

ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ГРИБОВ НА ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Т. И. Тугай¹, В. А. Желтоножский², Л. В. Садовников²¹ Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев² Институт ядерных исследований НАН Украины, Киев

Изучены адаптивные реакции грибов, относящихся к семействам *Dematiaceae* и *Moniliaceae* по отношению к действию ионизирующего излучения. Под влиянием излучения различного типа наблюдалась радиостимуляция у исследуемых штаммов. Уровень такой стимуляции зависит от ряда факторов – природы источника излучения, его активности и наличия пигментов в клеточной стенке грибов.

В настоящее время огромное внимание уделяется проблеме биоремедиации загрязненных почв. Биотехнологически наиболее рациональным подходом является разработка новых методов ремедиации с участием соответствующих микроорганизмов. Чернобыльская катастрофа привела к радионуклидному загрязнению огромных территорий [1, 22]. Существенная часть выбросов и по настоящее время находится в почве территории 10-километровой зоны отчуждения ЧАЭС, во внутренних помещениях объекта «Укрытие», являясь природным полигоном для изучения и последующей оценки биологического действия хронического облучения на биоту.

Как известно, грибы представляют собой обширную группу организмов, по количеству видов они являются второй группой после насекомых. В почве биомасса грибов преобладает, составляя до 90 % от массы прокариот и беспозвоночных [3], в силу этого обстоятельства им принадлежит существенная роль в процессах трансформации радиоактивных частиц с высокой удельной активностью и переводению их в растворимую форму, способную включиться в миграционные процессы в почве и в трофические цепи. Этот факт определил необходимость и значимость оценки биологического действия хронического облучения прежде всего на микобиоту.

Важное значение приобретают все аспекты, связанные с пролонгированным влиянием радиации, как с неблагоприятными, так и с внешне благоприятными эффектами [4, 5].

В литературе известны данные о процессах радиостимуляции у животных, бактерий, растений [6 - 8]. Данные же относительно влияния такого рода на клетки грибов практически отсутствуют.

Ранее при проведении экологического мониторинга состояния микобиоты загрязненных радионуклидами почв 30-километровой зоны было показано, что в 1986 - 1988 гг. в этих почвах преобладали темноцветные (меланинсодержащие) микромицеты [9 - 11]. В продолжение этих исследований в 1987 - 1989 гг. была прослежена динамика содержания грибного мицелия при снижении уровня радиоактивности почв на один-два порядка и установлено, что преобладание темнопигментированного мицелия сменилось доминированием светлоокрашенного [12]. Такой факт может быть обусловлен тем, что под влиянием длительного воздействия радиации происходит формирование у микромицетов адаптивных реакций к этому, ставшему уже постоянным, фактору антропогенной нагрузки.

Целью данной работы было изучение ответных реакций грибов, выделенных как из радиоактивных, так и из радиационночистых субстратов, на действие источников излучения различного типа в зависимости от типа пигментов грибов.

Материалы и методы

Объекты исследований. Объектами исследования служили грибы, представители двух семейств *Dematiaceae* и *Moniliaceae*, темно- и светлопигментированные соответственно. Исследуемые штаммы были изолированы из почвы 30-километровой зоны отчуждения, с

поверхности «горячих» частиц и внутренних помещений 4-го блока (объекта «Укрытие»), а также выделены из нерадиоактивных почв.

Темнопигментированные штаммы были представлены видами рода *Cladosporium*: *C. cladosporioides* 396, 4, *C. shaerospermum* 70, *C. chlorocephalum* 21, а светлопигментированные штаммы представлены видами рода *Penicillium*: *P. roseo-purpureum* 147, *P. roseo-purpureum* 15r, *P. hirsutum* 1, *P. aurantiogriseum* 60, *P. steckii* 2.

Грибы выделяли и культивировали на сусло- и глюкозо-картофельном агаре. В работе использовали культуры 14-суточного возраста, которые культивировали при термостатированной температуре 22 - 24 °С. Все используемые штаммы хранятся в настоящее время в коллекции отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины на агаризованных средах при температуре 4 °С.

Модельная система. Исследования проводили в модельных системах, включающих один из двух коллимированных источников излучения (^{123}Te или ^{137}Cs), среду Чапека (сахароза – 100 мг/л) и стандартизованную в ней суспензию конидий грибов ($1 \cdot 10^6$ конд/мл), которые культивировали при термостатированной температуре 22 - 24 °С.

Контрольные образцы культивировали в этих же условиях, но не подвергая воздействию ионизирующего излучения от этих источников (на приведенных рисунках контроль обозначен штриховкой).

Суспензия конидий грибов подвергалась действию хронического облучения низкой интенсивности в течение от 5 до 8 сут, что определялось особенностями роста исследуемых штаммов. Поглощенная доза при этом составляла 100 - 150 Гр/образец.

О влиянии γ -излучения (при этом β -частицы отсекались при помощи алюминиевого экрана толщиной 3мм) и смешанного ($\gamma + \beta$) излучения судили по: проценту прорастания конидий и длине ростковых гиф. Все измерения выполнены в сравнении с контрольными образцами (без влияния радиации) в одно и то же время.

После окончания культивации фиксировали исследуемые параметры под световым микроскопом с помощью цифровой камеры Nikon Coolpix 3500 и дальнейшую обработку измерений процента прорастания конидий и длины ростковых гиф проводили, используя компьютерную программу «Scion image».

Характеристика источников излучения. Данные исследования проведены с использованием источников излучения двух типов: практически чистый γ -излучатель ^{123}Te с энергией излучения 159 кэВ активностью $10^4 - 10^5$ Бк и ^{137}Cs -источник смешанного типа излучения ($\beta + \gamma$) с энергией излучения 662 кэВ и активностью $10^4 - 10^5$ Бк. Все источники были помещены в канал свинцовой защиты, который заканчивается коллиматором с диаметром выходного отверстия 1мм и толщиной стенки 40 мм. По этому каналу источники могли передвигаться, приближаясь или удаляясь относительно коллиматора, что позволяло изменять активность на выходе коллиматора в вышеуказанных пределах.

Полученные данные обработаны статистически, с помощью пакета программ Excel.

Результаты и обсуждение

При изучении широты распространения явления радиотропизма у грибов было показано, что этим свойством, в большинстве своем, обладают штаммы, выделенные из загрязненных радионуклидами мест. Для большинства этих штаммов было характерно наличие пигментов не только меланиновой природы в клеточной стенке. Это обстоятельство послужило предпосылкой для изучения в сравнительном аспекте ответных реакций на действие ионизирующего излучения у грибов, принадлежащих к двум семействам *Dematiaceae* и *Moniliaceae*, темно- и светлопигментированным, в клеточных стенках которых присутствуют пигменты меланиновой и хиноновой природы соответственно (таблица).

У исследуемых темнопигментированных штаммов под влиянием ^{137}Cs отмечено незначительное увеличение количества проросших конидий по отношению к контролю (рис. 1), за исключением *Cladosporium sphaerospermum*-70, у которого наблюдается значительная активация этого процесса.

Характеристика штаммов микромицетов, представителей семейств *Dematiaceae* и *Moniliaceae*

№	Виды	Штаммы	Место и время выделения	Радиоактивность субстрата на время выделения
Темнопигментированные <i>Dematiaceae</i>				
1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4	Почва 10-километровой зоны ЧАЭС, 1986 г.	$4,05 \cdot 10^7$ Бк/кг
2	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	70	Помещение объекта «Укрытие», 1997 г.	150 мР/ч
3	<i>Cladosporium chlorocephalum</i>	21	Помещение объекта «Укрытие», 2001 г.	300 мР/ч
4	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	396	Черноземные почвы восточной Украины, 1957 г.	Контроль
Светлопигментированные <i>Moniliaceae</i>				
5	<i>Penicillium roseo-purpureum</i>	147	Почва «Рыжего леса», 1987 г.	$1,4 \cdot 10^6$ Бк/кг
6	<i>Penicillium steckii</i>	2	«Горячая» частица, 2002 г.	$6 \cdot 10^4$ Бк
7	<i>Penicillium hirsutum</i>	1	«Горячая» частица, 2002 г.	$6 \cdot 10^4$ Бк
8	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	60	Помещение объекта «Укрытие», 2003 г.	380 мР/ч

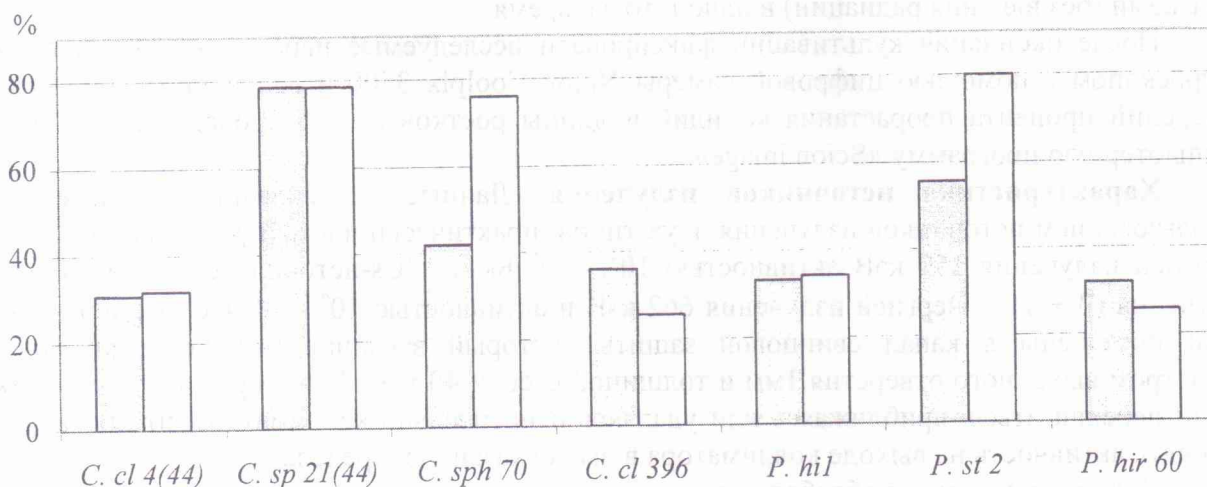


Рис. 1. Влияние ионизирующего излучения источника ^{137}Cs на процент прорастания конидий некоторых представителей семейств *Dematiaceae* и *Moniliaceae*. (Контроль заштрихован.)

У исследуемых светлопигментированных штаммов наибольшая активация прорастания конидий отмечена только у *Penicillium steckii* (см. рис. 1). Действие излучения ^{137}Cs на этот процесс у двух штаммов *P. hirsutum* 1 и *P. aurantiogriseum* 60 выражено незначительно.

Стимулирующее действие на величину ростковых гиф под влиянием действия коллимированного источника излучения смешанного типа ^{137}Cs с активностью $1,9 \cdot 10^4$ Бк было отмечено у большинства изученных как светло-, так и темнопигментированных (рис. 2) штаммов. Их можно расположить по степени возрастания эффекта следующим образом: *Cladosporium cladosporioides* 396 (10%), *Penicillium hirsutum* 1 (15%), наибольшее увеличение длины конидий более 40% под влиянием ^{137}Cs отмечено у *Cladosporium cladosporioides* 4, *Cladosporium sphaerospermum* 70, у *Penicillium steckii* 2 и *Penicillium aurantiogriseum* 60.

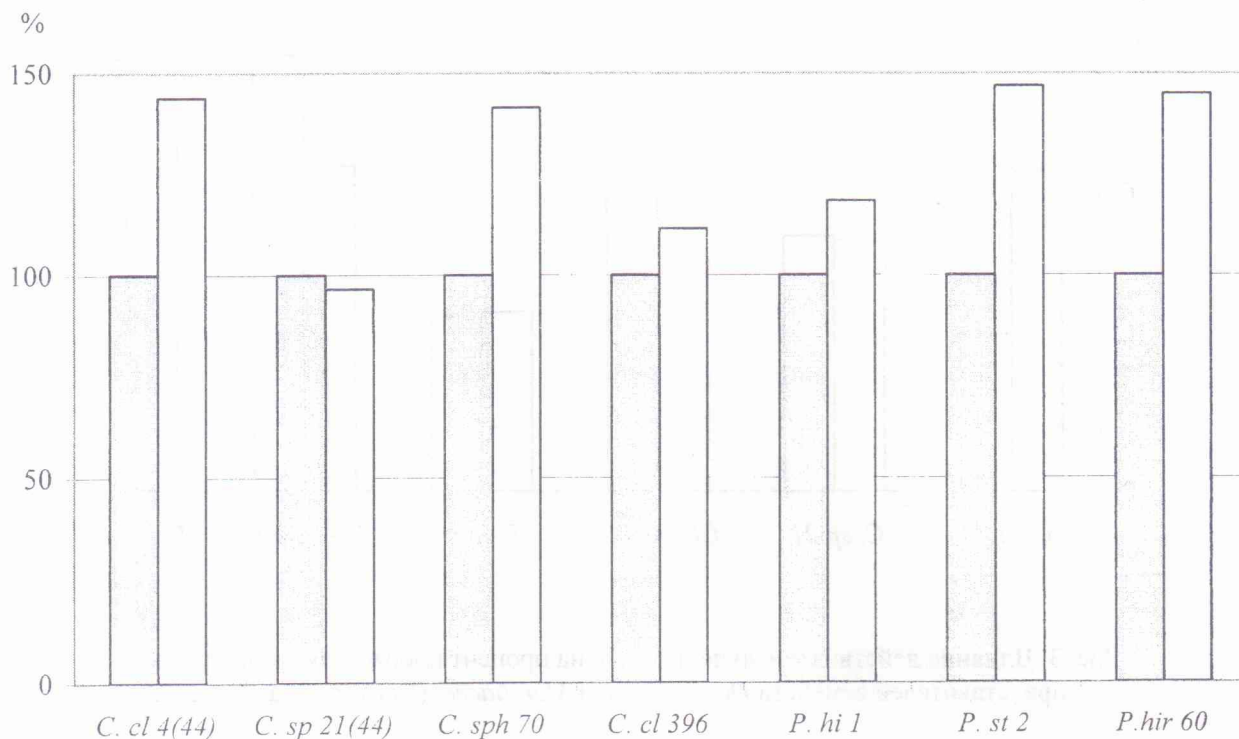


Рис. 2. Влияние ионизирующего излучения ^{137}Cs на длину ростковых гиф некоторых представителей семейств *Dematiaceae* и *Moniliaceae* (Контроль заштрихован.)

Полученные данные свидетельствуют о том, что реакция на действие используемого источника излучения определяется прежде всего особенностями этих штаммов, не связанными со степенью пигментации мицелия, так как у этих штаммов проявилась сравнимая по величине радиотропная реакция, несмотря на различия в их пигментации.

Несколько отличное действие оказало на величину прорастания конидий практически чистое γ -излучение ^{123}Te с активностью 10^5 Бк (рис. 3). Так, у *C. cladosporioides* 4 наблюдалось ингибирование, у *C. chlorocephalum* 21 и *P. hirsutum* 1 не было отмечено существенного влияния, а у *C. sphearospermum* 70, *P. steckii* 2, *P. roseo-purpureum* 147 была активация этого процесса по отношению к контролю. Таким образом, влияние практически чистого γ -излучения на величину прорастания конидий не определяется типом пигментов в клеточной стенке грибов, а проявляется как у темно-, так и (даже более выражено) у светло-пигментированных штаммов.

Под влиянием γ -излучения малой интенсивности обнаружена активация длины ростковых гиф у всех исследуемых штаммов (рис. 4). По степени увеличения выраженности этого эффекта их можно расположить следующим образом: *C. cladosporioides* 4 (5%), *P. hirsutum* 1 (10%), *C. sphearospermum* 70 (30%), *P. roseo-purpureum* 147 (80%), *C. chlorocephalum* 21 (95%), *P. steckii* 2 (245%).

Очевидно, что активирующее действие источника γ -излучения значительно превышает таковое источника смешанного типа излучения в диапазоне используемых активностей. Под влиянием излучения различного типа обнаружен эффект радиостимуляции, что показано впервые для микромицетов. Уровень радиостимуляции зависит от ряда факторов – природы источника излучения, его активности и наличия пигментов в клеточной стенке грибов.

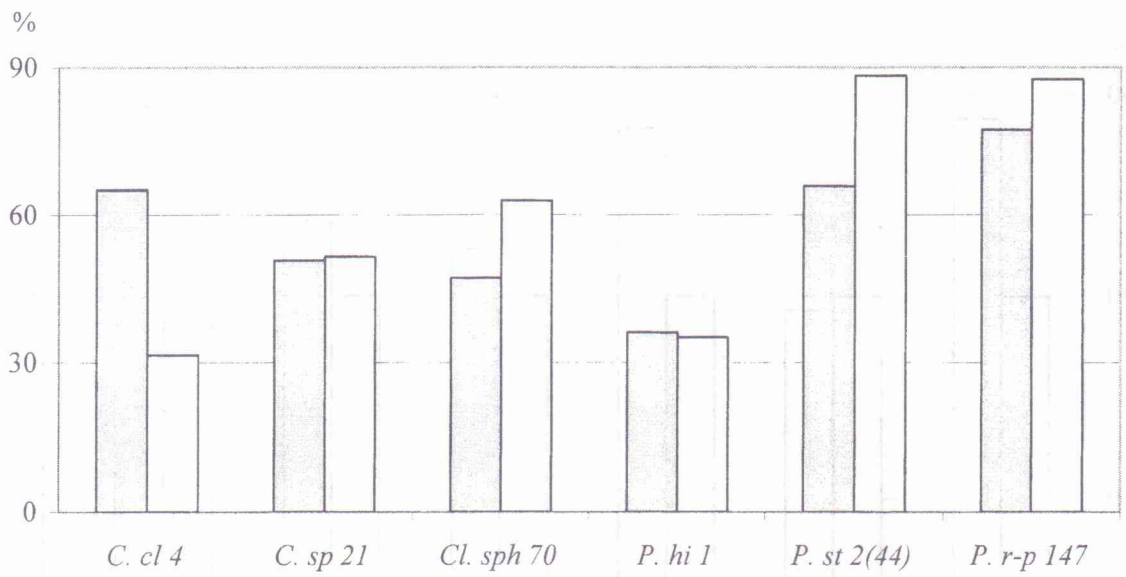


Рис. 3. Влияние действия γ -излучения ^{123}Te на процент прорастания конидий некоторых представителей семейств *Dematiaceae* и *Moniliaceae*. (Контроль заштрихован.)

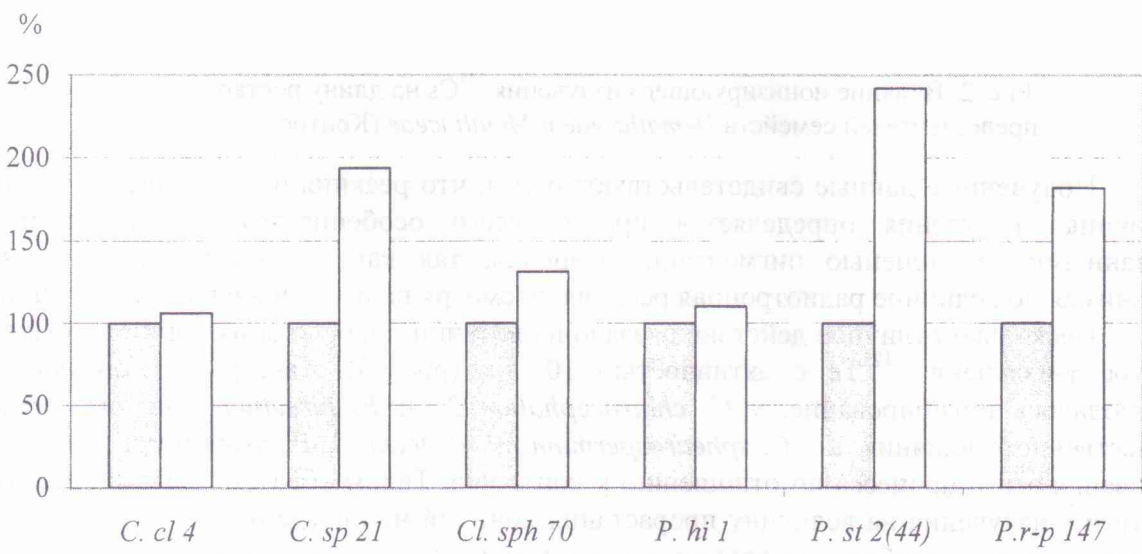


Рис. 4. Влияние γ -излучения ^{123}Te на длину ростковых гиф некоторых представителей семейств *Dematiaceae* и *Moniliaceae*. (Контроль заштрихован.)

У исследуемых нами почвенных грибов адаптивный эффект наблюдался при дозах на три порядка выше такового для животных клеток и на порядок выше, чем для растительных объектов. Такая высокая устойчивость микромицетов делает их весьма перспективными при использовании в процессах ремедиации почв и других субстратов, загрязненных радионуклидами.

Проявление эффектов радиостимуляции у микромицетов при таких больших дозах облучения определяется, по всей видимости, рядом факторов - наличием пигментов в клеточной стенке, обладающих радиопротекторными свойствами, и активацией разного рода адаптивных механизмов внутри клетки, приводящих не только к повышению радиостойчивости, но и к значительной активации процессов жизнедеятельности.

В настоящее время существует много данных относительно адаптивного ответа биологических объектов [13 - 16], проявляющегося как: снижение чувствительности их к большой дозе повреждающего агента в результате предварительного воздействия малой дозы, стимуляция пролиферации бактериальных растительных и животных клеток [6, 7, 17] и интенсификация различных биохимических и физиологических процессов [14, 16] при облучении клеток и целостного организма.

Положительное влияние малых доз является дискуссионным вопросом. Оно может быть связано или с улучшением показателей жизнедеятельности в организме, или же только уменьшает повреждение, наносимое внешним агентом. В последнем случае рассматриваются также два механизма: индукция дополнительных репаративных систем либо перекомпенсация при восстановлении от повреждения имеющимися в клетках внутренними ресурсами [8, 13]. Многие авторы связывают такого рода эффекты с воздействием радиации на клеточные мембраны [13, 14]. При нарушении их барьерных свойств клетка теряет часть низкомолекулярных субстратов, что активирует метаболизм по механизму неспецифической регуляции активности ферментов такими соединениями [7, 13, 14]. Однако эти исследования выполнены на клетках животных, относительно грибных объектов такие данные отсутствуют.

В работе выбор активностей используемых источников излучения основывался на данных, полученных ранее при проведении исследований по разрушению «горячих» частиц при использовании других штаммов микромицетов. Однако следует помнить, что определяющим при изучении малых и близких к ним доз являются экспериментально установленные границы доз, оказывающие максимальный активирующий эффект [4, 5].

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать ряд обобщений.

1. С помощью модельной системы установлено, что хроническое облучение оказывает стимулирующее действие на исследуемые штаммы, относящиеся к родам *Cladosporium* и *Penicillium*. Это, возможно, связано со сформировавшимся адаптивным эффектом к действию радиации у этих штаммов, находившихся длительное время на загрязненных радионуклидами территориях.

2. Величина ответных реакций не связана напрямую с различиями в пигментации исследуемых штаммов.

3. Влияние источника γ -излучения ^{123}Te значительно более выраженное, чем источника смешанного типа излучения ^{137}Cs . Следует отметить, что оба источника обладали близкими значениями активностей (от 10^4 до 10^6 Бк). Однако энергия этих источников существенно отличалась и составляла 159 и 662 кэВ, что и могло быть определяющим в проявлении их действия.

4. Проявление адаптивных ответов наблюдалось при дозах порядка 100 - 150 Гр/образец, что свидетельствует о высокой устойчивости изученных микромицетов к такому фактору антропогенной нагрузки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IAEA (1996). 10 Years on – The accident at the Chernobyl atomic energy power plant and its consequences. Summary report on the post-accident review meeting on the Chernobyl Accident. Int. Atomic Energy Agency, Vienna: IAEA Safety Series N 75-INSAG-1.
2. Zheltonozhsky V., Mück K., Bondarkov M. Classification of hot particles from the Chernobyl accident and nuclear weapons detonations by non-destructive methods // J. Environ. Radioactivity. - 2001. - Vol. 57. - P. 151 - 166.
3. Дьяков Ю.Т. // Биология. Соревольский образовательный журнал. - 1997. - № 3. - С. 38 - 45.
4. Calabrese E.J., Baldwin L.A. Tales of two similar hypothesis: the rise and fall of chemical and radiation hormesis // BELLE newsletter. - 1999. - Vol. 8. - P. 47 - 66.
5. Calabrese E.J., Baldwin L.A. Radiation hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis // Human and Experimental Toxicology. - 2000. - Vol. 19. - P. 41 - 75.
6. Филиппович И.В. // Радиобиология. - 1991. - Т. 31, № 6. - С. 803 - 814.
7. Кузин А.М. Идеи радиационного гормезиса в атомном веке. - М.: Наука, 1995. - 158 с.

8. Котеров А.Н., Никольский А.В. Адаптация к облучению *in vivo* // Радиационная биология. Радиозэкология. - 1993. - Т. 39, № 6. - С. 648 - 662.
9. Жданова Н.Н., Василевская А.И., Артышкова Л.В., Гаврилюк В.И. Видовой состав микромицетов загрязненных радионуклидами почв // Микология и фитопатология. - 1990. - Т. 24, № 4. - С. 293 - 308.
10. Жданова Н.Н., Василевская А.И., Артышкова Л.В. и др. Динамика комплексов микромицетов загрязненных радионуклидами почв // Там же. - Т. 24, № 6. - С. 504 - 512.
11. Жданова Н.Н., Василевская А.И., Артышкова Л.В. и др. Комплексы почвенных микромицетов в зоне влияния ЧАЭС // Микробиол. журн. - 1991. - Т. 53, № 4. - С. 3 - 9.
12. Василевская А.И., Жданова Н.Н., Гаврилюк В.И. Динамика содержания грибного мицелия в почвах стационаров в 30-километровой зоне ЧАЭС // Там же. - 1993. - Т. 55, № 4. - С. 8 - 15.
13. Эйдус Л.Х. О механизме инициации эффектов малых доз // Радиационная биология. Радиозэкология. - 1994. - Т. 34, № 6. - С. 748 - 758.
14. Котеров А.Н., Никольский А.В. Молекулярные и клеточные механизмы адаптивного ответа у эукариот // Укр. биохим. журн. - 1999. - Т. 71, № 3. - С. 13 - 25.
15. Zhdanova N.N., Redchits T.I., Tugay T.I. et al. Biological activity of fungi isolated from localities of high radioactive pollution // Abstracts XIV Congress of European mycologists, Katsiveli, Ukraine, 2003. - P. 27.
16. Tugay T.I., Zhdanova N.N., Redchits T.I. et al. Response reactions of some micromycetes to the influence of low doses of radioactivity // Ibid.
17. Khandogina E.K., Mutovin G.R., Zvereva S.V. et al. // Mutat. Res. - 1991. - Vol. 251. - P. 181 - 186.
18. Снитковский Д.М. О некоторых новых биофизических и биологических аспектах механизмов при воздействии малых и близких к ним доз ионизирующих излучений (низких ЛПЭ) на клетки эукариотов // Радиационная биология. Радиозэкология. - 1999. - Т. 39, № 1. - С. 145 - 155.

РЕАКЦІЇ-ВІДПОВІДІ ГРИБІВ НА ДІЮ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

Т. І. Тугай, В. О. Желтоножський, Л. В. Садовніков

Вивчено реакції-відповіді грибів, представників родин *Dematiaceae* та *Moniliaceae* щодо дії іонізуючого випромінювання. Показано, що під впливом різних типів випромінювання спостерігався ефект радіостимуляції досліджуваних штамів. Рівень радіостимуляції залежав від ряду факторів: природи джерел випромінювання, їх активності та присутності пігментів у клітинних стінках грибів.

RESPONSE REACTIONS OF FUNGI UNDER EXPOSURE OF IONIZING IRRADIATION

T. I. Tugay, V. A. Zheltonozhsky, L. V. Sadovnikov

Dematiaceae and *Moniliaceae* family fungi response reactions under the exposure of ionizing irradiation were investigated. Under exposure of different type of irradiation effect of radio stimulation was shown. The level of radiostimulation depends on some factors: the nature of irradiation sources, their activity, the presence of pigments in cell wall.

Поступила в редакцію 17.05.04,
после доработки – 04.10.04.