

АНТИМУТАГЕННА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *Saccharomyces cerevisiae*

В. К. Мусіяка, Г. О. Гладун, В. В. Сарнацька, Р. І. Гвоздяк¹

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна

¹ Інститут мікробіології і вірусології НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

Методом цитогенетичного аналізу аберацій хромосом меристематичних клітин корінців гороху встановлено антимуtagenну активність дріжджів S. cerevisiae по відношенню до спонтанного мутагенезу.

Вступ. Проблема пошуку речовин природного походження з антимуtagenними та генопротекторними властивостями надзвичайно актуальна у зв'язку з критичним погіршенням стану навколишнього середовища в результаті його хімічного забруднення [1]. Більшість відомих природних антимуtagenів входять до складу вищих рослин — це вітаміни, пігменти, амінокислоти, феноли, поліфеноли. Ними збагачені різні рослини, фрукти та овочі, які людина вживає в їжу. Останнім часом вивчено здатність продуктів бджільництва зменшувати мутагенну дію хімічних і фізичних мутагенів [2]. Показано антимуtagenну дію препаратів мумійо [3] та екстрактів лікарських рослин [4, 5].

У досліджах на тваринах встановлено високу біологічну активність полісахаридів (ліпополісахаридів, екзополісахаридів) бактеріального походження, а саме: імуномодулюючу, антилейкозну та антиметастатичну [6]. Детально вивчено біологічну активність дріжджових полісахаридів (мананів) різних видів *Candida* і *Saccharomyces* [7—9]. Такі розгалужені манани дріжджів, крім фітопатогенних вірусів, можуть значно пригнічувати віруси грипу і венесуельського енцефаліту коней, а також бактерію *Pseudomonas syringae* — збудника кутастої плямистості огірків. Є підстави вважати манани дріжджів та їхні похідні інтерферогенними речовинами [10].

Позаклітинні продукти білкової та вуглеводної природи, що виділяються іншими мікроорганізмами — біфідобактеріями — мають широкий спектр протипухлинної, імуномодулюючої та антимікробної активності [11].

На моделі індукції корончастого пухлин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* на експлантах картоплі, культивованих *in vitro*, було показано протипухлинну дію культурального середовища дріжджів роду *Saccharomyces* [12]. Виходячи з того, що механізми мутагенезу та канцерогенезу мають багато спільного [1], представлена робота присвячена вивченню антимуtagenної активності дріжджів роду *Saccharomyces* з використанням рослинної тест-системи.

Матеріали і методи. В роботі використано штами дріжджів *S. cerevisiae* Meyan. et Rees 1883, а саме: спиртовий ІМВ-527, ІМВ-528, пивний ІМВ-1970, хлібопекарський ІМВ-1085 та ІМВ-1984. Дріжджі вирощували в пивному суслі, рН 7,0, протягом двох діб при температурі 26 °С. Клітини дріжджів відокремлювали від культурального середовища центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 30 хв. У досліджах використовували супернатанти культуральних середовищ (далі СКС) лише в одному випадку — ультрафільтрату. В роботі також використано відходи виробництва дріжджів із Обухівського дріжджового заводу Київської області (далі — промисловий штам).

Тест-об'єктом було насіння гороху сорту Аграрій, еліта, врожаю 1996 р. Роботу було проведено

Таблиця 1

Вплив супернатантів культуральних середовищ дріжджів на енергію проростання насіння, довжину та масу корінців гороху сорту Аграрій

Штам дріжджів	Варіант	Енергія проростання, %	Середня довжина одного корінця, см	Відношення до контролю, %	Середня маса одного корінця, мг	Відношення до контролю, %
<i>Дослід 1</i>						
Промисловий	Контроль	80,0	3,2±0,33	100,0	43,3±4,04	100,0
	Нерозведений СКС	20,0	0,9±0,22	28,12	14,5±4,04	33,49
	Розведений СКС, 1 : 10	55,0	1,9±0,22	59,38	30,1±3,85	69,52
	Розведений СКС, 1 : 100	85,0	3,2±0,25	100,0	49,4±1,18	114,09
<i>Дослід 2</i>						
ІМБ 527 спиртовий	Контроль	85,8	3,3±0,12	100,0	43,6±1,74	100,0
	Нерозведений СКС	40,0	0,8±0,07	24,24	8,5±0,37	19,49
	Розведений СКС, 1 : 10	95,0	2,3±0,16	69,70	32,2±1,63	73,85
	Розведений СКС, 1 : 100	100,0	3,8±0,16	115,15	51,6±2,49	118,35
ІМБ 528 спиртовий	Нерозведений СКС	40,0	0,7±0,05	21,21	11,3±0,51	25,02
	Розведений СКС, 1 : 10	95,0	2,6±0,19	78,79	38,4±1,79	88,07
	Розведений СКС, 1 : 100	95,0	3,7±0,17	112,12	52,8±2,25	121,10
ІМБ 1970 пивний	Нерозведений СКС	60,0	0,8±0,07	24,24	12,6±1,10	28,90
	Розведений СКС, 1 : 10	65,0	2,3±0,21	69,70	33,7±2,43	77,29
	Розведений СКС, 1 : 100	90,0	3,2±0,29	96,97	46,1±3,59	105,73
ІМБ 1985 хлібопекарський	Нерозведений СКС	85,0	2,3±0,6	69,70	33,0±1,07	75,69
	Розведений СКС, 1 : 10	95,0	3,1±0,14	93,94	50,7±2,46	116,95
	Розведений СКС, 1 : 100	80,0	3,0±0,11	90,91	41,4±1,01	94,95
ІМБ 1984 хлібопекарський	Нерозведений СКС	60,0	1,6±0,07	48,48	22,2±1,7	50,92
	Розведений СКС, 1 : 10	95,0	3,4±0,16	103,03	46,5±2,17	106,65
	Розведений СКС, 1 : 100	95,0	2,4±1,12	72,73	38,3±1,85	87,84
Ультрафільтрат промислового штаму	Нерозведений СКС	50,0	1,1±0,2	33,33	18,2±1,86	41,74
	Розведений СКС, 1 : 10	70,0	3,0±0,16	90,91	47,5±1,79	108,95
	Розведений СКС, 1 : 100	70,0	3,2±0,15	96,97	51,5±2,72	118,20

Таблиця 2

Вплив супернатантів культуральних середовищ дріжджів на мітотичну активність клітин меристем корінців гороху сорту Аграрій

Штам дріжджів	Варіант	Переглянуто клітин		Клітини, які діляться, %
		Всього	З них діляться	
<i>Дослід 1</i>				
Промисловий	Контроль	17600	445	2,60±0,35
	Нерозведений СКС	33575	88	0,26±0,01

Закінчення табл. 2

Штам дріжджів	Варіант	Переглянуто клітин		Клітини, які діляться, %
		Всього	З них діляться	
Промисловий	Розведений СКС, 1 : 10	24471	490	2,02±0,07
	Розведений СКС, 1 : 100	23357	803	3,49±0,19
<i>Дослід 2</i>				
ІМБ 527 спиртовий	Контроль	28454	1059	3,72±0,04
	Нерозведений СКС	26373	231	0,88±0,09
	Розведений СКС, 1 : 10	29214	411	1,40±0,06
	Розведений СКС, 1 : 100	20417	914	4,47±0,01
ІМБ 528 спиртовий	Нерозведений СКС	23091	139	0,60±0,01
	Розведений СКС, 1 : 10	25822	691	2,68±0,62
	Розведений СКС, 1 : 100	21076	915	4,34±0,17
ІМБ 1970 пивний	Нерозведений СКС	23433	223	0,95±0,04
	Розведений СКС, 1 : 10	22858	256	1,12±0,07
	Розведений СКС, 1 : 100	25527	700	2,74±0,06
ІМБ 1985 хлібопекарський	Нерозведений СКС	29018	821	2,83±0,41
	Розведений СКС, 1 : 10	26438	903	3,41±0,07
	Розведений СКС, 1 : 100	18852	397	2,11±0,16
ІМБ 1984 хлібопекарський	Нерозведений СКС	26209	115	0,44±0,05
	Розведений СКС, 1 : 10	21936	1232	5,62±0,37
	Розведений СКС, 1 : 100	22005	350	1,60±0,07
Ультрафільтрат промислового штаму	Нерозведений СКС	31435	11	0,03±0,00
	Розведений СКС, 1 : 10	20354	604	2,96±0,12
	Розведений СКС, 1 : 100	18808	782	4,16±0,09

Таблиця 3

Хромосомні аберації в меристемах корінців гороху сорту Аграрій під впливом супернатантів культуральних середовищ дріжджів

Штам дріжджів	Варіант	Переглянуто клітин		Аберації, %
		Всього	З них діляться	

Дослід 1

Промисловий	Контроль	94	11	11,70±1,68
	Нерозведений СКС	37	3	8,10±0,51
	Розведений СКС, 1 : 10	107	7	6,48±0,47
	Розведений СКС, 1 : 100	192	7	3,64±0,45

Дослід 2

ІМБ 527 спиртовий	Контроль	353	23	6,55±0,25
-------------------	----------	-----	----	-----------

Закінчення табл. 3

Штам дріжджів	Варіант	Переглянуто клітин		Аберації, %
		Всього	З них діляться	
ІМБ 527 спиртовий	Нерозведений СКС	20	0	0
	Розведений СКС, 1 : 10	114	6	5,28±0,36
	Розведений СКС, 1 : 100	274	16	5,84±0,13
ІМБ 528 спиртовий	Нерозведений СКС	8	0	0
	Розведений СКС, 1 : 10	161	7	4,45±1,05
	Розведений СКС, 1 : 100	226	4	1,81±0,49
ІМБ 1970 пивний	Нерозведений СКС	17	0	0
	Розведений СКС, 1 : 10	10	0	0
	Розведений СКС, 1 : 100	151	7	4,64±0,40
ІМБ 1985 хлібопекарський	Нерозведений СКС	256	13	5,53±0,75
	Розведений СКС, 1 : 10	278	9	3,24±0,24
	Розведений СКС, 1 : 100	92	3	3,34±0,30
ІМБ 1984 хлібопекарський	Нерозведений СКС	14	0	0
	Розведений СКС, 1 : 10	316	12	3,96±0,75
	Розведений СКС, 1 : 100	64	3	4,73±0,26
Ультрафільтрат промислового штаму	Нерозведений СКС	0	0	0
	Розведений СКС, 1 : 10	221	3	1,17±0,27
	Розведений СКС, 1 : 100	131	0	0

в січні—березні 1998 р. Вивчали вплив супернатантів на енергію проростання насіння, довжину та масу корінця, мітотичну активність та хромосомні аберації в клітинах меристем корінців гороху. Для цього насіння гороху (100—200 насінин у кожному варіанті) пророщували на вологому фільтрувальному папері в чашках Петрі в термостаті при температурі 25 °С. Фільтрувальний папір зволожували нерозведеними та розведеними в 10 та 100 раз супернатантами. Контрольні варіанти пророщували на дистильованій воді. Тривалість дослідження — три доби, після чого вираховували енергію проростання насіння, довжину корінців та їхню масу. Кінчики корінців розміром 2 мм (кореневі меристеми) фіксували в фіксаторі етанол : оцтова кислота (3 : 1), фарбували ацетоорсеїном при кімнатній температурі протягом доби, потім готували давлені препарати; підрахунок клітин, що діляться, та хромосомні аберації на стадії анафази і телофази здійснювали за стандартними методиками [13]. Одночасно вираховували кількість клітин, що мали аберації у вигляді мостів, фрагментів та відставання хромосом. Одержані результати обробляли статистично [14].

Результати та обговорювання. Як видно з представлених даних (табл. 1), дія СКС дріжджів на енергію проростання насіння гороху залежала від їхньої концентрації — всі нерозведені СКС значно зменшували енергію проростання, довжину та масу первинного корінця гороху. Тільки розведені в 10 або в 100 разів СКС стимулювали енергію проростання насіння на 10—15 %, масу корінців збільшували на 15—20 % при майже незмінній довжині корінця в порівнянні з контролем.

СКС дріжджів впливали на мітотичну активність меристематичних клітин корінців гороху (табл. 2) Стимулюючи енергію проростання СКС дріжджів у розведенні в 10 та 100 разів збільшували кількість клітин, що діляться, за виключенням варіантів дослідів з СКС пивних (штам 1970) та хлібних (штам 1985) дріжджів. Нерозведені СКС у всіх варіантах дослідження зменшували кількість клітин, що діляться. Можливо, саме цим можна пояснити падіння енергії проростання насіння гороху під впливом нерозведених СКС дріжджів. Останні зменшували кількість профаз у три рази, а кількість метафаз, анафаз і телофаз при цьому збільшувалася порівняно з контролем.

У клітинах меристем корінців гороху під впливом СКС дріжджів відсоток анафаз і телофаз з аберациями різко знижувався (табл. 3). Навіть нерозбавлені СКС, що пригнічували проростання та поділ клітин, зменшували кількість спонтанних абераций з 11,7 в контролі до 8,1 % в досліді. Розведення СКС в 10 та 100 разів зменшувало кількість абераций до 6,48 та 3,64 % відповідно.

Дія СКС колекційних культур дріжджів (табл. 3, дослід 2) на спонтанний мутагенез аналогічна такій промислового штаму дріжджового виробництва. Розведення в 10 та 100 разів СКС зменшувало в 2—3 рази відсоток спонтанних абераций. При дії нерозведених СКС, за виключенням штаму хлібних дріжджів 1985, абераций не виявлено, можливо, через різке пригнічення поділу клітин.

Спеціальне вивчення типів хромосомних абераций в клітинах кореневих меристем гороху показало, що СКС порівняно з контролем зменшували кількість мостів та збільшували кількість фрагментів хромосом.

Таким чином, на рослинній тест-системі нами вперше показано здатність супернатантів культуральних середовищ дріжджів збільшувати мітотичну активність, значно зменшувати спонтанний мутагенез, підвищувати енергію проростання насіння. Зниження рівня спонтанного мутагенезу могло відбуватися за рахунок впливу на метаболізм мутагенів у насінні та(або) на репаративні системи клітин.

Проведені на рослинному об'єкті досліді вказують на чітку антимурагенну властивість дріжджів. Разом з тим різні штами відрізняються між собою за цією ознакою. Тому доцільно вивчати антимурагенну активність широкого набору штамів дріжджів на рослинних тест-системах, а в найактивніших штамів дослідити антимурагенну активність на тваринах та мікроорганізмах для створення та подальшого практичного використання ефективних природних біопрепаратів.

Висловлюємо щирі подяки В. С. Підгорському та С. С. Нагорній за люб'язно надані штами мікроорганізмів.

Роботу виконано за фінансової підтримки ДФФД Міністерства України у справах науки і технологій.

В. К. Мусіяка, А. А. Гладун, В. В. Сарнацька, Р. І. Гвоздяк

Антимурагенная активность штаммов *Saccharomyces cerevisiae*

Резюме

Методом цитогенетического анализа абераций хромосом меристематических клеток корешков гороха установлена антимурагенная активность дрожжей *S. cerevisiae* по отношению к спонтанному мутагенезу.

V. K. Musiyaka, A. A. Gladun, V. V. Sarnackaya, R. I. Gvozdyak

Antimutagenic activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains

Summary

Antimutagenic activity of *Saccharomyces* yeast cultural liquid towards spontaneous mutagenesis in pea root meristemic cells has been shown using the method of cytogenetic analysis of chromosome aberrations.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барилляк И. Р., Исаева А. В. Антимурагенные и генопротекторные свойства препаратов растительного происхождения // Цитология и генетика.—1994.—28, № 3.—С. 3—17.
2. Барилляк И. Р., Бердышев Г. Д., Дуган А. М. Антимурагенное действие продуктов пчеловодства // Цитология и генетика.—1996.—30, № 6.—С. 48—55.
3. Левицкий У. Л., Губский Ю. И., Примак Р. Г., Горюшко А. Г., Марченко А. Н., Вистунова И. Е. Антиоксидантно-генопротекторный механизм действия препарата «Мумие-Витас» // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 1.—С. 63—69.
4. Лукаш Л. Л., Костецкая Е. В., Сухорада Е. М., Манько В. Г., Лыло В. В., Рубан Т. А., Евсеев А. А. Защита нормальных и опухолевых клеток человека от действия алкилирующего агента с помощью фракций, выделенных из экстракта *Sambucus nigra* // Биополимеры и клетка.—1977.—13, № 6.—С. 479—484.
5. Салихова Р. А., Порошенко Г. Г. Антимурагенные свойства дудника лекарственного // Вестн. РАМН.—1995.—1.—С. 58—61.
6. Захарова И. Я. Молекулярно-биологические механизмы функционирования микробных гликопротеидов и карбогидраз // Микробиол. журн.—1998.—60, № 6.—С. 3—26.
7. Коваленко О. Г. Виделения, очистка та деякі властивості антивірусних речовин з дріжджів // Микробиол. журн.—1971.—33, № 1.—С. 75—81.
8. Козар Ф. Е., Коваленко А. Г., Зарицкий Н. М., Неборачко В. В., Романенко Н. В. Использование антивирусных веществ для оздоровления картофеля от вирусов методом культуры ткани // Цитология и генетика.—1996.—30, № 6.—С. 28—33.
9. Коваленко О. Г., Шашков О. С., Васильев В. М., Телегесва Т. А. Структурні особливості та біологічна активність мананів *Candida spec. H.* // Биополимеры и клетка.—1995.—11, № 3—4.—С. 88—95.
10. Щербатенко І. С. Використання природної та індукованої стійкості рослин для захисту їх від вірусних хвороб // Микробиол. журн.—1998.—60, № 6.—С. 56—65.
11. Новик Г. И., Астапович Н. И., Рябая Н. Е., Богдан А. С. Исследование биологической активности белково-полисахаридного комплекса, секретируемого *Bifidobacterium adolescentis* // Микробиология.—1997.—66, № 5.—С. 628—634.
12. Гвоздяк Р. І., Сарнацька В. В., Гладун Г. О., Мартинюк Н. Б., Болоховська В. А. Вплив відходів мікробіологічної промисловості на індукцію пухлин у картоплі, спричинених *Agrobacterium tumefaciens* // Микробиол. журн.—1998.—60, № 3.—С. 50—56.
13. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений.—М.: Агропромиздат, 1988.—271 с.
14. Лакин Г. Ф. Биометрия.—М.: Высш. шк., 1980.—293 с.

УДК 575.224.23

Надійшла до редакції 18.05.99