

Влияние света на меланиногенез *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries

М. А. Фомина*, Е. Н. Громозова, В. С. Подгорский

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины,
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 154

*Исследовали действие света и УФ-облучения на меланиногенез *C. cladosporioides*. Показано, что эти факторы не оказывают решающего воздействия на процессы синтеза меланина. Выдвинуто предположение о конститутивной природе синтеза пигмента у такого представителя "черной расы" грибов, как *C. cladosporioides*.*

Введение. Очевидно, что фотобиологические эффекты играют одну из решающих ролей в пигментогенезе микроорганизмов. Поэтому исследование влияния электромагнитного излучения в видимой и УФ областях спектра на процессы образования пигментов у грибов являются очень актуальными. Особенно интересными представляются вопросы, связанные с синтезом наиболее универсальных защитных пигментов — меланинов, обладающих исключительно широкой областью интенсивного поглощения электромагнитных колебаний в видимой и УФ диапазонах.

Накопленный фактический материал свидетельствует о неоднозначном действии света на процессы меланиногенеза [1—3]. Целью нашей работы было исследование влияния света в видимой и УФ области спектра на биосинтез меланина *C. cladosporioides* — перспективного продуцента пигментного препарата с радиопротекторными и детоксикантными свойствами [4—6].

Материалы и методы. Объектом исследования был темноокрашенный гриб *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries, выделенный из почвы [5, 7].

Культивирование микромицета осуществляли в колбах на качалках при 160 об/мин и 20—23 °С на модифицированной среде Чапека [8]. В качестве инокулюма использовали стандартную споровую суспензию ($1 \cdot 10^6$ конидий в 1 мл). При исследовании влияния света в видимой области спектра на меланиногенез применяли лампу дневного света (ЛД; $\lambda = 400\text{—}700$ нм; $\lambda_{\text{max}} = 480\text{—}610$ нм; мощность — 120 Вт), установленную на расстоянии 5 м от объекта. Контролем служили колбы, изолированные от света. Споры и вегетативный мицелий облучали УФ (лампа БУВ 15, 1 м от объекта, $\lambda = 254$ нм) общепринятыми методами с соответствующими заданным условиям модификациями [9, 10].

В процессе периодического роста культуры количество биомассы определяли весовым методом, содержание в мицелии меланина — методом кислотного выделения пигмента [11]. В полученном препарате меланина

*Correspondence address.

регистрировали сигналы электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [12]. Статистическую обработку результатов осуществляли по Ашмарину [13].

Результаты и обсуждение. Известно, что свет является необходимым условием для синтеза меланина в клетках некоторых грибов [2]. В связи с этим особый интерес представляло исследование действия света на синтез пигмента темноокрашенным *C. cladosporioides* и, в частности, возможность фотостимулирования меланиногенеза у данного микромицета. Ранее нами было установлено, что оптимальным сроком для получения грибного меланина *C. cladosporioides* являются 5-е сут, соответствующие началу стационарной фазы периодического роста [8]. Поэтому основным критерием для оценки фотоэффектов на меланиногенез были выбраны показатели роста биомассы и синтеза пигмента в этот период. Эти показатели анализировали также в конце экспоненциального роста (4-е сут) и в поздней стационарной фазе (8-е сут).

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что по количеству пигмента в стационарной фазе (5-е и 8-е сут) контрольный и постоянно освещавшийся мицелий не отличаются (рис. 1). Хотя в конце фазы

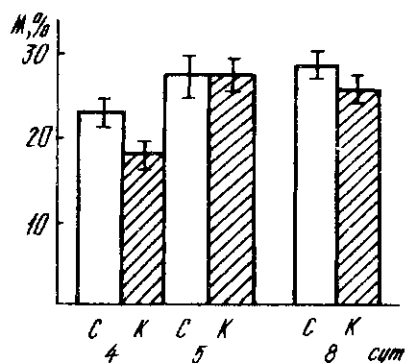


Рис. 1. Концентрация меланина в биомассе (P) на 4-, 5- и 8-е сут культивирования *C. cladosporioides* при постоянном освещении (С) и в темноте (К). Здесь и на рис. 2, 3 указан доверительный интервал

активного роста наблюдается различие в концентрации меланина в биомассе, а именно: освещавшийся мицелий содержит несколько большее количество пигмента ($23 \pm 1,6$ %), чем контрольный ($17,8 \pm 1,3$ %). По-видимому, действие света на меланиногенез *C. cladosporioides* проявляется лишь в фазе активного роста. Очевидно, что освещение ускоряет процесс синтеза пигмента в этот период либо за счет сокращения лаг-фазы меланиногенеза, либо вследствие увеличения удельной скорости синтеза меланина во время экспоненциального роста. Однако в конечном итоге, т. е. к началу стационарной фазы периодического роста разница между содержанием меланина в контрольном и освещавшемся мицелии отсутствует. Кроме того, не выявлено отличий между количеством ПЦ в контрольном пигменте и меланина освещавшегося мицелия. Как правило, темная окраска мицелия, органов размножения и переживания свидетельствует о контакте соответствующих структур грибов с интенсивной инсоляцией и другими экстремальными физико-химическими факторами [1, 2]. Однако реакция меланиногенных микроорганизмов на действие света в видимой области и УФ диапазоне может быть диаметрально противоположной. В литературе накоплено много данных о фотостимуляции пигментогенеза микроскопических грибов, направленного на защиту от солнечной радиации цитоплазматических органелл [3, 14—18]. Наряду с этим встречаются публикации о фотоингибировании меланиногенеза у черного мутанта *Neurospora crassa* [2]. Интересен тот факт, что у этого гриба свет в диапазоне 400—450 нм инактивировал тирозиназу только *in vivo*. Помимо этого у некоторых микроорганизмов, таких как *Pullularia prototropha* и *Nadsoniella nigra*,

пигментация не зависела от освещенности культур [2].

Несомненно, что свет в видимом диапазоне спектра не играет столь значительной роли в меланиногенезе темноокрашенного *C. cladosporioides*, как и у ряда других грибов, имеющих темную окраску лишь на определенных стадиях развития или в ответ на действие солнечной радиации.

Исследования влияния УФ излучения на меланиногенез *C. cladosporioides* были проведены нами по двум принципиально различным схемам. Во-первых, дробнопродолгованное облучение растущего микромицета небольшими предпороговыми дозами УФ по аналогии с эффектом "загорания". И, во-вторых, поиск УФ-чувствительной фазы периодического роста грибной культуры с "ответом" в меланиногенезе.

Предварительно нами были исследованы особенности действия УФ ($\lambda = 254$ нм) в широком диапазоне доз (15—1100 Дж/м²) на жизнеспособность конидий *C. cladosporioides*. В ходе этих экспериментов была определена пороговая доза облучения, равная 30 Дж/м², после которой выживаемость спор начинала снижаться. Дальнейшие эксперименты по изучению влияния УФ на меланиногенез проводили с использованием этой дозы облучения.

Было показано, что дробнопродолгованное УФ облучение дозой 30 Дж/м² трижды в день не влияет на синтез пигмента и не изменяет содержания ПЦ в меланине (рис. 2). Более перспективным для интенсификации меланиногенеза оказался второй подход — поиск УФ-чувствительной фазы периодического роста. Результаты экспериментов показали, что такая фаза существует (рис. 3). Как оказалось, однократное облучение мицелия

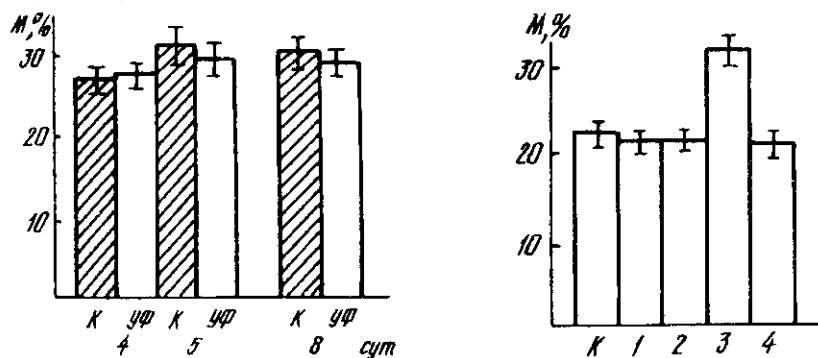


Рис. 2. Концентрация меланина в биомассе (Р) на 4-, 5- и 8-е сут культивирования *C. cladosporioides* в условиях дробного УФ-облучения (УФ, суммарная доза 300 Дж/м²) и в контрольных условиях (К)

Рис. 3. Концентрация меланина в биомассе (Р) на 5-е сут культивирования *C. cladosporioides* при однократном УФ-облучении культуры (30 Дж/м²) в различных фазах периодического роста: 1 — первой лаг-фазе; 2 — первой экспоненциальной фазе; 3 — второй лаг-фазе; 4 — второй фазе экспоненциального роста; К — контрольный необлучавшийся вариант

через 50—60 ч после начала роста дозой 30 Дж/м² повышает содержание пигмента в мицелии в конце процесса (начало стационарной фазы) на $31,0 \pm 1,5$ %. УФ облучение в другое время, в частности, в период активного роста микромицета не дает никакого эффекта в плане увеличения накопления пигмента клетками. Предварительные исследования особенностей периодического роста *C. cladosporioides* свидетельствуют о том, что УФ-чувствительный период с «ответом» в меланиногенезе совпадает со второй лаг-фазой кривой роста, когда заканчивается процесс прорастания спор и формирования мицелиальных структур и начинается экспоненциальный рост уже сформировавшегося мицелия [20].

Следует отметить, что во всех случаях УФ облучения уровень ПЦ в пигменте не изменяется.

В биотехнологическом аспекте полученные результаты и обнаруженная УФ стимуляция меланиногенеза весьма ценны для интенсификации процесса получения грибного меланина. Кроме того, однократное облучение дальним УФ ($\lambda = 254$ нм) дозой 30 Дж/м^2 культуральной среды с мицелием весьма перспективно в производстве для предупреждения контаминации.

Однако с экологической точки зрения облучение в этом диапазоне достаточно неестественно для почвенных микромицетов, поскольку дальний УФ практически не доходит до поверхности земли [1]. Учитывая отсутствие увеличения синтеза пигмента при дробнопродолжительном облучении и однократном облучении УФ во всех фазах активного роста *C. cladosporioides*, а также интенсивную темную окраску мицелия и спор гриба на всех стадиях онтогенеза, можно сделать вывод о том, что свет не является необходимым условием меланиногенеза для данного микромицета в естественных условиях обитания. По нашему мнению, реакция меланиногенных грибов на электромагнитное излучение в видимой и УФ области спектра тесно связана с особенностями их экологии. *C. cladosporioides* относится к группе темноокрашенных эпифитных сапрофитов, называемых грибной чернью [1]. Темнопигментированный мицелий, органы переживания и размножения имеют многие эктопаразиты и эндофитные паразиты филлоферы, для которых контакт с солнечной радиацией играет решающую роль в меланиногенезе как проявлении фенотипической адаптации [2, 16]. Естественно, что для этой группы микроорганизмов свет является необходимым условием для синтеза пигмента, который происходит лишь на определенных стадиях развития грибов. Кроме того, существует довольно обширная группа почвенных сапрофитов, синтезирующих меланин лишь по мере старения мицелия и при образовании спор. Очевидно, что в этом случае меланин является типичным вторичным метаболитом, как было показано на примере *Aspergillus nidulans* [20, 21]. Эволюционная роль солнечной радиации в развитии подобного защитного механизма несомненна, но не является необходимым индуктором меланиногенеза этой группы микроорганизмов. Здесь, скорее всего, меланиногенез индуцируется такими физиологическими процессами, как лимитирование или ингибирование роста в идиофазе.

Однако существование меланиногенных грибов, в частности *C. cladosporioides*, которые на всех стадиях своего развития синтезируют значительное количество черного пигмента и имеют интенсивную темную окраску, подтверждает, на наш взгляд, тот факт, что у них происходит не индуцированный, а конститутивный синтез меланина. Активный синтез меланина у этой группы осуществляется независимо от различных физико-химических факторов на самых ранних стадиях онтогенеза — в трофофазе. Это предположение не исключает положительного, оптимизирующего влияния на пигментогенез различных индукторов, в том числе и света. При этом названные индукторы не оказывают решающего воздействия на процессы меланинообразования. В пользу этого свидетельствуют предварительно полученные нами данные по физиологии роста и синтеза меланина *C. cladosporioides*, а именно: активный пигментогенез происходит на самых ранних этапах периодического роста и тесно связан с ростом; компоненты, pH среды, температура и кислородный режим в исследованном диапазоне не влияют на количество синтезированного меланина. И, наконец, доказательством конститутивного синтеза меланина у представителя "черной расы" грибов *C. cladosporioides* служат результаты наших экспериментов по влиянию света на меланиногенез, выявившие отсутствие решающей роли фотofакторов в процессах пигментообразования у данного микромицета.

М.О. Фомина, О.М. Громозова, В.С. Підгорський,

Вплив світла на меланіногенез *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries

Резюме

Досліджено вплив світла та УФ-опромінення на меланіногенез *C. cladosporioides*. Показано, що ці фактори не здійснюють вирішального впливу на процеси синтезу меланіна. Висунуто припущення про конститутивну природу синтезу пігмента у такого представника "чорної раси" грибів, як *C. cladosporioides*.

M. A. Fomina, E. N. Gromosova, V. S. Podgorsky

Light influence on melaninogenesis of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries

Summary

The effect of light and UV-irradiation on the melanin production of *Cladosporium cladosporioides* was studied. It was shown that these factors don't have considerable influence on the processes of melanin synthesis. The supposition of constitutive nature of pigment synthesis of such representative of fungal "black race" as *C. cladosporioides* is advanced.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лях С. П. Микробный меланиногенез и его функции.—М.: Наука, 1981.—274 с.
2. Лях С. П., Рубан Е. Л. Микробные меланины.— М.: Наука, 1972—185 с.
3. Ellis D., Griffiths D. Melanin deposition in hyphae of a species of *Phomopsis* // *Canad. J. Microbiol.*—1975.—21, № 4.—Р. 442—452.
4. Василевская А. И., Жданова Н. Н., Терещук А. Н., Бирюк Л. И. Адсорбция ионов меди почвенными грибами // *Микробиол. журн.*—1988.—50, № 2—С. 39—45.
5. Жданова Н. Н., Василевская А. И. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте.— Киев: Наук. думка, 1982.—168 с.
6. Жданова Н. Н., Василевская А. И., Гаврилюк В. И. и др. Накопление радиоактивного стронция некоторыми почвенными микромицетами в модельных опытах // *Микология и фитопатология.*—1990.—24, № 2.—С. 106—111.
7. Борисюк Л. Г., Харатьян Е. Ф., Жданова Н. Н. Локализация и динамика накопления меланина в клетках *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) Vries // *Микробиол. журн.*—1991.—53, № 6.—С. 10—15.
8. Фомина М. А., Громозова Е. Н., Блажчук И. С. Особенности роста и синтеза меланина *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) Vries в процессе периодического культивирования // Там же.—1995.—57, № 2.—С. 15—20.
9. Жданова Н. Н., Гаврюшина А. И., Бондар А. I. Про летальну дію УФ та у-опромінення на деякі види *Dematiaceae* // *Мікробіол. журн.*—1972.—34, № 2.—С. 173—177.
10. Жданова Н. Н., Василевская А. И. Отношение грибов к свету и к ультрафиолетовым лучам и ионизирующему облучению // *Методы эксперим. экологии.*— Киев: Наук. думка, 1982.—С. 376—389.
11. Жданова Н. Н., Мележик А. В., Школьный А. Т. и др. Получение и характеристика меланина гриба *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries // *Микробиол. журн.*—1993.—55, № 1.—С. 79—85.
12. Жданова Н. Н., Мележик А. В., Василевская А. И. и др. Процессы образования и гибели фотоиндуцированных парамагнитных центров в меланинсодержащих грибах // *Изв. АН СССР. Сер. Б.*—1978.— № 4.—С. 576—581.
13. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.— Л.: Медгиз, 1962.—180 с.
14. Асланов Ч. А., Жданова Н. Н., Степанченко Н. Н. и др. Биохимические изменения при адаптации некоторых дейтеромицетов к свету и влиянию веществ — генераторов кислородных радикалов // *Тез. докл. конф. "Антропогенная экология микромицетов".*— Киев, 1990.—С. 3—4.
15. Чеботарев Л. Н., Землянухин А. А. Физиологические и биохимические аспекты фотобиологии грибов // *Вопр. биохимии и физиологии микроорганизмов.*— Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1976.—С 7—4.
16. Sussman A. S., Halvorson H. O. Spores: Their dormancy and germination.— London: Harper and Row, 1966.—354 p.
17. Pridham J. B., Woodhead S. The biosynthesis of melanin in *Alternaria* // *Phytochemistry.*—1977.—16, N 7.—Р. 903—906.
18. Chet I., Huttermann A. Melanin biosynthesis during differentiation of *Physarum polycephalum*

- // Biochim. et biophys. acta.—1977.—499, N 1.—P. 148—155.
19. Громозова Е. Н., Фомина М. А., Блажчук И. С. и др. Физиологические особенности роста различных мицелиальных структур *Thielavia sp.* на среде с глюкозой // Микробиол. журн.—1989.—51, № 1.—С. 43—46.
 20. Pirt S. J., Rowley B. I. Melanin production in *Aspergillus nidulans* // Biochem. J.—1969.—114, N 1.—P. 9.
 21. Rowley B. I., Pirt S. J. Melanin production by *Aspergillus nidulans* in batch and chemostat cultures // J. Gen. Microbiol.—1972.—72, N 3.—P. 553—563.

УДК 55.212.582.28:579.22.3:579.24.3

Поступила в редакцию 02.03.95