

УДК 582.288.4:574.23

## МІКРОСКОПІЧНІ ГРИБИ-ДЕСТРУКТОРИ В УМОВАХ ЛІМІТУВАННЯ ДЖЕРЕЛА ВУГЛЕЦЮ: ОСОБЛИВОСТІ МОРФОЛОГІЇ ТА НАКОПИЧЕННЯ НЕОРГАНІЧНИХ ПОЛІФОСФАТІВ

ТЕТЯНА КОНДРАТЮК

**Анотація.** Охарактеризовано зміни у морфології, радіальній швидкості росту, накопиченні неорганічних поліфосфатів у клітинах мікроскопічних грибів родів *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* та *Penicillium*, які відбуваються в умовах лімітування за джерелом вуглецю. Отримані результати підтверджують різні шляхи реалізації адаптивних реакцій мікроскопічних грибів до даного стресового фактору.

**Ключові слова:** *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, мікроскопічні гриби-деструктори, джерело вуглецю, лімітування, морфологія, неорганічні поліфосфати, адаптація

ННЦ «Інститут біології, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ-601, 01601, Україна; takbiofak@ukr.net

### Вступ

Широкі амплітуди адаптивних реакцій мікроскопічних грибів на дію різноманітних факторів сприяють їх поширенню у найрізноманітніших умовах довкілля, на різних субстратах природного та антропогенного походження, дозволяють їм займати домінуюче положення деструкторів різних виробів та матеріалів в наземному середовищі. Інтенсивність руйнівної дії грибів, у першу чергу, залежить від складу матеріалу (зокрема, наявності в ньому органічних складових), а також від показників вологості (яку матеріалі, так і зовні). У наш час стрімко зростає різноманіття синтетичних полімерних виробів та матеріалів. Вважається, що ріст мікроскопічних грибів на так званих важкодоступних або антропогенно трансформованих субстратах (технічних виробках та матеріалах, у тому числі синтетичних полімерних) можна порівняти до росту в екстремальних умовах. Морфологічні та фізіологічні особливості, якими характеризуються мікроміцети-

деструктори у таких умовах, є відображенням широкої адаптивної життєвої стратегії цих мікроорганізмів (Ермилова *и др.* 2005; Кураков *и др.* 2008).

Відомо, що проявом активної стратегії, яка сприяє формуванню адаптацій мікроміцетів та, відповідно, ефективному освоюванню несприятливого для розвитку середовища (дефіцит глюкози, дія світла, радіації, екстремальних температур, важких металів) є вдосконалення міцеліальної організації таллону, меланізація клітин, зміна швидкості росту, редуція, або, навпаки, інтенсифікація споророшень, зміни у товщині гіфів, септованості міцелію, утворення деформованих клітин, великої кількості хламідоспор, посилення вакуолізація тощо (Жданова и Василевская 1988; Иванова и Марфенина 2008; Потапова 2008).

Уваги дослідників заслуговують питання впливу різних екстремальних факторів на вміст неорганічних поліфосфатів (НПФ) у клітинах мікроскопічних грибів. НПФ є невід'ємними компонентами клітин всіх царств живих організмів. У дріжджів

сахароміцетів, наприклад, які здебільшого є залежними від умов навколишнього середовища, поліфосфати (ПФ) виконують роль резерву фосфату та енергії, який дає можливість швидко переходити з інертної фази розвитку до активного росту та розмноження навіть в умовах стресу різної природи. При фарбуванні ПФ основними барвниками спостерігається явище метахромазії, на підставі чого їх часто називають метахроматиновими гранулами (Кулаев *и др.* 2005; Кулаковская *и др.* 2011). Такі стресові фактори як обмеження кількості неорганічного фосфору в середовищі, тепловий шок, біоциди, спричинюють перерозподіл ПФ за фракціями та зміну довжин їх ланцюгів у мікроскопічних міцеліальних грибів-деструкторів (Перцева *и др.* 2005).

З урахуванням здатності мікроскопічних міцеліальних грибів пошкоджувати найрізноманітніші вироби та матеріали, зокрема синтетичні полімери, дослідження особливостей їх розвитку на малопоживному середовищі є актуальним.

Метою роботи було охарактеризувати особливості морфології мікроскопічних міцеліальних грибів та накопичення ними неорганічних поліфосфатів (НПФ) в умовах лімітування поживних середовищ за джерелом вуглецю.

### Матеріали і методи досліджень

Тест-культурами у роботі слугували чисті культури мікроскопічних грибів із колекції мікроміцетів-деструкторів Київського національного університету імені Тараса Шевченка (ФСКУ): *Alternaria infectoria* Simmons 307 FСКУ, *Alternaria* sp. 716 FСКУ, *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi 446 FСКУ, *Penicillium funiculosum* Thom. 258 FСКУ, різні ізоляти *Cladosporium sphaerospermum* Penz (312-314 та 318 FСКУ). Вказані тест-культури були ізольовані із різноманітних пошкоджених полімерних матеріалів (водоемульсійної акрилової фарби, синтетичного клею, акрилового герметика). Застосовували агаризовані

поживні середовища: картопляно-глюкозний агар (КГА), Чапека-Докса (ЧДА) з різною концентрацією сахарози 0,1%, 0,3% та голодний агар (ГА). Для визначення радіальної швидкості росту тест-культури мікроміцетів висівали методом уколу в чашки Петрі діаметром 90 мм. За результатами щодобових вимірювань обраховували радіальну швидкість росту за формулою:

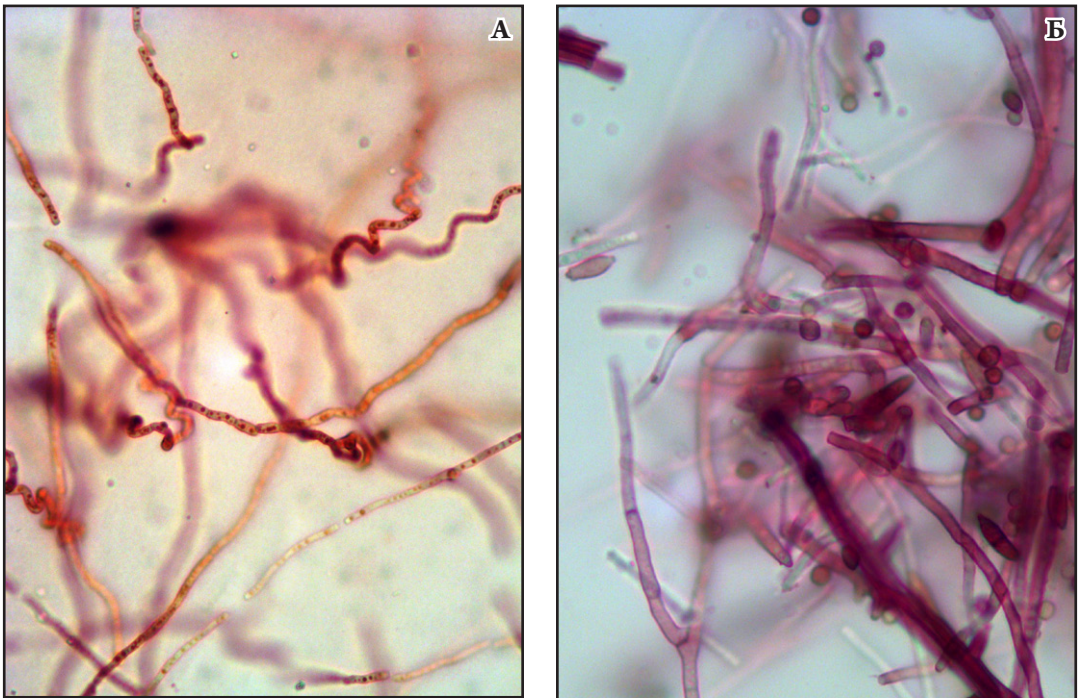
$$K_r = (R_2 - R_1) / (t_2 - t_1),$$

де  $R_1$  і  $R_2$  – радіус колонії у початковий і кінцевий моменти вимірювання відповідно (мм),  $t_1$  і  $t_2$  – час (доба) початку і кінця вимірювання (Паников 1992).

Для дослідження накопичення НПФ у клітинах грибів використовували метод забарвлення 0,02% розчином нейтрального червоного (Барыкина 2004). Морфологічні особливості тест-культур грибів визначали за такими ознаками: наявність змін у морфології вегетативних гіф та репродуктивних структур, наявність, розташування, відносна кількість та форма гранул ПФ. Фотографування проводили за допомогою мікроскопу Primo Star компанії Carl Zeiss при збільшенні  $\times 400$ . Вимірювання товщини гіфів, відстані між септами, діаметру спор здійснювали за допомогою морфометричної комп'ютерної програми Axio Vision. Отримані результати оброблені за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входять у пакет Microsoft Office Professional 2000 (Excel). Для здійснення аналізу морфометричних показників вираховували середнє арифметичне та його похибку. Достовірність результатів досліджень визначали за допомогою  $t$ -критерію Стьюдента (Лакин 1990), рівень значимості  $p \leq 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що на середовищах, лімітованих за джерелом вуглецю, структура та колір колоній тест-культур грибів мали значні відмінності від контрольних варіантів:



**Рис. 1.** Звивисті та потоншені нитки міцелію *Cladosporium sphaerospermum* 312 FCKU на середовищі ЧДА з вмістом сахарози 0,1% (А) та контроль (ЧДА) (Б). Забарвлення нейтральним червоним,  $\times 400$ .

**Fig. 1.** Contorted and widened hyphae of *Cladosporium sphaerospermum* 312 FCKU mycelium in ChDA medium with 0.1% of saccharose content (A), and control, ChDA medium only (B). Stain by red neutral,  $\times 400$ .

спостерігали слабкий розвиток повітряного міцелію, забарвлення колоній змінювалось, проте здатність до росту не втрачалась (Мирошник і Кондратюк 2012).

Міцелій у всіх тест-культур грибів на середовищах, лімітованих за джерелом вуглецю, був значно потоншений: спостерігали утворенням тонких, радіально спрямованих міцеліальних тяжів, так званого “пошукового міцелію”. Подібні утворення вперше охарактеризовано для базидіальних грибів (Камзолкіна 2005), а також виявлено низкою авторів при дослідженні властивостей олігокарботолерантних мікроміцетів, ізолюваних із приміщень 4-го блоку ЧАЕС (Павличенко 2009).

На ГА та на ЧДА з вмістом сахарози 0,1%

та 0,3% у *C. sphaerospermum* ми констатували утворення нехарактерних для даного виду звивистих ниток міцелію (Рис. 1).

Із зниженням вмісту сахарози у середовищі спостерігали скорочення часу спороутворення, змінення кольору спор у грибів родів *Penicillium* та *Aspergillus*. Збільшення відстаней між септами, потоншення вегетативних гіфів в умовах лімітування джерела вуглецю було характерним для *A. versicolor*, *A. infectoria*, *Alternaria* sp. і *Penicillium funiculosum*. На ГА спори *A. versicolor* також були збільшені порівняно з контролем. В усіх досліджених ізолятів *C. sphaerospermum* товщина гіфів змінювалася прямо пропорційно, а відстань між септами – обернено пропорційно вмісту

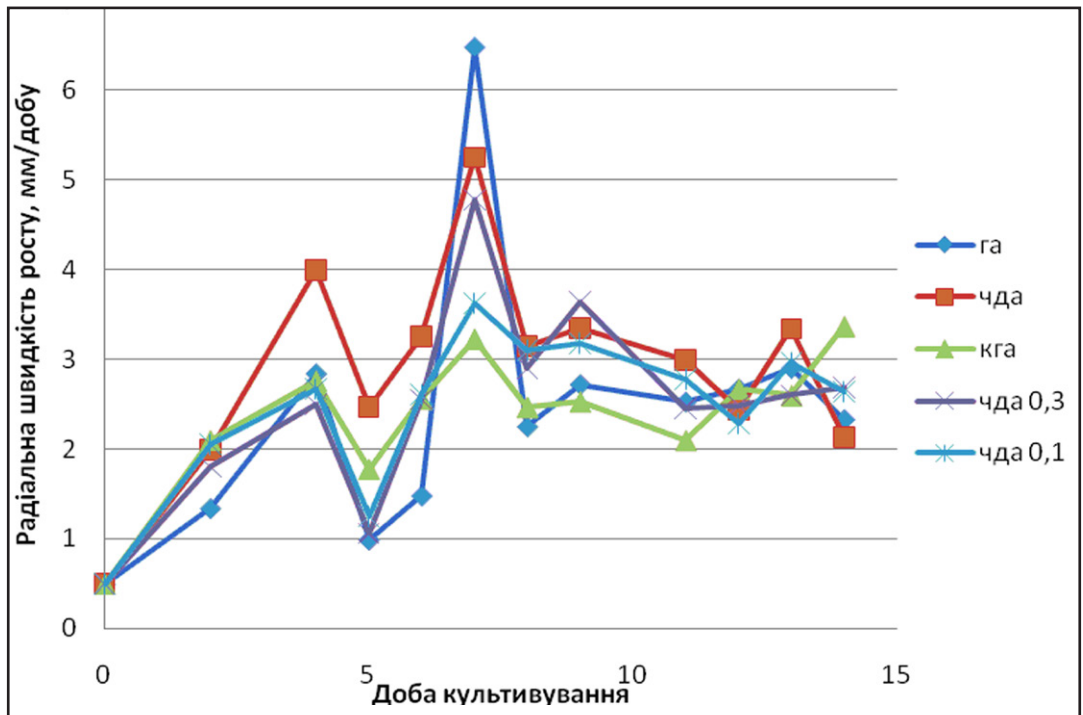


Рис. 2. Криві росту *Cladosporium sphaerospermum* 312 FCKU на досліджуваних середовищах.

Fig. 2. Growth curves of *Cladosporium sphaerospermum* 312 FCKU in investigated media.

джерела вуглецю у середовищі.

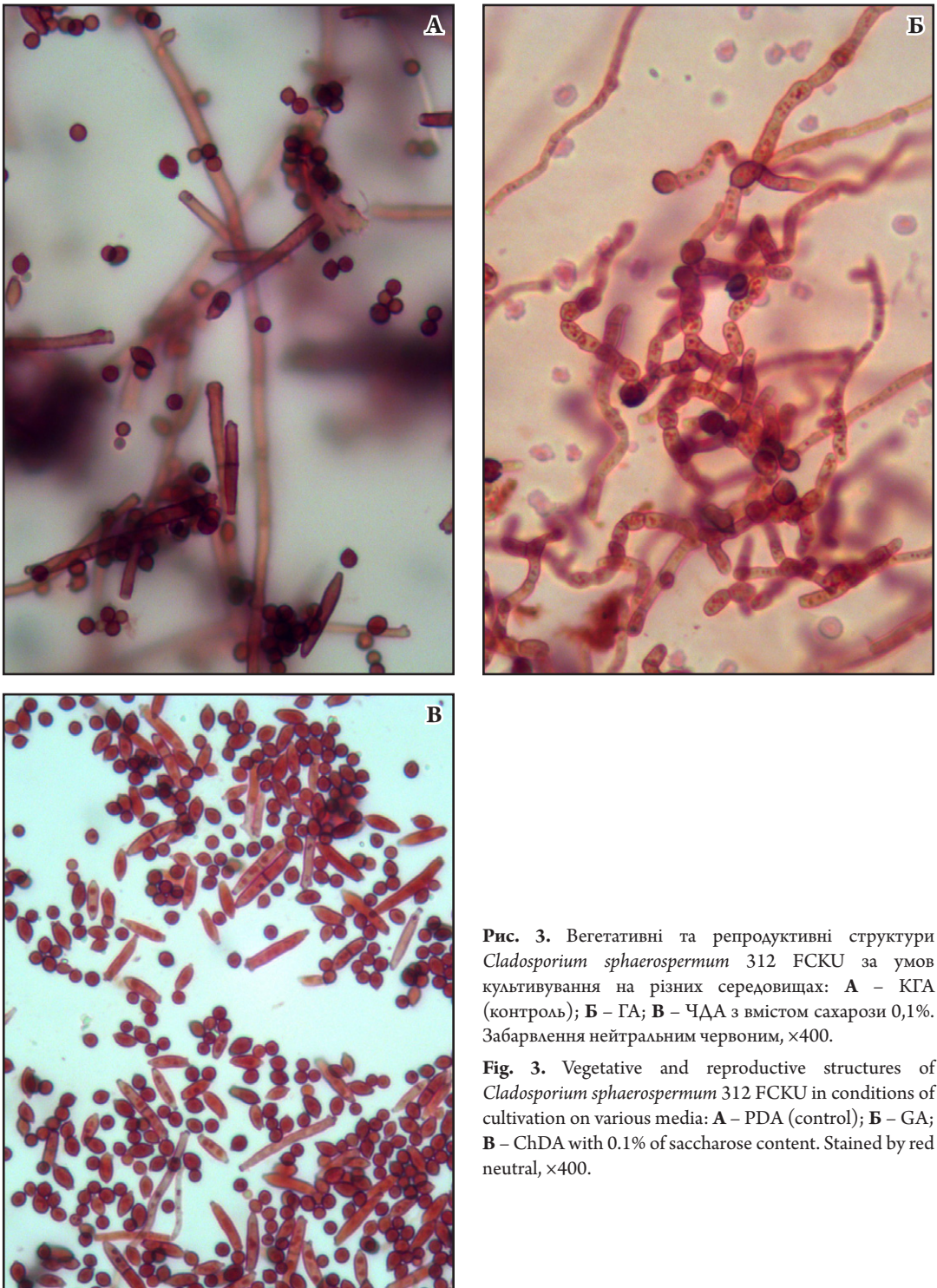
Виявлені нами зміни у морфології тест-культур грибів, а саме утворення клітин нехарактерної форми, зміни у товщині гіфів та міжсептових відстанях, розмірах спор підтверджують дані літератури щодо морфологічних змін мікроскопічних грибів за умов дії екстремальних факторів різної природи (Иванова и Марфенина 2008; Потапова 2008; Павличенко 2009).

Одним із інтегральних показників розвитку мікроміцетів в екстремальних умовах, що відображує їх реакцію на зміни умов середовища, вважається швидкість їх гіфального (радіального) росту на агаризованих середовищах (Блажеєвська и др. 2002). Отримані нами криві швидкості росту тест-культур мікроскопічних міцеліальних грибів в умовах проведених експериментів різнилися між собою. В *A. infectoria* та *P. funiculosum* швидкість росту на середовищах, лімітованих за джерелом вуглецю, була вищою, ніж у контролі.

Радіальна швидкість росту усіх досліджених ізолятів *C. sphaerospermum* мала пікові найвищі значення на 6-7 добу культивування, а характер кривих росту впродовж 14 діб не мав значних відмінностей від контролю (Рис. 2).

Для кривих швидкості росту тест-культур мікроскопічних грибів на всіх досліджених середовищах характерні коливання, які можна пояснити як біоритми, що підтверджується даними літератури (Блажеєвська 2002). За умов обмеження джерела вуглецю можуть спостерігатися відхилення цих коливань від контрольних показників.

У результаті проведених досліджень щодо змін вмісту НПФ у клітинах тест-культур мікроскопічних міцеліальних грибів нами було встановлено, що в умовах лімітування за джерелом вуглецю переважно збільшуються кількість та розміри гранул волютину (НПФ). Так, у *A. infectoria* при розвитку на КГА (контроль) невелика кількість дрібних округлих гранул волютину була



**Рис. 3.** Вегетативні та репродуктивні структури *Cladosporium sphaerospermum* 312 FCKU за умов культивування на різних середовищах: **А** – КГА (контроль); **Б** – ГА; **В** – ЧДА з вмістом сахарози 0,1%. Забарвлення нейтральним червоним,  $\times 400$ .

**Fig. 3.** Vegetative and reproductive structures of *Cladosporium sphaerospermum* 312 FCKU in conditions of cultivation on various media: **A** – PDA (control); **B** – GA; **B** – ChDA with 0.1% of saccharose content. Stained by red neutral,  $\times 400$ .

сконцентрована тільки в окремих гіфах, на ЧДА із вмістом сахарози 0,1% констатували наявність вже значної кількості крупних округлих і видовжених гранул, на ГА – гранули НПФ майже повністю заповнювали весь вільний простір клітин. У гіфах *A. versicolor* на ЧДА (контроль) також було виявлено окремі дрібні округлі гранули НПФ, на ЧДА із вмістом сахарози 0,1% – локальні скупчення дрібних гранул НПФ, на ГА – велику кількість середніх за розміром округлих гранул НПФ. Для ізолятів тест-культур *S. sphaerospermum* констатували збільшення кількості гранул НПФ у клітинах гриба з часом, також важливою особливістю є накопичення поліфосфатів у репродуктивних структурах (Рис. 3) (Кондратюк і Мирошник 2012). Також візуально можна було відмітити зміну інтенсивності забарвлення гранул НПФ, що можна пояснити змінами в якісному складі включень. Як відомо, НПФ мають різні фракції (кислоторозчинну, солерозчинну, лугорозчинну), кожна з яких характеризується розташуванням в різних органелах клітини і в різних частинах самого організму, а також певними значеннями довжини ланцюга НПФ (Кулаєв *и др.* 2005). Відносна кількість НПФ різних фракцій може змінюватись. Так само може змінюватись довжина ланцюгів НПФ в межах фракцій.

### Висновки

Експериментально підтверджено, що за умов росту на середовищах, лімітованих за джерелом вуглецю, відбуваються зміни у радіальній швидкості росту, морфології тест-культур мікроскопічних грибів та накопичення їх клітинами неорганічних поліфосфатів: змінюються щільність та інтенсивність забарвлення колоній, товщина гіфів, міжсептових відстаней у гіфах, формується «пошуковий» міцелій, змінюється форма гіфів вегетативного міцелію, переважно збільшуються кількість та розміри метакрохроматинових гранул.

Морфологічні зміни та особливості накопичення неорганічних поліфосфатів в клітинах досліджуваних мікроскопічних

грибів за умов лімітування джерела вуглецю у середовищі можуть бути відображенням широкої адаптивної життєвої стратегії цих мікроорганізмів, що дозволяє їм виступати активними деструкторами синтетичних полімерних матеріалів.

### Подяка

Автор висловлює щирю подяку Мирошник О.В. за технічну допомогу при виконанні даних досліджень.

### Використані джерела

- БАРЬКИНА Р.П.** 2004. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. Изд-во МГУ, Москва.
- БЛАЖЕВСКАЯ Ю.В., ВЕМБЕР В.В., ЖДАНОВА Н.Н.** 2002. Сравнительный анализ скорости радиального роста микромицетов, выделенных из различных экотопов. *Микробиол. журн.* 3: 3–13
- ЖДАНОВА Н.Н., ВАСИЛЕВСКАЯ А.И.** 1988. Меланинсодержащие грибы в экстремальных условиях. *Наукова думка, Київ.*
- ЕРМИЛОВА О.А., МАКАРЕВИЧ А.В., ГОНЧАРОВА Е.П., ВЛАСОВА Г.М.** 2005. Методы оценки биоразлагаемости полимерных материалов. *Биотехнология* 4: 47–54.
- ИВАНОВА А.Е., МАРФЕНИНА О.Е.** 2008. Морфологические адаптации грибного мицелия и величина минимального ростового модуля в разных экологических условиях. *Вестник ТвГУ* 2: 86–93.
- КАМЗОЛКИНА О.В.** 2005. Микроморфология и ультраструктура агарикоидных грибов на разных стадиях жизненных циклов: автореф. дис... докт. биол. наук: 03.00.24. Москва.
- КОНДРАТЮК Т.О., МИРОШНИК О.В.** 2012. Зміни вмісту неорганічних поліфосфатів як прояв адаптаційних стратегій мікроміцетів-деструкторів в умовах лімітування джерела вуглецю. *Адаптаційні стратегії живих систем (тезиси докл. дисциплін. науч. конф., Новий Свет, 11-16 июня 2012 г.):* 379–380. Издатель В.С. Мартынюк, Киев.
- КУЛАЕВ И.С., ВАГАБОВ В.Н., КУЛАКОВСКАЯ Т.В.** 2005. Высокмолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. *Науч. Мир, Москва.*
- КУЛАКОВСКАЯ Е.В., ВАГАБОВ В.М., ИВАНОВ А.Ю. и др.** 2011. Неорганические полифосфаты и чувствительность клеток *Saccharomyces cerevisiae* к мембраноповреждающим агентам. *Микробиология* 1: 13–17.

- КУРАКОВ А.В., ГЕВОРКЯН С.А., ГОГИНЯН В.Б., ОЗЕРСКАЯ С.М. 2008.** Разнообразие и особенности состава микроскопических грибов на синтетических полимерных материалах. *Прикл. биохим. и микробиол.* 2: 232–235.
- ЛАКИН Г.Ф. 1990.** Биометрия. Высшая школа, Москва.
- МИРОШНИК О., КОНДРАТЮК Т. 2012.** Радіальна швидкість росту мікроскопічних міцеліальних грибів за умов лімітування за джерелом вуглецю. *Молодь та поступ біології (збірник тез VIII міжнар. наук. конф. студ. та аспірантів, Львів, 3-6 квітня 2012 р.)*: 107–108. Сполом, Львів.
- ПАВЛИЧЕНКО А.К. 2009.** Еколого-фізіологічні та морфологічні особливості мікроскопічних грибів, виділених з приміщень 4-го блоку Чорнобильської АЕС: автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.07. Київ.
- ПАНИКОВ Н.С. 1992.** Кинетика роста микроорганизмов: общие закономерности и экологические приложения. Наука, Москва.
- ПЕРЦЕВА А.Д., СМІРНОВ В.Ф., ВОРОНИНА О.В. 2005.** Влияние экстремальных воздействий на содержание полифосфатов и полифосфатную активность у микромицетов-деструкторов полимерных материалов. *Микология и фитопатология* 1: 53–58.
- ПОТАПОВА Т.В., АЛЕКСЕЕВСКИЙ Т.А., БОЙЦОВА Л.Ю. 2008.** Верхушечный рост *Neurospora crassa* при дефиците глюкозы. *Биологич. мембраны* 4: 252–258.

**MICROSCOPIC FUNGI DESTRUCTORS IN CONDITIONS OF RESTRICTED CARBON SOURCE: MORPHOLOGY AND ACCUMULATION OF INORGANIC POLYPHOSPHATES**

TETIANA KONDRATYUK

**Abstract.** Exchanges of morphology, speed of radial growth, and accommodation of inorganic polyphosphates in cells of microscopic fungi of the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* in condition of carbon limitation are characterized. Results obtained confirm existence of various ways of realization of adoptive responses of microscopic fungi to this stress factor.

**Key words:** *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, microscopic fungi, destructors, carbon source, restriction, morphology, inorganic polyphosphates, adaptation

'Institute of Biology' Scientific Educational Centre, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska str. 64/13, 01601 Kyiv, Ukraine; takbiofak@ukr.net