

## WPLYW JONÓW OŁOWIU NA FUNKCJONOWANIE ZEGARA BIOLOGICZNEGO U *Penicillium claviforme*

Bernarda Piskorz-Bińczycka, Marta Nowak

Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Rzeszowski w Rzeszowie

### Wstęp

Jony metali ciężkich takich jak ołów czy kadm należą do najbardziej toksycznych jonów metali występujących w przyrodzie [KABATA-PENDIAS, PEDIAS 1993]. Powodują one wiele różnorodnych zakłóceń metabolizmu, czego wynikiem jest często zahamowanie wzrostu, a przy wyższych stężeniach mogą prowadzić nawet do śmierci rośliny [PACHLEWSKI, CHRUSCIAK 1986].

Grzyby są organizmami charakteryzującymi się znaczną odpornością na toksyczne działanie nawet wysokich koncentracji jonów metali ciężkich [AVAKYAN 1967; BABICH, STOTZKI 1979; TURNAU i in. 1994].

Jednak niewiele wiemy o mechanizmie tej odporności. Wydaje się, że pewne wyjaśnienie tej kwestii mogą dać wyniki badań nad zegarem biologicznym, który, jak wiemy, jest podłożem wielu przemian metabolicznych. Stosunkowo liczne prace dotyczą zdolności adaptacyjnych komórek grzybowych do wysokich stężeń jonów metali ciężkich. Natomiast wpływ ich obecności w podłożu na zegar biologiczny u grzybów nie był dotychczas badany.

Badania obecne dotyczą wpływu jonów ołowiu na funkcjonowanie zegara biologicznego u *Penicillium claviforme* – organizmu, u którego zegar biologiczny został stosunkowo dobrze poznany [PISKORZ-BIŃCZYCKA 1987]. Funkcjonowanie zegara biologicznego objawia się u tego gatunku rytmicznym tworzeniem pierścieni korembialnych, na których tworzą się wegetatywne spory.

### Materiał i metodyka

Materiałem badawczym były szczepy grzyba *Penicillium claviforme* (Bainier 126-28), pochodzące z Centraalbureau voor Schimmelcultures w Baarn (Holandia).

Grzyby hodowano na pożywkę według PISKORZ [1967] o składzie (w 1 dm<sup>3</sup>): 75 mmol glukozy; 12,5 mmol NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 4 mmol MgSO<sub>4</sub>; 5,7 mmol K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10,4 mmol ZnSO<sub>4</sub>; 3,6 mmol FeSO<sub>4</sub> z dodatkiem 10% wyciągu drożdżowego. Pożywkę zestalano agarem.

Do pożywki dodawano różne stężenia octanu ołowiu od 10 do 2000 mg·kg<sup>-1</sup>, buforowano ją do pH 6,5. Jałową pożywkę rozlewano do sterylnych szalek Petriego lub kolbek Erlenmayera.

Hodowle prowadzono w warunkach światła, stosując światło białe ciągłe o intensywności 0,9 W·m<sup>-2</sup>, a także w ciemności. Do badań nad zegarem biologicznym grzyby szczepiono krążkiem młodej 36-godzinnej grzybni, umieszczając krążek na szalce centralnie.

Stosując metodykę opracowaną we wcześniejszych badaniach [PISKORZ-BIŃCZYCKA 1987], określano: szybkość wzrostu grzybni, okres rytmu zarodnikowania, suchą masę grzybni, a także wykonano badania morfologiczne koremiów.

### Analiza rytmu

Długość okresu rytmu wyliczono przez podzielenie odległości pomiędzy dwoma sąsiednimi zonami przez szybkość wzrostu, która była wartością stałą. Stosowano wzór [PISKORZ-BIŃCZYCKA 1987]:

$$\tau = \frac{24 \times b}{V}$$

gdzie:

- $\tau$  – okres rytmu wyrażono w godzinach (h),
- $b$  – odległość kolejnych zon (mm),
- $V$  – szybkość wzrostu (mm·24 h<sup>-1</sup>).

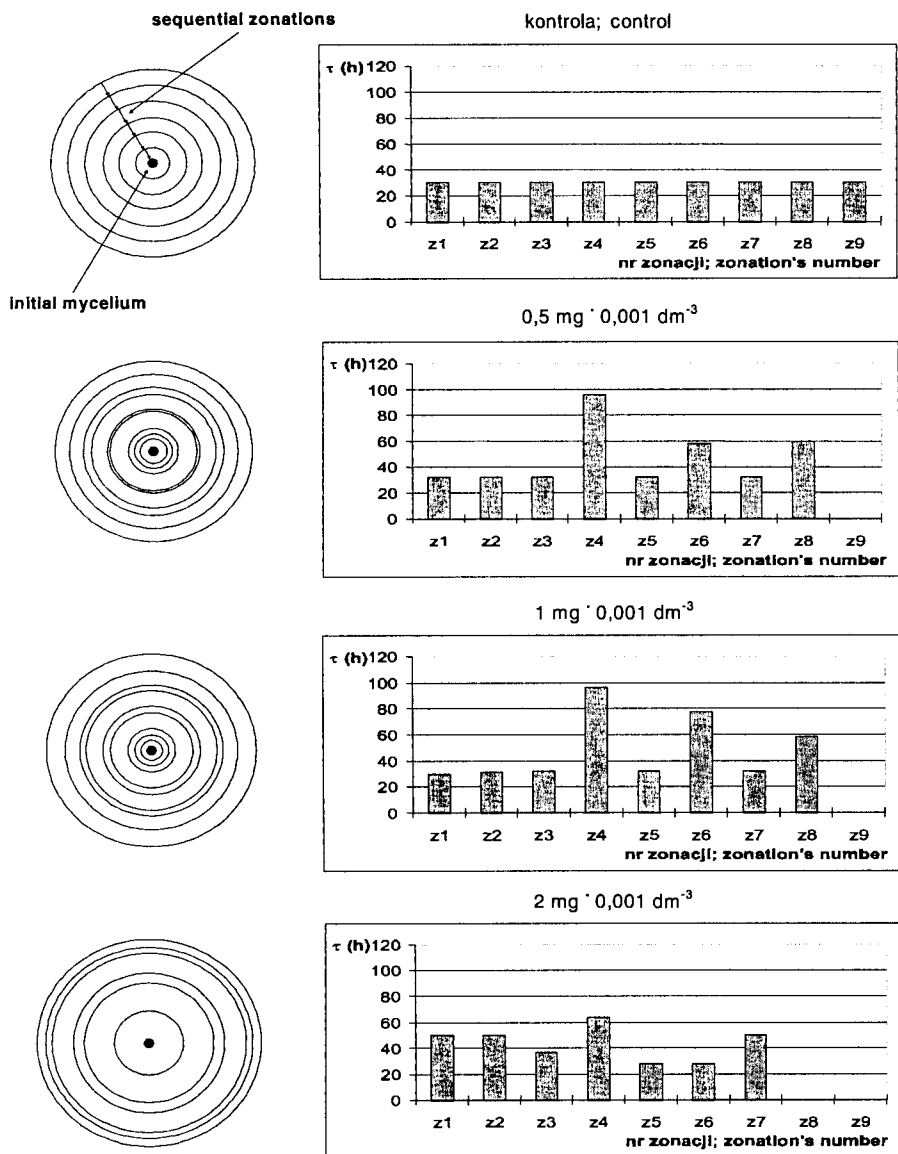
Oznaczanie zawartości Pb<sup>2+</sup> w grzybni *Penicillium claviforme* wykonano w Stacji Chemiczno-Rolniczej w Rzeszowie przy użyciu aparatu Perkin Elmer 1100B.

### Wyniki

Badania prowadzono równolegle w warunkach światła i ciemności. Na rys. 1 przedstawiono wyniki badań nad wpływem jonów ołowiu na funkcjonowanie zegara biologicznego w kilku wybranych stężeniach stosowanego octanu ołowiu, będącego źródłem jonów Pb<sup>2+</sup>.

Przedstawione na rys. 1 schematy ilustrują funkcjonowanie zegara biologicznego u badanego gatunku *P. claviforme*. Koncentryczne koła umieszczone z lewej strony rysunku przedstawiają kolejne zonacje. Umieszczone obok diagramy przedstawiają długości okresu kolejnych zonacji w różnych stężeniach ołowiu.

W zasadzie zegar biologiczny funkcjonuje przy wszystkich ze stosowanych stężeń jonów ołowiu. Jednakże ze wzrostem koncentracji jonów Pb<sup>2+</sup> zegar biologiczny ulega coraz większym zakłóceniom, objawiającym się niestabilnością długości okresu rytmu i jego desynchronizacją. Samo uruchomienie zegara ulega 48-godzinnemu opóźnieniu. Także trwałość rytmu zarodnikowania – tworzenia pierścieni koremialnych, wyrażona liczbą kolejnych okresów – ulega zmianie i tak w kontroli po 12 dniach wzrostu powstaje 9 zonacji, a w obecności Pb<sup>2+</sup> 7–8.



Rys. 1. Schematy ilustrują funkcjonowanie zegara biologicznego u gatunku *Penicillium claviforme*. Koncentryczne koła umieszczone z lewej strony ryciny przedstawiają kolejne zonacje. Umieszczone obok diagramy przedstawiają długości okresu kolejnych zonacji w różnych stężeniach ołowiu. Na osi odciętych umieszczono długość okresu rytmu zarodnikowania w godzinach ( $\tau = h$ ). Oś rzędnych przedstawia kolejne zonacje ilustrujące funkcjonowanie zegara i jego trwałość (liczbę okresów; z1,... , z9)

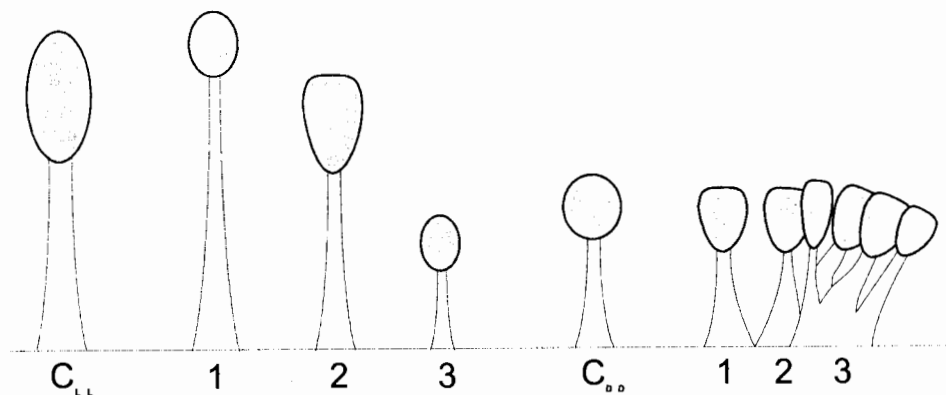
Fig. 1. Diagrams show functioning of the biological clock in *Penicillium claviforme*. Concentric circles on the left show sequential zonations. Appropriate graphs show length of sporulation periods at different concentrations of lead. On the Y axis there is length of sporulation period in hours ( $\tau = h$ ). On the X axis there are sequential zonations that show functioning of the biological clock and its durability (number of periods; z1,... , z9)

Obserwowano również wpływ obecności jonów  $Pb^{2+}$  na wzrost grzybni i morfologię powstających koremiów. Wyniki tej serii badań przedstawiono w tabeli 1 oraz na schemacie rys. 2. Należy zauważyć, że w obecności jonów  $Pb^{2+}$  sam proces kiełkowania zarodników ulegał pewnemu zahamowaniu, wyrażającym się 12 godzinnym opóźnieniem.

Tabela 1; Table 1

Wpływ jonów  $Pb^{2+}$  na wzrost i suchą masę grzybni *Penicillium claviforme*  
The effects of  $Pb^{2+}$  ions on the growth and dry matter *Penicillium claviforme*

Stężenie jonów $Pb^{2+}$ pożywki Concentration of $Pb^{2+}$ ions ( $mg \cdot kg^{-1}$ )	Warunki hodowli; Conditions of culturing					
	światło; light			ciemność; darkness		
	szybkość wzrostu rapidity of growth ( $mm \cdot 24 h^{-1}$ )	$\phi$ grzybni diameter of mycelium (mm)	sucha masa dry matter (mg)	szybkość wzrostu rapidity of growth ( $mm \cdot 24 h^{-1}$ )	$\phi$ grzybni diameter of mycelium (mm)	sucha masa dry matter (mg)
0	1,9	47	107	1,9	51	110
0,001	1,8	47	99	2,0	50	100
0,025	1,9	46	100	2,1	49	99
0,500	1,9	49	102	2,0	48	101
0,100	1,9	48	109	1,9	49	100
0,750	1,9	48	100	2,0	46	115
0,100	2,0	48	100	2,0	49	112
1,500	1,9	48	101	2,1	48	113
2,000	1,9	48	98	2,0	48	109



$C_{LL}$  – światło ciągłe (kontrola); continuous light (control)  
 $C_{DD}$  – ciemność ciągła (kontrola); continuous darkness (control)  
 1. 2. 3 – działanie  $Pb$ ; effect of  $Pb$

Rys. 2. Schemat kształtu koremiów występujących w obecności  $Pb^{2+}$  w kulturach hodowanych w warunkach światła i ciemności

Fig. 2. Diagram of shape (morphology) of the coremia observed in culture with  $Pb^{2+}$  presence under light and darkness conditions

Na podstawie wyników badań zestawionych w tabeli 1 można stwierdzić, że w warunkach doświadczenia szybkość wzrostu grzybnii w zasadzie nie ulegała zmianie przy różnych stężeniach  $Pb^{2+}$ . Niewielkie przyspieszenie wzrostu obserwowano przy niskich stężeniach  $Pb^{2+}$  w pożywce w kulturach hodowanych w ciemności. Stosunkowo nieznacznym zmianom ulegała również masa grzybnii.

W obecności jonów  $Pb^{2+}$  obserwowano silne zmiany morfologiczne powstających koremiów. Wyniki tej serii badań przedstawiono na rys. 2.

Zmianom morfologicznym w obecności jonów  $Pb^{2+}$  podlegała przede wszystkim główka koremium. W kulturach prowadzonych na świetle w obecności  $Pb^{2+}$  pojawiały się koremia o bardziej zaokrąglonej lub spłaszczonej główce i nieco niższe w stosunku do kontroli. W ciemności obserwowano przede wszystkim zrastanie się koremiów, zatracaly one swoją indywidualność. W tych warunkach również ulegał zmianie kształt główki. Intensywność zarodnikowania, chociaż trudna do spreycyzowania, była nieco słabsza.

Tabela 1; Table 1

Zawartość  $Pb^{2+}$  w grzybnii *Penicillium claviforme* w kulturach ze światła i z ciemności  
Content of  $Pb^{2+}$  in mycelium of *Penicillium claviforme* in cultures from light and darkness conditions

zawartość $Pb^{2+}$ w pożywce content of $Pb^{2+}$ in medium	Akumulacja $Pb^{2+}$ w grzybnii Accumulation of $Pb^{2+}$ in mycelium			
	światło; light		ciemność; darkness	
0,750 mg·0,001 dm <sup>-3</sup>	0,00367	mg·g <sup>-1</sup> grzybnii mg·g <sup>-1</sup> mycelium	0,00548	mg·g <sup>-1</sup> grzybnii mg·g <sup>-1</sup> mycelium

W tabeli 1 przedstawiono całkowitą zawartość  $Pb^{2+}$  w grzybnii po 12 dniach wzrostu w zależności od warunków świetlnych hodowli. Jak można zauważyć, w grzybniiach *P. claviforme* hodowanych w ciemności stwierdzono znacznie wyższą zawartość  $Pb^{2+}$ . Różnice te są spowodowane nieco innym metabolizmem u tego organizmu, jeśli kultury są prowadzone na świetle. Dotyczy to przede wszystkim metabolizmu węgla.

## Dyskusja

W naszych badaniach stwierdzono, podobnie jak to podają inni autorzy [TURNER 1969; ROSS 1975; TURNAU i in. 1994; RÓŻYCKI 1993], że szczepy *Penicillium claviforme* wykazują dużą odporność na obecność jonów ołowiu w podłożu. Obserwowano nieznaczne opóźnienie w procesie kiełkowania zarodników, a także niewielkie zahamowanie wzrostu grzybnii. Wzrost strzępek w obecności jonów ołowiu nie był równomierny, jak to ma miejsce w warunkach kontrolnych. Świadczy to o istnieniu mechanizmów obronnych właściwych komórkom roślin i grzybów [RÓŻYCKI 1992, 1993; DUBEY, DWIVEDI 1994]. Natomiast wyraźnemu zakłóceniu ulegało funkcjonowanie zegara biologicznego, które obserwowano już nawet w bardzo niskich stężeniach  $Pb^{2+}$  (0,5 mg·0,001 dm<sup>-3</sup>). Przede wszystkim zakłócenia funkcjonowania zegara biologicznego dotyczyły długości okresu rytmu zonacyjnej-

go. Okres rytmu wydłużał się z 30 godzin w warunkach kontrolnych do 50 godz., a nawet 100 godz., przy czym następujące po sobie okresy nie wykazywały żadnej regularności. Pewną regularność i powtarzalność obserwowano dopiero w najwyższych stężeniach  $Pb^{2+}$ .

Nasze pilotażowe badania nad wpływem jonów ołowiu na funkcjonowanie zegara biologicznego wskazują, że jest to jon zaburzający wiele przemian metabolicznych u badanego organizmu, a z wstępnych badań nad różną zawartością w grzybni w zależności od warunków świetlnych hodowli można wnioskować, że przede wszystkim zaburza on metabolizm węgla.

## Literatura

- AVAKYAN Z.A. 1967. *Comparative toxicity of heavy metals for certain microorganisms*. Mikrobiologiya 36: 446–450.
- BABICH H., STOTZKI G. 1979. *Abiotic factors affecting the toxicity of lead to fungi*. Appl. Environ Microbiol. 38: 506–513.
- DUBEY R.C., DWIVEDI R.S. 1988. *Effect of heavy metals on the growth and survival of macrophomina phaseolina*. Goid. Biol. Fertil. Soils 6: 311–314.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. 1993. *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. PWN Warszawa: 398 ss.
- PACHLEWSKI R., CHRUSCIAK E. 1986. *Oddziaływanie ołowiu i cynku na wzrost niektórych grzybów mikoryzowych w kulturach in vitro*. Acta Mycol. 22: 73–80.
- PISKORZ B. 1967. *Investigation of the action of light on the growth and development of Penicillium claviforme*. Acta Soc. Bot. Pol. 36: 671–698.
- PISKORZ-BIŃCZYCKA B. 1987. *Endogenous light-energy-dependent rhythm of zonation in Penicillium claviforme*. Physiol. Plant. 70: 163–167.
- ROSS J.S. 1975. *Some effects of heavy metals on fungal cells*. Trans Brit. Mycol. Soc. 64(2): 175–193.
- RÓŻYCKI H. 1992. *Effect of heavy metals (Pb, Zn, Cu and Cd) on germination of conidia of Cylindrocarpon destructans (Zinssm) Scholten*. Zentralbl. Mikrobiol. 147: 261–269.
- RÓŻYCKI H. 1993. *Effect of heavy metals (Pb, Zn, Cu and Cd) on mycelial growth Cylindrocarpon destructans (Zinssm) Scholten*. Zentralbl. Mikrobiol. 148: 265–275.
- TURNAU K., KOTTKE J., DEX HEIMER J. 1994. *Paxillus involutus/Pinus silvestris micorhizas from heavily polluted forest. I. Element localization using electron energy loss spectroscopy and imaging*. Botanica Acta 106: 213–219.
- TURNER H.G. 1969. *Heavy metal tolerance in plants. In ecological aspects of the mineral nutrition of plants*. Rorison I.H. (ed.). Oxford Edynburgh Black Well Scientific Publications: 399–410 ss.

**Słowa kluczowe:** zegar biologiczny, ołów, *Penicillium claviforme*

## Streszczenie

Badano wpływ jonów ołowiu na funkcjonowanie zegara biologicznego u *Penicillium claviforme*. Stwierdzono, że w szerokim zakresie stężeń jony ołowiu nie wpływały znacząco na wzrost strzępek i suchą masę grzybni. Natomiast zegar biologiczny ulegał silnym zakłóceniom, okres rytmu ulegał znaczącemu wydłużeniu, z 30 godzin w kontroli do 100 w obecności jonów ołowiu. Obserwowano również zmiany morfologiczne powstających kłębów.

## THE EFFECT OF LEAD IONS ON THE FUNCTIONING OF THE BIOLOGICAL CLOCK IN *Penicillium claviforme*

Bernarda Piskorz-Bińczycka, Marta Nowak  
Institute of Biology, University of Rzeszów, Rzeszów

Key words: biological clock, lead, *Penicillium claviforme*

### Summary

Lead ions besides those of cadmium belong to the most toxic metal ions occurring in nature. They are responsible for several distortions of metabolism, the result of which is the inhibition of growth of cells, organs and whole plant organisms.

They are also responsible for the disturbance in the functioning of biological clock in fungi. Little is known on this subject at present, hence the result of the current preliminary investigations performed on *Penicillium claviforme*, with which the functioning of the biological clock has been fairly well recognised, will provide an answer to this question.

On the basis of the performed experiments it has been found that ions of these toxic metals in lower concentrations (from 0.001 to 2.0 mg·0.001 dm<sup>-3</sup> of the nutrient) did not essentially disturb normal functioning of the biological clock in *Penicillium claviforme*. On the other hand, the higher concentrations of lead ions (from 0.5 to 2 mg·0.001 dm<sup>-3</sup> nutrient) not only affected the morphology of the fruit-bodies, the cluster of conidiophores = *coremia*, but also inhibited the germination process and evidently disturbed the functioning of the biological clock. These disturbances affected first of all the length of the period, resulting from the inhibition of the growth of mycelium.

A preliminary analysis of the disturbance of lead ions in the mycelium and in fruit-bodies (*coremia*) has shown that Pb<sup>2+</sup> ions remain mainly in the edifice mycelium and are transported upwards to the *coremia* only to a small extent.

Dr hab. Bernarda Piskorz-Bińczycka  
Instytut Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Rzeszowski  
ul. Rejtana 16c  
35-959 RZESZÓW  
e-mail: bebincz@univ.rzeszow.pl