

4. Ковина А.Л. Микробные агроконсорциумы на основе цианобактерий: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2001. – 23 с.

5. Панкратова Е.М., Трефилова Л.В., Зяблых Р.Ю., Устюжанин И.А. Цианобактерия *Nostoc paludosum* Kutz как основа для создания агрономически полезных микробных ассоциаций на примере бактерий рода *Rhizobium* // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – № 2. – С. 266-272.

6. Трефилова Л.В. Использование цианобактерий в агробиотехнологии: дис. ... канд. биол. наук. – Саратов: 2008. – 162 с.

7. Голлербах М.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. – Л.: Наука, 1969. – 228 с.

8. Горюнова С.В., Горюнова С.В., Ржанова Г.Н., Орлеанский В.К. Сине-зелёные водоросли (Биохимия, физиология, роль в практике). – М.: Наука, 1969. – 230 с.

9. Чан Ван Ни. Физиолого-биохимические основы использования свободноживущих

азотфиксирующих цианобактерий в рисоводстве северного Вьетнама: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Пущино-на-Оке, 1990. – 20 с.

10. Батаева Ю.В., Держинская И.С., Мвале Камуквамба. Биоразнообразие цианобактерий в почвах Астраханской области // Юг России: экология, развитие. 2010. – № 4. – С. 76-78.

11. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для высших учеб. заведений / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 352 с.

12. Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Сине-зелёные водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР. – М.: Сов. наука, 1953.

13. Зенова Г.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли: учебное пособие. – М.: МГУ, 1990. – 80 с.



УДК 574.582

**А.И. Фокина,
С.С. Злобин
Л.И. Домрачева,
Л.В. Трефилова**

СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ГРИБОВ Р. *FUSARIUM* – ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОСОРБЕНТА ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Ключевые слова: биосорбция, грибы рода *Fusarium*, тяжёлые металлы, фитопатогенность, непатогенные штаммы, инокуляция.

Введение

Среди организмов-убиквистов особое место занимают микромицеты р. *Fusarium*, распространённые практически повсеместно. В биологическом плане они представляют крайне неоднородную группу грибов, среди которых имеются ярко выраженные паразиты растений, факультативные паразиты, поражающие, как правило, ослабленные растения и сравнительно многочисленные сапрофиты. Однако в последние десятилетия расширяется круг фузариев-оппортунистов, а паразитические формы становятся все более агрессивными и токсигенными, опережая в своей эволюции эволюцию культурных растений [1]. Поэтому значительные усилия ученых всего мира направлены, в первую очередь, на совершенствование методов борьбы с этим опас-

ным фитопатогеном. Вследствие этого наиболее подробно изучены особенности биологии, физиологии, биохимии и экологии паразитических штаммов фузариев, проведены биохимические определения фузариозных микотоксинов, очерчен круг микробов-антагонистов, которые в большей или меньшей степени обладают фунгистатическими или фунгицидными свойствами [1-3]. В то же время повышается интерес к слабо патогенным штаммам фузариев, которые рассматриваются как перспективные агенты для микоиндикационной оценки загрязнённых территорий [4], как источники получения биологически активных веществ [5] и даже как модельные организмы в разработке методов биологической борьбы с сорной растительностью [6]. Поскольку для многих микроскопических грибов была показана способность к закреплению внутри и на поверхности мицелия тяжёлых металлов (ТМ), извлекаемых из окружающей среды [7], представляется необходимым проведе-

ние в этом направлении исследований, связанных с определением сорбционных возможностей грибов р. *Fusarium*. Это тем более актуально, что устойчивость фузариев к ТМ доказывается постоянным выделением грибов этого рода из загрязненных почв и придорожных экосистем [8].

Цель данной работы – определить биоремедиационные возможности отдельных видов р. *Fusarium* по отношению к ионам таких ТМ, как свинец (Pb^{2+}), никель (Ni^{2+}) и медь (Cu^{2+}).

Для этого решались следующие задачи:

1. Выделение природных изолятов фузариума с пониженным уровнем фитопатогенности.
2. Определение уровня биосорбции ТМ жидкими накопительными культурами фузариума.
3. Сравнение сорбционной способности разновозрастных культур фузариума.
4. Определение защитной роли грибов р. *Fusarium* при выращивании высших растений на средах с повышенным содержанием ТМ.

Объекты и методы

Объектами исследования были три рода грибов р. *Fusarium*: *F. culmorum*, лабораторный штамм, который использовали как эталонный образец фитопатогенности; *F. oxysporum*, выделенный из почвы придорожной зоны г. Кирова, и *F. sp.*, выделенный из атмосферного воздуха над придорожной зоной г. Кирова. Культуры микромицетов поддерживали как в жидкой, так и на агаризованной среде Чапека. Численность грибов р. *Fusarium* определяли стандартным методом – посевом почвенных разведений на агаризованную среду и методом оседания – для выделения и учёта воздушной микрофлоры. Для определения уровня фитопатогенности выделенных штаммов фузариума получали взвесь макроконидий или путем смыва с мицелия, растущего на плотной питательной среде, или отделением от культуральной жидкости. После этого споровую суспензию гриба с титром в пределах $(17,5 \pm 2) \cdot 10^6$ макроконидий/мл использовали для инокуляции семян, которые выращивали в лабораторных, вегетационных и микроделяночных полевых опытах. Остаточное содержание ТМ в растворах после контакта токсикантов с грибами проводили методами фотозлектроколориметрии с ульфарсазеном и атомно-абсорбционного анализа.

Защитное действие испытываемых штаммов на высшее растение определяли в лабораторных опытах при выращивании растений в среде с токсикантом.

Результаты и их обсуждение

Определение уровня фитопатогенности выделенных природных изолятов фузариев. Наши исследования показали, что численность грибов р. *Fusarium* на урбанизированных территориях может достигать 3-15 тыс. КОЕ/г почвы и до 130-200 КОЕ/м³ воздуха. Фузариум, выделенные из почвы и воздуха, легко поддаются культивированию и особенно быстро достигают большой биомассы в жидкой среде.

Для биосорбционных целей желательно использовать штаммы грибов с пониженным уровнем фитопатогенности. Поэтому из множества выделенных штаммов для дальнейшей работы отобрали два, тестирование которых при искусственном заражении семян показало, что они мало опасны для растений. Так, обработка семян ячменя сорта Эльф и пшеницы сорта Маргарита штаммом *Fusarium sp.*, выделенном из воздуха, показала относительно невысокий уровень фитопатогенности данного штамма (табл. 1). Если контрольный штамм *Fusarium culmorum* вызывал 100%-ное поражение проростков пшеницы и почти полную гибель проростков ячменя, то *Fusarium sp.* был безопасен для пшеницы (выживаемость 96%), и только на 13% по сравнению с контролем снижал выживаемость ячменя.

Таблица 1
Выживаемость проростков пшеницы и ячменя после инокуляции семян грибами *F. culmorum* и *Fusarium sp.*

Вариант	Выживаемость проростков, %	
	ячмень	пшеница
Контроль	90	92
<i>Fusarium culmorum</i>	4	0
<i>Fusarium sp.</i>	74	96

В опытах с *F. oxysporum* испытывали более длительное действие микромицета на растение. Вегетационный опыт закладывали с посевом семян горчицы белой в тепличный грунт, помещенный в пластиковые контейнеры, по 20 семян на сосуд в 3-кратной повторности. В опытном варианте семена обрабатывали суспензией гриба. В ходе 4-месячного эксперимента не было обнаружено ни одного больного растения, более того, в опытном варианте прирост сухой надземной массы по сравнению с контролем составил 29% (табл. 2).

В полевом микроделяночном опыте суспензией *F. oxysporum* обрабатывали семена смеси газонных трав Sport, в состав которой входят овсяница красная (40%), мятлик луговой (30%), райграс пастбищный (25%) и

овсяница овечья (5%). Семена высевали в конце мая на делянки площадью 0,25 м² (3-кратная повторность), выделенные на городском газоне. Траву скашивали вручную в начале сентября. Прирост сухой массы в опытном варианте под влиянием микромицета составил почти 100% (табл. 3). Вероятно, большую продуктивность растений в этом варианте можно объяснить минерализационной активностью интродуцированного штамма *F. oxysporum*, в результате которой в ризосфере растений накапливается дополнительный пул элементов минерального питания.

Таблица 2
Влияние *F. oxysporum* на урожай сухой массы горчицы белой (в среднем на сосуд)

Вариант	Сухая масса, г/сосуд	Прирост по отношению к контролю, %
Контроль	6,93±1,05	
<i>F. oxysporum</i>	8,94±0,58	+29

Таблица 3
Влияние *F. oxysporum* на урожай сухой массы газонной травы (микроделяночный опыт)

Вариант	Сухая масса, г/м ²	Прирост по отношению к контролю, %
Контроль	447,5±21,6	
<i>F. oxysporum</i>	879,4±15,3	+96

Таким образом, в серии лабораторных, вегетационных и полевых опытов была доказана слабая фитопатогенность двух природных изолятов фузариума, с которыми продолжили работу по определению их адсорбционной способности.

Определение сорбционной способности *F. oxysporum* по отношению к свинцу. При проведении опыта культуру гриба *F. oxysporum* выращивали на жидкой питательной среде Чапека при разных концентрациях свинца. Максимальная граничная концентрация свинца в растворе, при которой сохраняется жизнедеятельность гриба, лежит в пределах от 8 до 20 ммоль/л. При всех концентрациях этого ТМ, где гриб развивался, свинца в растворе не обнаружено, что свидетельствует о 100%-ном поглощении токсиканта микромицетом. Особенно быстро развития данного гриба в жидкой среде с токсикантом явилось образование пахучих соединений. При этом, чем выше была концентрация свинца, тем сильнее был запах. Подобное явление увеличения выделения пахучих соединений при добавлении в среду ТМ было зарегистрировано для цианобактерий и актиномицетов [9].

Сорбционная способность гриба сохраняется и при работе с высушенным мицелием. Однако уровень поглощения ТМ в данном случае гораздо меньше, чем живой биомассой. Например, из раствора объемом 50 мл с концентрацией ионов свинца 7 мг/л навеска высушенных микромицетов с массой 0,1 г снижает содержание токсиканта в растворе на 80%, в то время как живые микромицеты очищают раствор почти на 100%.

Определение сорбционной способности *F. sp.* по отношению к никелю и меди. Опыты проводились с 7- и 14-суточными культурами гриба. Токсиканты в питательную среду вносили в виде сульфатных солей в концентрации 20 мг/дм³. После суточной экспозиции атомно-абсорбционным методом определяли уровень поглощения токсикантов (табл. 4).

Таблица 4
Степень извлечения токсикантов из раствора культурой гриба *Fusarium sp.*, %

Возраст культуры	Токсикант	
	медь	никель
7 суток	58,8	36,5
14 суток	52,6	20,1

Анализируя полученные результаты, можно видеть, что сорбционная емкость *Fusarium sp.* по отношению к меди намного выше, чем для никеля. Максимальный уровень извлечения меди достигает 58,8%, тогда как для никеля этот показатель всего 36,5%. Факт повышенного накопления меди грибами на урбанизированных территориях отмечен также и для макромицетов [10]. Сравнение сорбционной активности разновозрастных культур показывает, что молодая (7-суточная культура) способна более полно очищать среду от токсиканта по сравнению с более зрелой. Следовательно, при предполагаемом использовании данного штамма в виде сорбента биотехнологически более выгодно сокращать срок выращивания грибных культур.

Защитное действие фузариозной контаминации при выращивании растений в среде с ТМ. Проводили проращивание семян горчицы белой рулонным методом с добавлением в воду сульфата меди с содержанием ионов меди в концентрации 5 мг/дм³ (5 ПДК). Схема опыта, помимо варианта с медью, включала контрольный вариант – артезианскую воду и варианты с обработкой семян *Fusarium sp.*, которые проращивались в чистой воде и в воде с токсикантом. Результаты опыта показали как непатогенность гриба по отношению к горчице, так и существенное снижение токсичности меди для

растения в варианте с фузариозной обработкой семян (табл. 5).

Таблица 5
Снижение токсичности меди для горчицы белой при инокуляции семян *Fusarium sp.*

Вариант	Всхожесть, %
1. Контроль (артезианская вода)	98,5±3,0
2. <i>Fusarium sp.</i>	98,5±1,9
3. Медь	7,0±0,4
4. Медь + <i>Fusarium sp.</i>	23,5±4,7

Таким образом, проведенные исследования показывают перспективность использования выделенных штаммов фузариума для создания биосорбентов при очистке жидких сред от ТМ, а также намечают возможное ремедиационное направление – инокуляцию семян высших растений непатогенными штаммами при выращивании растений в загрязненных средах.

Выводы

1. Из почвы и воздуха урбанизированной территории выделены штаммы *F. oxysporum* и *Fusarium sp.*, практически не обладающие фитопатогенной активностью к заражаемым растениям.

2. Доказан высокий уровень сорбционной способности *F. oxysporum* по отношению к свинцу (100%-ное извлечение элемента из раствора) и *Fusarium sp.* по отношению к меди (58,8%) и никелю (36,5%).

3. Сорбционная активность *Fusarium sp.* зависит от возраста культуры: чем моложе популяция микромицета, тем выше уровень извлечения ТМ из растворов.

4. Слабопатогенные штаммы фузариума обладают ростактивирующей способностью при выращивании растений в вегетационных и полевых условиях, а также защитным действием при выращивании растений в среде с ТМ.

Библиографический список

1. Монастырский О.А. Токсикообразующие грибы, паразитирующие на зерне // Агро XXI. – 2001. – № 11. – С. 6-7.

2. Шахназарова В.Ю., Струнникова О.К., Вишневская Н.А. Развитие внесенной популяции *Fusarium culmorum* в почве: особенности развития и лизиса различных структур гриба // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38. – № 3. – С. 79-88.

3. Domracheva L.I., Shirokikh I.G., Fokina A.I. Anti-*Fusarium* activity of cyanobacteria and actinomycetes in soil and rhizosphere // Microbiology. – 2010. – V. 79. – № 6. – P. 871-876.

4. Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. – М.: Наука, 2007. – 215 с.

5. Хамидова Х.М., Зухритдинова Н.Ю., Ташнулатов Ж. Ростстимулирующая активность микроорганизмов // Биотехнология: состояние и перспективы развития: матер. Междунар. конгресса. – М., 2007. – С. 342.

6. Dor E., Evidancte A., Amalfitano C., Agrelli D., Hershenhorn J. The influence of growth conditions on biomass, toxins and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras*, a potential agent for broomrape biocontrol // Weed Research. – 2007. – V. 47. – № 4. – P. 345-352.

7. White C., Sayer J., Gadd G. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination // Fems Microbiology Reviews. – 1997. – V. 20. – P. 503-516.

8. Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. – М.: Медицина для всех, 2005. – 196 с.

9. Jagi A., Usui T., Fujise D., Jamomoto J. Effect of copper sulfate on growth and odor production of several microorganisms // 28 Congress of the Int. Association of Theoretical and Applied Limnology. – Melbourne, 2003. – V. 3. – P. 1425-1428.

10. Широких А.А., Широких И.Г. Накопление тяжелых металлов ксилотрофными базидиальными грибами в городских экосистемах // Микология и фитопатология. – 2010. – Т. 44. – Вып. 4. – С. 359-366.



УДК 574.14

Б.Н. Мынбаева

АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ И АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ г. АЛМАТЫ

Ключевые слова: экология города, загрязняющие вещества, тяжелые металлы, предельно допустимая концентрация.

Введение

Экологические проблемы крупных городов связаны с чрезмерной концентрацией