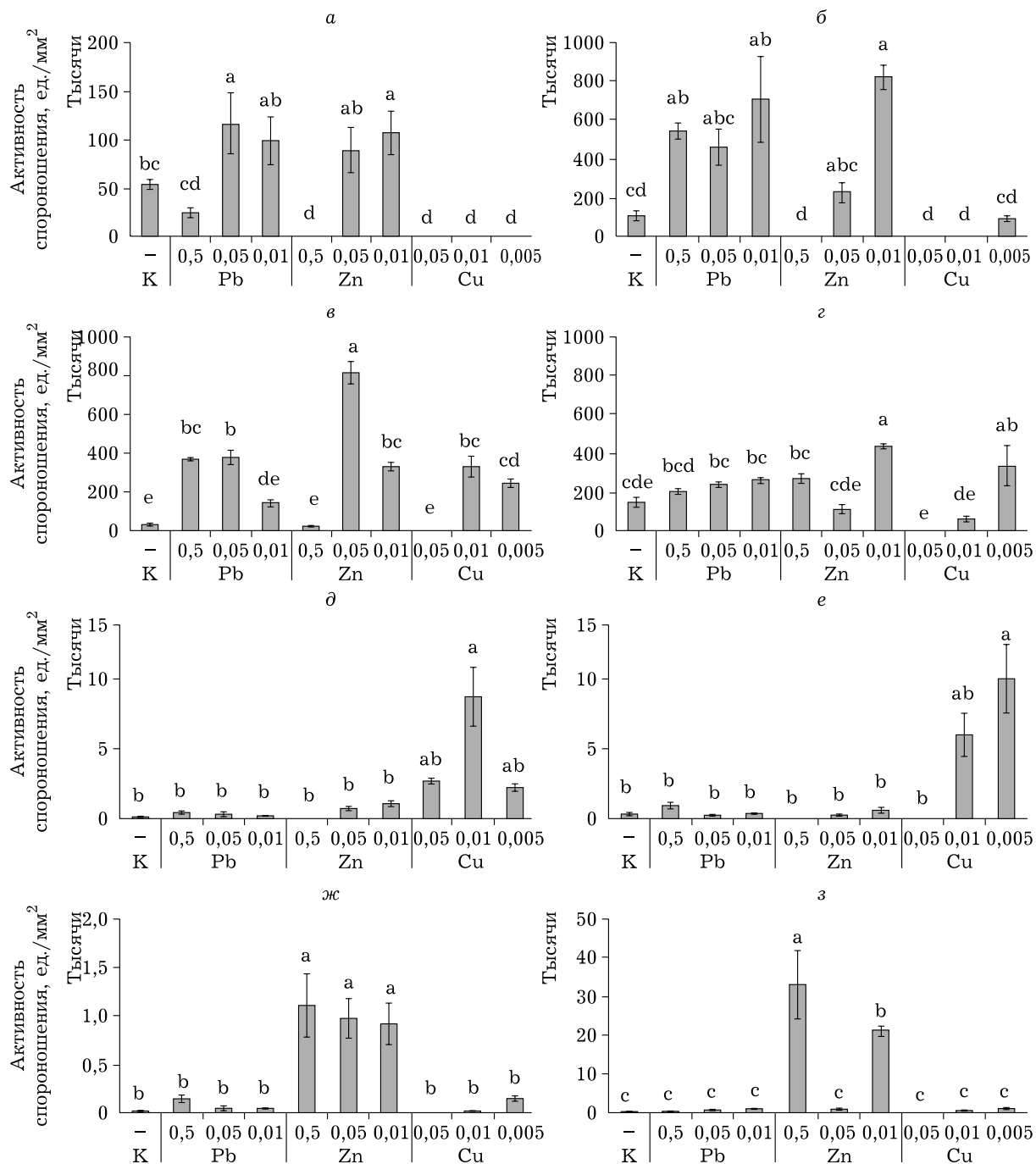


Рис. 2. Интенсивность спороношения микромицетов в контроле (К) (без внесения металлов) и образцах среды с внесением металлов: при 3 г/л сахарозы (а – *T. harzianum*; в – *C. rosea*; д – *A. alternata*; ж – *F. oxysporum*) и 20 г/л сахарозы (б – *T. harzianum*; г – *C. rosea*; е – *A. alternata*; з – *F. oxysporum*).

\* — значения, которым присвоены разные буквы, различаются значимо ( $p \leq 0,05$ , критерий Тьюки)

тернарии и даже фузариума, эффект усиления антагонистических свойств *T. harzianum* не проявлялся (рис. 4, г, з).

Гриб *C. rosea* по-разному проявлял себя по отношению к фитопатогенным грибам. Он

имел более низкую скорость роста, чем *A. alternata* и *F. oxysporum*. На средах с ТМ заметной активации, как ростовой, так и возможной супрессорной активности, *C. rosea* не наблюдалось (рис. 5, а–г). Внесение Cu

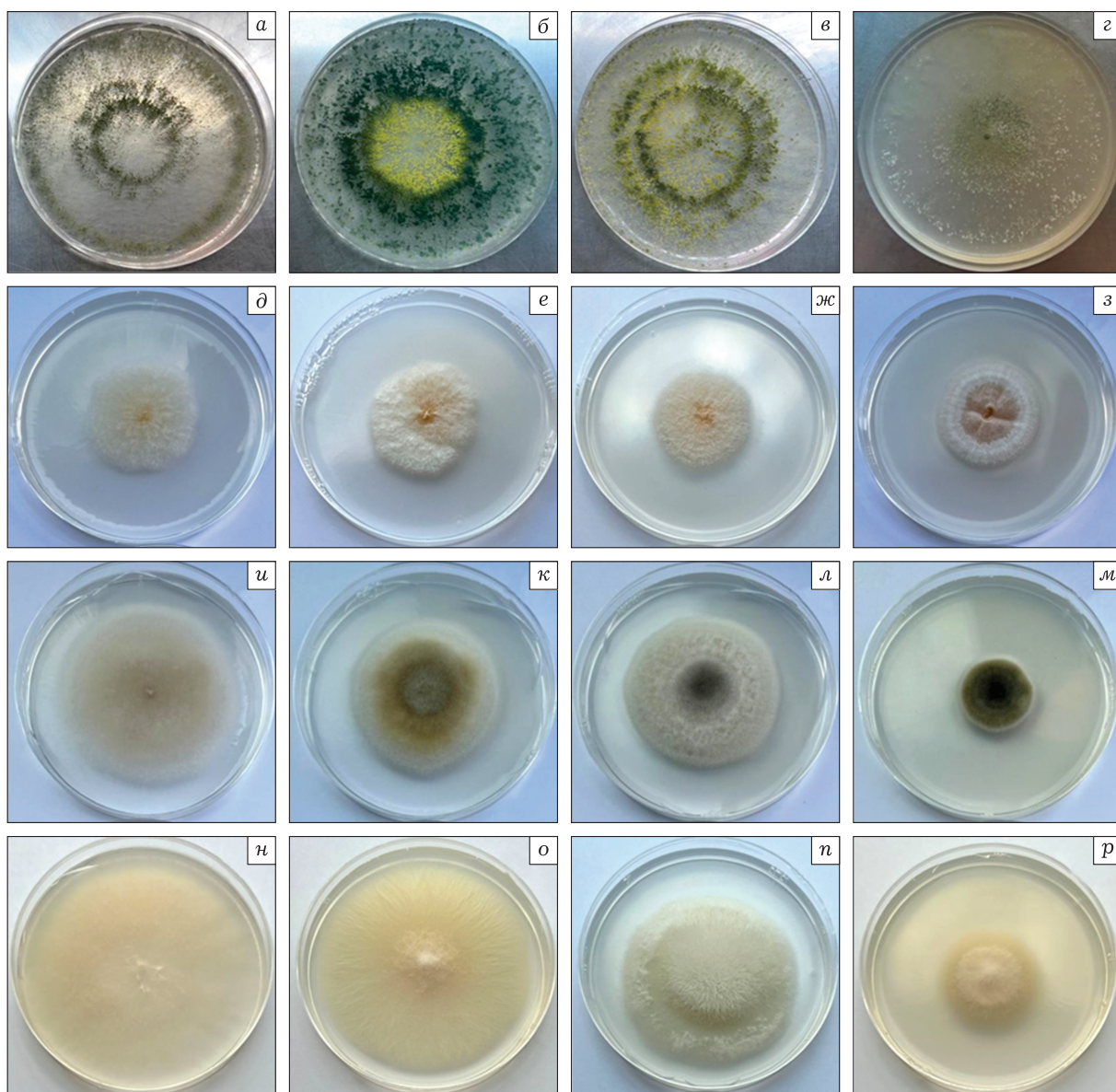


Рис. 3. Внешний вид колоний микромицетов в контроле (без внесения металлов) и на средах с внесением металлов: *T. harzianum* (а – контроль; б – 0,01 г/л Pb; в – 0,01 г/л Zn; г – 0,005 г/л Cu); *C. rosea* (д – контроль; е – 0,01 г/л Pb; ж – 0,01 г/л Zn; з – 0,005 г/л Cu); *A. alternata* (и – контроль; к – 0,01 г/л Pb; л – 0,01 г/л Zn; м – 0,005 г/л Cu); *F. oxysporum* (н – контроль; о – 0,01 г/л Pb; п – 0,01 г/л Zn; р – 0,005 г/л Cu)

ингибировало рост *F. oxysporum*, а *C. rosea* оказывался устойчивым к действию данного ТМ (рис. 5, з). Таким образом, в присутствии меди *C. rosea* мог быть потенциально более конкурентоспособным, чем фитопатогенный *F. oxysporum*.

Способность к проявлению антагонистических свойств (особенно как территориальных антагонистов) зависела от скорости роста гриба

и уровня устойчивости к ТМ. *T. harzianum* вел себя как наиболее активный территориальный антагонист на средах со Zn и Pb в отношении грибов с меньшей скоростью роста (*A. alternata* и *F. oxysporum*). Медленнорастущий *C. rosea* мог быть потенциально более конкурентоспособен по сравнению с фитопатогенными грибами с большей скоростью роста только за счет своей высокой устойчивости к ТМ.

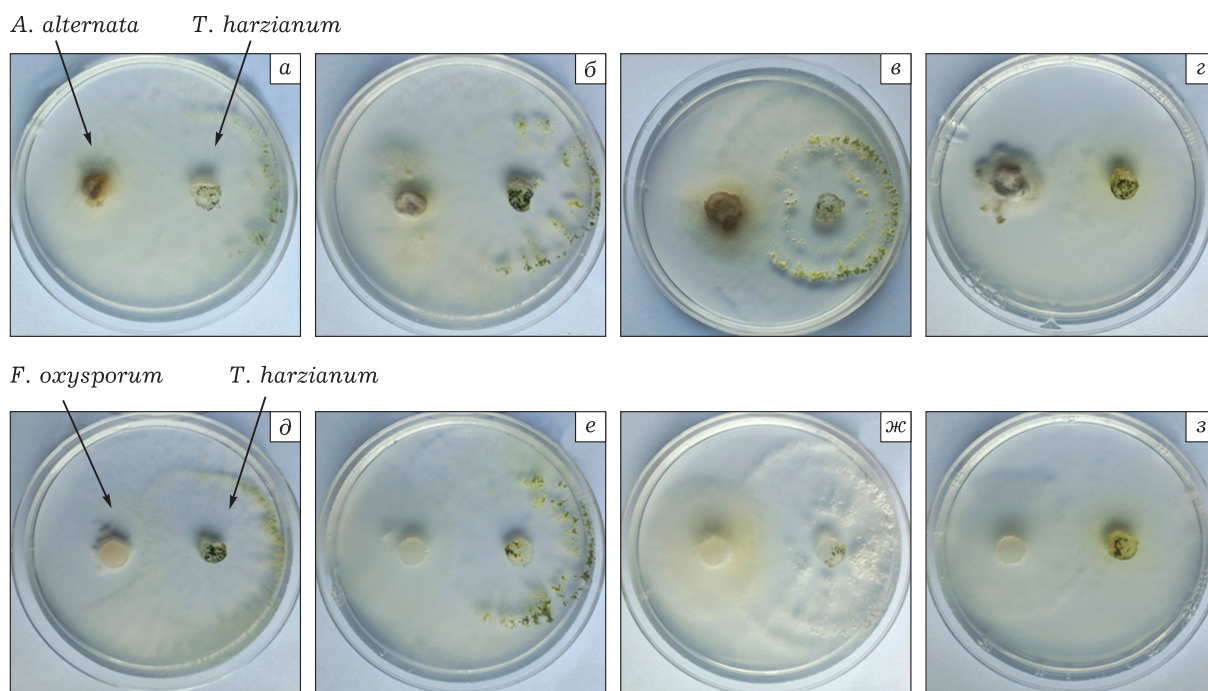


Рис. 4. Фиксация антагонистических свойств *T. harzianum* в паре с *A. alternata*: а – на среде Чапека (контроль); б – Pb 0,01 г/л; в – Zn 0,01 г/л; г – Cu 0,01 г/л. В паре с *F. oxysporum*: д – на среде Чапека (контроль); е – Pb 0,01 г/л; ж – Zn 0,01 г/л; з – Cu 0,005 г/л

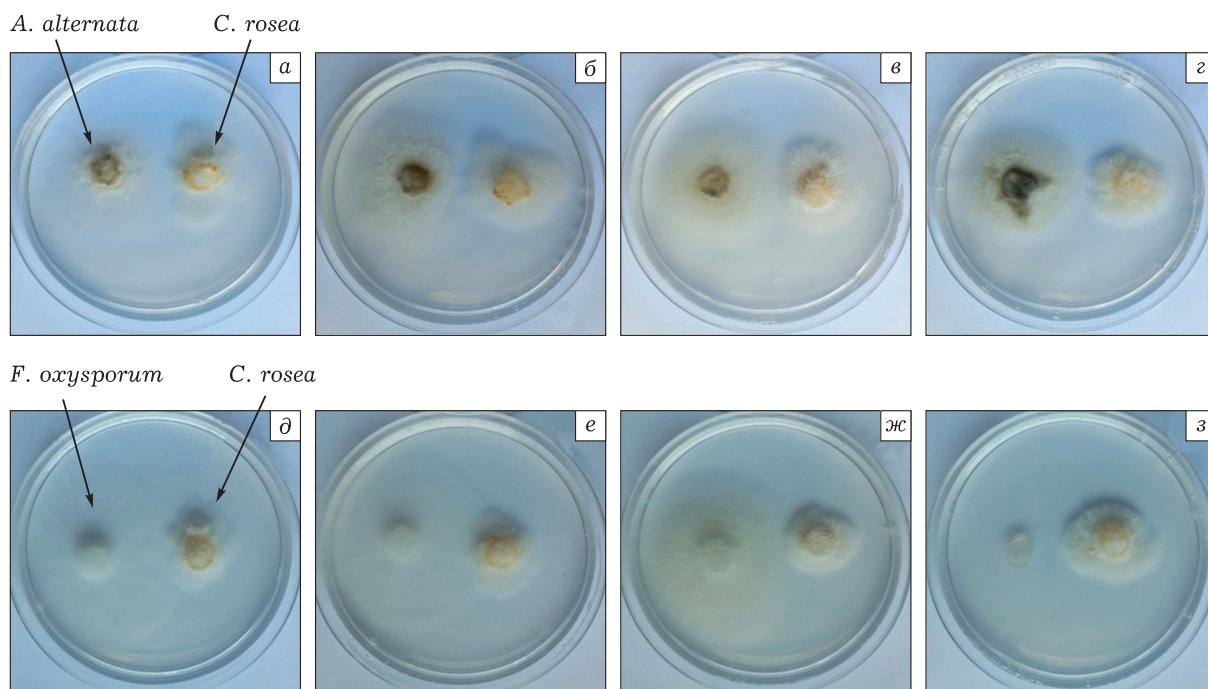


Рис. 5. Фиксация антагонистических свойств *C. rosea* в паре с *A. alternata*: а – на среде Чапека (контроль); б – Pb 0,01 г/л; в – Zn 0,05 г/л; г – Cu 0,005 г/л. В паре с *F. oxysporum*: д – на среде Чапека (контроль); е – Pb 0,01 г/л; ж – Zn 0,05 г/л; з – Cu 0,01 г/л

## ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных данных по влиянию ТМ на рост колоний активность спороношения и накопление биомассы можно заключить, что для трех штаммов *T. harzianum*, *A. alternata* и *F. oxysporum* наименее токсичным был свинец, для *C. rosea* – цинк. Медь характеризовалась наибольшей токсичностью для всех исследованных микромицетов. Анализ опубликованных данных по воздействию ТМ на разные виды мицелиальных грибов показал, что показатели токсичности варьируют (табл. 2). Так, штамм *Curvularia lunata* оказался более чувствительным к токсическому действию никеля, чем меди и цинка [Paraszkiewicz et al., 2009]. Наименьшее влияние на *F. oxysporum* и *Pythium debaryanum* оказал цинк, тогда как наибольшее – кадмий [Golubović-Ćurguz et al., 2010]. Штаммы гифомицета *Heliscus lugdunensis* (*Neonectria lugdunensis*) и почвенного гриба *Verticillium* cf. *alboatrum* также проявляли более высокую устойчивость к Zn, чем к Cd [Jaeckel et al., 2005]. Авторы [Sazanova et al., 2015] обнаружили ингибирующее действие индивидуальной обработки Zn (2 мМ) и Cu (0,5 мМ) на рост *Aspergillus niger* и *Penicillium citrinum*. В целом можно заключить, что Cd и Ni относятся к наиболее токсичным металлам для мицелиальных грибов, Zn – к наименее токсичным, Cu и Pb занимают промежуточное положение.

На оценку токсичности металлов могут оказывать влияние особенности развития грибов в различных средах. Для *A. alternata* значения ЭК цинка и меди, рассчитанные по ингибированию роста колоний, были ниже, чем при оценке ингибирования накопления биомассы в жидкой среде (см. рис. 1, а–г). Данная тенденция проявлялась как на средах с 3 г/л, так и с 20 г/л сахарозы. Для *C. rosea* и *F. oxysporum* значения ЭК по ингибированию роста колоний были выше или равны значениям ЭК по ингибированию накопления биомассы (см. рис. 1, а–г). Для *T. harzianum* однозначная тенденция не проявлялась. Зафиксированный для *A. alternata* эффект, при котором гриб проявлял большую устойчивость к ТМ при росте на жидких средах, согласуется с другими исследованиями. Штамм *C. lunata*, выделенный из не загрязненной ТМ почвы, при выращивании на твердой среде (в условиях,

препятствующих образованию специфического эмульгатора) проявлял значительно более высокую чувствительность к ионам  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$ , чем при выращивании на жидкой среде, когда данный гриб продуцирует внеклеточный эмульгатор [Paraszkiewicz et al., 2009].

На оценку токсичности металлов в лабораторных условиях также оказывает влияние количество легкодоступного источника углерода в среде. В ходе экспериментов прослеживалась тенденция по усилению устойчивости *T. harzianum* и *C. rosea* к действию ТМ при увеличении содержания легкодоступного источника углерода (увеличение концентрации сахарозы до 20 г/л) (см. рис. 1, а–д). При внесении дополнительной сахарозы усиление устойчивости фитопатогенного гриба *F. oxysporum* проявлялось в меньшей степени, а фитопатогенный гриб *A. alternata* вообще показывал меньшую устойчивость (см. рис. 1, а–д). Активность спороношения *T. harzianum* на фоне внесения ТМ зависела от концентрации сахарозы в среде и была интенсивнее на средах с большим содержанием сахарозы (см. рис. 2, а, б; рис. 3, а–е).

Реакции микромицетов на присутствие ТМ отражают стратегии адаптации к неблагоприятным факторам среды (fungal life style). Гриб *T. harzianum*, характеризующийся высокой скоростью роста, способностью образовывать обширные колонии и активным спороношением как в оптимальных условиях, так и в присутствии ТМ, был более устойчив к действию Zn и Pb при большем содержании доступного углерода в среде. Эти характеристики позволяют отнести гриб *T. harzianum* к *r*-стратегам. Фитопатогенный меланизированный гриб *A. alternata*, наоборот, был более устойчив на средах со сниженным содержанием доступного углерода, проявлял выраженную устойчивость к действию Cu, которая активизировала спороношение гриба. Высокую устойчивость *A. alternata* к действию Cu также можно связать с присутствием меланина, являющегося эффективным биосорбентом меди [Gadd, de Rome, 1988; Rizzo et al., 1992; Caesar-Tonthat et al., 1995]. Медленнорастущий гриб *C. rosea*, не образующий обширные колонии, характеризовался сравнительно высокими показателями устойчивости к действию всех ТМ, которые активизировали спороношение гриба. Грибы *A. alternata* и *C. rosea*, вероятнее всего,

**Эффективные концентрации тяжелых металлов, вызывающие 50%-е ингибирование накопления биомассы и диаметра колоний мицелиальных грибов (ЭК<sub>50</sub>)**

| Вид гриба                         | Место изоляции                      | Пато-<br>ген-<br>ность | Срок<br>инкубации,<br>дней | Ростовой<br>показатель | ЭК <sub>50</sub>     | Ссылка                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|----------------------------|
| Кадмий (cd)                       |                                     |                        |                            |                        |                      |                            |
| <i>Paecilomyces marquandii</i>    | Сильно загрязненная металлами почва | Да                     | 5                          | Ингибирование биомассы | 2,5 мМ<br>281 мг/л   | Ślaba et al., 2013         |
| <i>Verticillium cf. alboatrum</i> | Сильно загрязненный водоем          | Да                     | 4                          | Ингибирование биомассы | 0,9 мМ<br>101 мг/л   | Jaecel et al., 2005        |
| Никель (ni)                       |                                     |                        |                            |                        |                      |                            |
| <i>Curvularia lunata</i>          | Не загрязненная металлами почва     | Да                     | 2                          | Ингибирование биомассы | 3 мМ<br>176 мг/л     | Paraszkiewicz et al., 2009 |
| <i>Paecilomyces marquandii</i>    | Сильно загрязненная металлами почва | Да                     | 5                          | Ингибирование биомассы | 3 мМ<br>176 мг/л     | Ślaba et al., 2013         |
| Медь (cu)                         |                                     |                        |                            |                        |                      |                            |
| <i>Curvularia lunata</i>          | Не загрязненная металлами почва     | Да                     | 2                          | Ингибирование биомассы | 10 мМ<br>636 мг/л    | Paraszkiewicz et al., 2009 |
| <i>Paecilomyces marquandii</i>    | Сильно загрязненная металлами почва | Да                     | 5                          | Ингибирование биомассы | 4,5 мМ<br>286 мг/л   | Ślaba et al., 2013         |
| <i>Aspergillus niger</i>          | Лабораторная коллекция              | Да                     | 10                         | Ингибирование биомассы | 0,5 мМ<br>32 мг/л    | Sazanova et al., 2015      |
| <i>Alternaria alternata</i>       | Инфицированные растения             | Да                     | 6                          | Диаметр колонии        | 0,2 мМ<br>33 мг/л    | Ouda et al., 2014          |
| <i>Alternaria alternata</i>       | Не загрязненная металлами почва     | Да                     | 7                          | Диаметр колонии        | 0,08 мМ<br>5 мг/л    | Федосеева и др., 2022      |
| <i>Trichoderma viride</i>         | Не загрязненная металлами почва     | Нет                    | 4                          | Диаметр колонии        | 1,93 мМ<br>123 мг/л  | Федосеева и др., 2022      |
| Свинец (pb)                       |                                     |                        |                            |                        |                      |                            |
| <i>Paecilomyces marquandii</i>    | Сильно загрязненная металлами почва | Да                     | 5                          | Ингибирование биомассы | 3,7 мМ<br>767 мг/л   | Ślaba et al., 2013         |
| <i>Alternaria alternata</i>       | Не загрязненная металлами почва     | Да                     | 7                          | Диаметр колонии        | 1,16 мМ<br>240 мг/л  | Федосеева и др., 2022      |
| <i>Trichoderma viride</i>         | Не загрязненная металлами почва     | Нет                    | 4                          | Диаметр колонии        | 1,25 мМ<br>259 мг/л  | Федосеева и др., 2022      |
| Цинк (zn)                         |                                     |                        |                            |                        |                      |                            |
| <i>Curvularia lunata</i>          | Не загрязненная металлами почва     | Да                     | 2                          | Ингибирование биомассы | 17,5 мМ<br>1150 мг/л | Paraszkiewicz et al., 2009 |
| <i>Paecilomyces marquandii</i>    | Сильно загрязненная металлами почва | Да                     | 5                          | Ингибирование биомассы | 12 мМ<br>788 мг/л    | Ślaba et al., 2013         |
| <i>Aspergillus niger</i>          | Лабораторная коллекция              | Да                     | 10                         | Ингибирование биомассы | 2 мМ<br>131 мг/л     | Sazanova et al., 2015      |

являются К-стратегами, реагирующими на стресс образованием компактных колоний и активизацией спороношения.

Интенсивность спорообразования не всегда является показателем негативного воздействия. Процент подавления прорастания спор в смывах с колоний *F. oxysporum* может служить индикатором степени токсичности ТМ [Терехова, 2007]. В природных же условиях при наличии питательных компонентов ТМ могут провоцировать увеличение доли споровой биомассы [Терехова, 2007]. Кроме того, условия окружающей среды, оптимальные для активного спорообразования, могут отличаться от условий, благоприятных для роста колоний [Marfenina et al., 2010].

В литературе обсуждают специфические механизмы токсического эффекта ТМ на грибные патогены и причины высокой устойчивости данной группы грибов к действию ТМ (pathogen viability) [Gajewska et al., 2022]. Действительно, среди наиболее металл-резистентных грибов чаще всего фиксируют патогенные виды (см. табл. 2). Некоторым исключением, как отмечалось выше, являются представители рода *Trichoderma*. В нашем исследовании сравнительно высокую устойчивость к действию Zn, Pb и Cu проявил также непатогенный гриб *C. rosea*. Так, значения ЭК исследованных ТМ для *C. rosea* были выше, чем таковые для фитопатогенного гриба *F. oxysporum*.

Сведения об индивидуальной устойчивости грибов к действию ТМ могут помочь в понимании межвидовых отношений внутри грибных почвенных сообществ на фоне загрязнения ТМ. Так, *T. harzianum* проявлял себя как активный территориальный антагонист на средах с Zn и Pb, но не с Cu. Таким образом, загрязнение почвы некоторыми катионами ТМ может спровоцировать сдвиг грибных сообществ к элиминированию форм, обладающих супрессорной активностью по отношению к фитопатогенам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных по влиянию ТМ на рост колоний, активность спороношения и накопление биомассы можно заключить, что три вида *T. harzianum*, *A. alternata* и *F. oxysporum* оказались наиболее устойчи-

вы к Pb, а *C. rosea* – к Zn. Все исследованные микромицеты характеризовались невысокой устойчивостью к Cu по сравнению с двумя другими металлами. Таким образом, выборка микромицетов обнаружила разную чувствительность к ТМ. Высокая устойчивость *T. harzianum* и *C. rosea* к действию Zn и Pb усиливалась при увеличении содержания доступного углерода в среде. К действию Cu наибольшую устойчивость проявляли пары *A. alternata* – *C. rosea* и *T. harzianum* – *C. rosea* на средах с меньшим и большим содержанием углерода соответственно. Различные эффекты ТМ на рост, развитие и физиологию мицелиальных грибов подчеркивают, что токсичность ТМ зависит не только от типа и концентрации металлов, но и от образа жизни грибов. Способность к проявлению антагонистических свойств (особенно как территориальных антагонистов) зависит, как минимум, от двух факторов: скорости роста гриба и уровня устойчивости к ТМ. Сведения о видовой устойчивости грибов к действию ТМ необходимы для прогноза развития взаимоотношений патогенных и непатогенных видов в грибных сообществах на фоне загрязнения почвы.

Авторы благодарят канд. биол. наук А. Е. Иванову за предоставление грибов из коллекции кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М. В. Ломоносова. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00799, <https://rscf.ru/project/22-24-00799/>.

## ЛИТЕРАТУРА

- Багаева Т. В., Ионова Н. Э., Надеева Г. В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжелых металлов: учеб.-метод. пособие. – Казань: Казанский ун-т, 2013. 56 с.
- Корнейкова М. В., Евдокимова Г. А., Лебедева Е. В. Комплексы потенциально патогенных микроскопических грибов в антропогенно-загрязненных почвах Кольского Севера // Микология и фитопатология. 2012. Т. 46 (5). С. 322–328.
- Нетрусов А. И., Бонч-Осмоловская Е., Горленко В. М., Иванов М. В., Каравайко Г. И., Кожевин П. А., Колотилова Н. Н., Котова И. Б., Максимов В. Н., Ножевникова А. Н., Семенов А. М., Турова Т. П., Юдина Т. Г. Экология микроорганизмов. М.: Юрайт-Москва, 2012. 268 с.
- Полянская Л. М., Кочкина Г. Н., Кожевин П. А., Звягинцев Д. Г. Кинетическое описание структуры комплексов почвенных актиномицетов // Микробиология. 1988. Т. 57 (5). С. 854–859.
- Санин С. С., Неклесова Н. П., Санина А. А., Пачолкова Е. В. Методические рекомендации по созданию

- инфекционных фонов для иммуногенетических исследований пшеницы. М.: Всерос. науч.-исслед. и-т фитопатологии, 2008. 50 с.
- Скугорева С. Г., Кантор Г. Я., Домрачева Л. И. Биосорбция тяжелых металлов микромицетами: специфика процесса, механизмы, кинетика // Теорет. и приклад. экология. 2019. № 2. С. 14–31. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-2-014-031> [Skugoreva S. G., Kantor G. Ya., Domracheva L. I. Biosorption of heavy metals by micromycetes: specificity of the process, mechanisms, kinetics // Theoret. and Appl. Ecol. 2019. Vol. 2. P. 14–31. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-2-014-031>]
- Терехова В. А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. М.: Наука, 2007. 215 с.
- Федосеева Е. В., Данилова О. А., Януцевич Е. А., Терехова В. А., Терешина В. М. Липиды микромицетов и стресс // Микробиология. 2021. Т. 90 (1). С. 43–63. <https://doi.org/10.31857/S0026365621010043> [Fedoseeva E. V., Danilova O. A., Ianutsevich E. A., Terekhova V. A., Tereshina V. M. Micromycete lipids and stress // Microbiology. 2021. Vol. 90(1). P. 37–55. <https://doi.org/10.1134/S0026261721010045>]
- Федосеева Е. В., Кирюшина А. П., Стом Д. Э., Терехова В. А. Устойчивость почвенных микромицетов *Trichoderma viride* и *Alternaria alternata* к тяжелым металлам Cu и Pb // Теорет. и приклад. экология. 2022. № 3. С. 118–127. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-3-118-127> [Fedoseeva E. V., Kiryushina A. P., Stom D. I., Terekhova V. A. Resistance of soil micromycetes *Trichoderma viride* and *Alternaria alternata* to heavy metals Cu and Pb // Theoret. and Appl. Ecol. 2022. N 3. P. 118–127. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-3-118-127>]
- Alluri H. K., Srinivasa R. S. R., Settalluri V. S., Singh J., Suryanarayana V., Venkateshwar P. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal // Afr. J. Biotechnol. 2007. Vol. 6 (25). P. 2924–2931. <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2461>
- Awofolu O. R., Okonkwo J. O., Merwe R. R. D., Badenhorst J., Jordaan E. A new approach to chemical modification of *Aspergillus niger* and sorption of lead ion by fungal species // Electronic J. Biotechnol. 2006. Vol. 9 (4). P. 340–348. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue4-fulltext-1>
- Caesar-Tonthat T. C., Kloeke F. V., Geesey G. G., Henson J. M. Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. P. 1968–1975. <https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1968-1975.1995>
- Danilova O. A., Ianutsevich E. A., Bondarenko S. A., Georgieva M. L., Vikhizhanina D. A., Groza N. V., Bilanenko E. N., Tereshina M. V. Osmolytes and membrane lipids in the adaptation of micromycete *Emericellopsis alkalina* to ambient pH and sodium chloride // Fungal Biol. 2020. Vol. 124. P. 884–891. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.07.004>
- Fedoseeva E., Patsaeva S., Stom D., Terekhova V. Excitation-dependent fluorescence helps to indicate fungal contamination of aquatic environments and to differentiate filamentous fungi // Photonics. 2022. Vol. 9 (10). P. 692. <https://doi.org/10.3390/photonics9100692>
- Gadd G. M., de Rome L. Biosorption of copper by fungal melanins // Appl Microbiol Biotechnol. 1988. Vol. 29. P. 610–617. <https://doi.org/10.1007/2FBF00260993>
- Gajewska J., Floryszak-Wieczorek J., Sobieszczuk-Nowicka E., Mattoo A., Arasimowicz-Jelonek M. Fungal and oomycete pathogens and heavy metals: an inglorious couple in the environment // IMA Fungus. 2022. Vol. 13 (6). <https://doi.org/10.1186/s43008-022-00092-4>
- Golubović-Ćurguz V., Tabaković-Tošić M., Veselinović M., Rajković S. The influence of heavy metals on the growth of pathogenic fungi // Forestry Ideas. 2010. N 16. P. 121–125
- Gorai P. S., Barman S., Gond S. K., Manda N. C. *Trichoderma*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology. 2020. Ch. 28. P. 571–591. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00028>
- Iskandar N. L., Izzati Mohd Zainudin N. A., Tan S. G. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem // J. Environ. Sci. 2011. Vol. 23 (5). P. 824–830. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60475-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60475-5)
- Jaecel P., Krauss G. J., Krauss G. Cadmium and zinc response of the fungi *Heliscus lugdunensis* and *Verticillium cf. alboatrum* isolated from highly polluted water // Sci Total Environ. 2005. N 346. P. 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.scitoenv.2004.12.082>
- Marfenina O. E., Fomicheva G. M., Vasilenko O. V., Naumova E. M., Kul'ko A. B. Sporulation in saprotrophic and clinical strains of *Aspergillus sydowii* (Bain. & Sart.) Thom & Church under various environmental conditions // Microbiology. 2010. Vol. 79 (6). P. 753–758
- Matarese F., Sarrocco S., Gruber S., Seidl – Sei-both V., Vannacci G. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium* // Microbiology. 2012. N 158. P. 98–106. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052639-0>
- Mohammadian E., Babai Ahari A., Arzanlou M., Oustan S., Hossein Khazaei S. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran // Chemosphere. 2017. N 185. P. 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.022>
- Njoku K. L., Asunmo M. O., Ude E. O., Adesuyi A. A., Oyelami A. O. The molecular study of microbial and functional diversity of resistant microbes in heavy metal contaminated soil // Environ. Technol. & Innovation. 2020. N 17. P. 100606. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100606>
- Oladipo O. G., Awotoye O. O., Olayinka A., Bezuidenhout C. C., Maboeta M. S. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites // Brazilian J. Microbiol. 2018. N 49. P. 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.003>
- Ouda S. M. Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* // Res. J. Microbiol. 2014. N 9. P. 34–42. <https://doi.org/10.3923/jm.2014.34.42>
- Palanivel T. M., Pracejus B., Novo L. A. B. Bioremediation of copper using indigenous fungi *Aspergillus species* isolated from an abandoned copper mine soil // Chemosphere. 2023. N 314. P. 137688. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137688>
- Pandaranayaka E. P., Frenkel O., Elad Y., Prusky D., Har-el A. Network analysis exposes core functions in major lifestyles of fungal and oomycete plant pathogens // BMC Genomics. 2019. N 20. P. 1020. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6409-3>

- Paraszkiewicz K., Bernat P., Długoński J. Effect of nickel, copper, and zinc on emulsifier production and saturation of cellular fatty acids in the filamentous fungus *Curvularia lunata* // Int. Biodeterior. Biodegradation. 2009. N 63. P. 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.03.015>
- Pariaud B., Ravigné V., Halkett F., Goyeau H., Carrier J., Lanou C. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens // Plant Pathol. 2009. Vol. 58(3). P. 409–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>
- Pérez-Torres E. J., Camacho-Luna V., Pérez-Ocampo S., Rodríguez-Monroy M., Sepúlveda-Jiménez G. Tolerance to oxidative stress caused by copper (Cu) in *Trichoderma asperellum* To // Biocatalys and Agricult. Biotechnol. 2016. N 29. P. 101783. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101783>
- Rizzo D. M., Blanchette R. A., Palmer M. A. Biosorption of metal ions by *Armillaria rhizomorphs* // Can. J. Bot. 1992. N 70. P. 1515–1520. <https://doi.org/10.1139/b92-190>
- Rola K., Latkowska E., Ogar W., Osyczka P. Towards understanding the effect of heavy metals on mycobiont physiological condition in a widespread metal-tolerant lichen *Cladonia rei* // Chemosphere. 2022. N 308. P. 136365. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136365>
- Sazanov K., Osmolovskaya N., Schiparev S., Yakkonen K., Kuchaeva L., Vlasov D. Organic acids induce tolerance to zinc- and copper-exposed fungi under various growth conditions // Curr Microbiol. 2015. N 70. P. 520–527. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0751-0>
- Siddiquee S., Rovina K., Azad S. A. Heavy metal contaminants removal from wastewater using the potential filamentous fungi biomass: a review // J. Microb. Biochem. Technol. 2015. N 7. P. 384–395. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000243>
- Singh A., Maitreyi M., Tripathi P., Shweta S. Resistance of heavy metals on some pathogenic bacterial species // Afr. J. Microbiol. Res. 2015. N 9. P. 1162–1164. <https://doi.org/10.5897/AJMR2.014.7344>
- Słaba M., Szewczyk R., Piątek M. A., Długoński J. Alachlor oxidation by the filamentous fungus *Paecilomyces marquandii* // J. Hazard. Mater. 2013. N 261. P. 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.064>
- Toledo A. V., Ernesto Franco M. E., Yanil Lopez S. M., Mariñé T., Nazareno Saparrat M. C., Balatti P. A. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2017. N 99. P. 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.04.004>
- Torres-Cruz T. J., Hesse C., Kuske C. R., Porras-Alfaro A. Presence and distribution of heavy metal tolerant fungi in surface soils of a temperate pine forest // Appl. Soil Ecol. 2018. N 131. P. 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.001>

# Resistance and activity of phytopathogenic and potential antagonistic soil filamentous fungi under the action of heavy metals

E. V. FEDOSEEVA<sup>1</sup>, Yu. D. SERGEEVA<sup>2</sup>, V. D. VOLKOVA<sup>2</sup>, D. I. STOM<sup>3, 4</sup>, V. A. TEREKHOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences  
119071, Moscow, Leninsky av., 33*

<sup>2</sup>*Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University  
119991, Moscow, Leninskie Gory, 1, bld. 12*

<sup>3</sup>*Baikal Museum of SB RAS  
664520, Listvyanka, Akademicheskaya str., 1*

<sup>4</sup>*Surgut State University  
628412, Surgut, Lenina av., 1*

The facts of an increase in the proportion of phytopathogenic forms of micromycetes in soils contaminated with heavy metals (HM) make it relevant to study the mechanisms of their resistance, which is important to choose effective phytopathogen control methods. The issues of interaction between metal-resistant phytopathogens and non-pathogenic species against the background of pollution remain no less relevant and need to be studied. In laboratory experiments with pure cultures of four fungal species (phytopathogenic strains *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* and non-pathogenic strains *Trichoderma harzianum* and *Clostridium rosea*), the resistance to Cu, Zn, Pb cations, separately added to nutrient medium with different content of available carbon (sucrose), was studied. Colony growth, sporulation activity, and biomass accumulation were measured. The effective concentrations, resulting in 50 % inhibition of growth parameters (EC<sub>50</sub>), were calculated. The studied fungi showed different resistance to HM. *T. harzianum* and *C. rosea* were more resistant to Zn and Pb at any available carbon content. The pairs *A. alternata*–*C. rosea* and *T. harzianum*–*C. rosea* were the most resistant to Cu on media with lower and higher carbon contents, respectively. At the same time, Zn and Pb turned out to be less toxic than Cu for all fungi. The antagonistic activity, assessed by the dual culture method on media supplemented with HM cations, depended both on the growth characteristics and on the revealed resistance to HM. The activity of fast growing *T. harzianum* as a territorial antagonist was stimulated by the addition of Zn and Pb. The slow-growing *C. rosea* showed competitiveness due to its high resistance to HM. It is concluded that it is necessary to take into account species resistance to HM in order to predict the development of relationships between pathogenic and non-pathogenic species in fungal communities against the background of soil pollution.

**Key words:** soil contamination, pathogens, antagonism, dual culture method, effective concentrations, hormesis.